

Tesis de Posgrado

Regulación de la síntesis de ácidos nucleicos en tiroides

Kleiman de Pisarev, Diana L.

1978

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

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

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

Cita tipo APA:

Kleiman de Pisarev, Diana L.. (1978). Regulación de la síntesis de ácidos nucleicos en tiroides. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1591_KleimandePisarev.pdf

Cita tipo Chicago:

Kleiman de Pisarev, Diana L.. "Regulación de la síntesis de ácidos nucleicos en tiroides". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1978.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1591_KleimandePisarev.pdf

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS
Y NATURALES

REGULACION DE LA SINTESIS
DE ACIDOS NUCLEICOS EN
TIROIDES

DIANA L. KLEIMAN DE PISAREV

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR
AL TITULO DE
DOCTOR EN CIENCIAS QUIMICAS

DIRECTOR DE TESIS:
DR. MARIO A. PISAREV

1978

1
g-2

A MI ESPOSO

AGRADECIMIENTOS

A los laboratorios donde se efectuaron estos estudios:

Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Argentina

Laboratorio de Bioquímica Nuclear, Comisión Nacional de Energía Atómica, Buenos Aires, Argentina

División of Endocrinology, Buffalo General Hospital, State University of New York at Buffalo, New York, U. S. A.

A las siguientes personas, que colaboraron en estos estudios:

Leonardo O. Aiello, Liliana Crenovich, Guillermo J. Juvenal, Mario A. Pisarev, Peter Reese y Stephen W. Spaulding.

A los laboratorios que facilitaron el uso de algunos equipos:

División Agropecuaria, Comisión Nacional de Energía Atómica,

Laboratorio de Esteroides, Instituto de Biología y Medicina Experimental

Servicio de Endocrinología, Hospital de Niños

Donación de algunas de las drogas utilizadas:

National Pituitary Agency, USA

Merck, Sharp & Dhome, USA

Merck, Sharp & Dhome, Argentina

Upjohn Co, USA

Smith, Kline & French, USA

Farmasa S. A. , Argentina

Laboratorios Glaxo, Argentina

Medical Foundation of Buffalo, USA

INDICE

<u>INTRODUCCION</u>	Página
I. Metabolismo del yodo.....	2
II. Regulación de la función tiroidea.....	3
Agentes estimulantes de la tiroides.....	4
Prostaglandinas.....	8
Agentes neurotransmisores y FNa.....	10
Agentes inhibidores. Efecto del exceso de yodo.....	13
III. Síntesis de ARN en eucariotes.....	17
IV. Acción de la TSH sobre el metabolismo de los ribonucleótidos y ácidos nucleicos en tiroides.....	18
V. Acción de otras hormonas polipeptídicas sobre la síntesis de ARN.....	20
 <u>MATERIALES Y METODOS</u>	
Materiales.....	24
Composición del medio de incubación.....	26
Obtención del tejido.....	26
Obtención de fracciones subcelulares.....	27
Condiciones de Incubación.....	28
Incubación con cortes de tiroides bovina.....	28
Determinación de la actividad transcriptacional.....	28
Extracción de ARN de cortes de tiroides según el método de Munro y Fleck.....	29
Extracción de ARN según el método de Perry y col. 1972.....	30
Determinación de la concentración de ADN por el método de Burton.....	31

I. Estudios de la incorporación de ^3H -uridina a ARN tiroideo.....	32
II. Estudios de la degradación de ARN.....	32
III. Análisis de los nucleótidos de uridina, precursores de ARN.....	32
IV. Determinación de la captación de ^3H - uridina.....	33
V. Determinación del espacio extracelular de los cortes de tiroides.	33
VI. Incorporación de ^3H -leucina a proteínas.....	34
VII. Estudios con núcleos aislados.....	35
Medición de la radiactividad.....	37
Análisis estadístico de los datos.....	38

RESULTADOS

PARTE I. ESTUDIOS CON TIROIDES BOVINA

A : <u>Acción del yodo y compuestos yodados sobre la síntesis de ARN.</u>	39
-Acción del IK sobre la incorporación de ^3H -uridina a ARN.....	39
-Acción del IK sobre la entrada del precursor y sobre el espacio extracelular tiroideo.....	43
-Acción a nivel de los nucleótidos precursores.....	43
-Acción a nivel de la degradación de ARN.....	46
-Acción sobre el proceso de transcripción.....	46
-Acción de T_4 sobre la marcación de ARN.....	52
-Efecto del IK sobre la acción de nucleótidos cíclicos en la incorporación de ^3H -uridina a ARN.....	52
-Influencia de la glucosa sobre la inhibición por IK.....	55
-Acción de diferentes compuestos yodados.....	55

B	: <u>Acción de nucleótidos cíclicos, neurotransmisores y prostaglandinas sobre la síntesis de ARN.</u>	58
	-Acción de los neurotransmisores y sus bloqueantes.....	58
	-Acción de las prostaglandinas.....	60
	-Acción de AMPc y GMPc.....	63
	-Acción de CMPc.....	68
	-Acción de la glucosa sobre la incorporación de ³ H-uridina a ARN.....	73
	-Papel del Ca ⁺⁺	76
	-Microscopía electrónica.....	78
 <u>PARTE II. ESTUDIOS CON TIROIDES CANINA.</u>		80
 <u>DISCUSION</u>		
A	: Acción del yodo y compuestos yodados.....	89
B	: Acción de TSH y nucleótidos cíclicos.....	97
 <u>CONCLUSIONES.</u>		106
 <u>BIBLIOGRAFIA.</u>		108

TRABAJOS PUBLICADOS Y COMUNICACIONES RELACIONADAS

CON ESTA TESIS

Pisarev M. A. , Aiello L. O. y Kleiman de Pisarev D. L.

Action of KI, thyroxine and cyclic AMP on ^3H - uridine incorporation into the RNA of thyroid slices.

Acta endocr. (Kbh), 83, 313, (1976)

Pisarev M. A. y Kleiman de Pisarev D. L.

Action of cyclic nucleotides on protein and RNA synthesis in the thyroid.

Acta endocr (Kbh) 84, 297, (1977)

Juvenal G. J. , Kleiman de Pisarev D. L. , Crenovich L. y Pisarev M. A.

Role of neurotransmitters, prostaglandins and glucose on precursor incorporation into the RNA of thyroid slices.

Acta endocr. (Kbh) 87, 776 (1978)

Kleiman de Pisarev D. L. , Pisarev M. A. y Juvenal G. J.

Action of KI and several iodocompounds on ^3H -uridine incorporation into thyroid RNA.

Aceptado para su publicación en Acta endocrino(Kbh),(1978)

Kleiman de Pisarev D. L. , Pisarev M. A. , Juvenal G. J. y de Rey B. M.

Role of cyclic nucleotides and Ca^{++} in RNA synthesis in the thyroid.

2^{do}. Congreso de la PanAmerican Association of Biochemical Societies, Sepr 3-9, 1978. Abstr 53, Caracas, Venezuela, en preparación para su publicación.

Pisarev M. A. , Aiello L. O. y Kleiman de Pisarev D. L.

Regulación de la biosíntesis de proteínas y ARN.

Libro del 3er Coloquio Argentino de Hormonas Tiroideas, pag44, Altschuler N., Degrossi O. J. y Pisarev M. A. eds. , CNEA, 1977.

Kleiman de Pisarev, Pisarev M. A. y Spaulding S. W.

Early effects of TSH on RNA polymerase in the dog thyroid

Reunión anual de la American Thyroid Association, Portland, Oregon, USA, Sept 13-15, 1978, pag 27.

Aceptado para su publicación en Endocrinology, (1978).

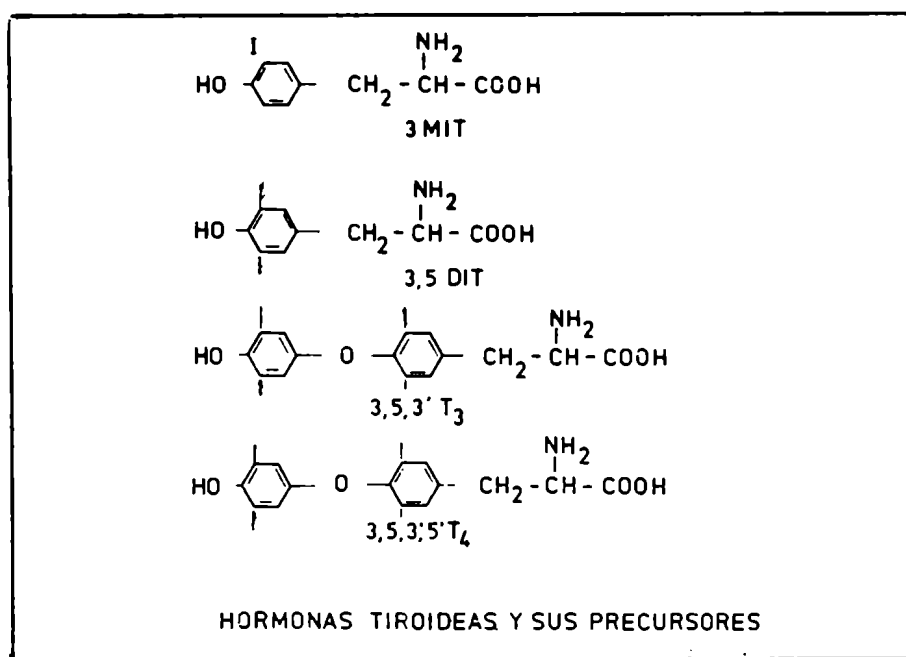
ABREVIATURAS

ADN	: ácido desoxirribonucleico
AMP _c	: adenosin 3',5' monofosfato cíclico
APC	: ácido perclórico
ARN	: ácido ribonucleico
ARN _m	ácido robonucleico mensajero
ARN _r	: ácido ribonucleico ribosomal
ARN _{hn}	ácido ribonucleico heterogéneo nuclear
ARN _t	ácido ribonucleico de transferencia
ATP	: adenosina 5' trifosfato
ATA	: ácido tricloroacético .
BSA	: albúmina de suero bovino
CMP _c	: citidin 3'5' monofosfato cíclico
DBC _{GMP_c}	: dibutiril GMP _c
DTT	ditiotreitól
DBC	dibutiril AMP _c
FDE	: fosfodiesterasa
GMP _c	: guanosin 3'5', monofosfato cíclico
LH	hormona luteinizante
KRB	: Krebs Ringer bicarbonato
MMI	: metilmercaptoimidazol
PTU	: propiltiouracilo

PRPP	: fosforribosilpirofosfato
PGs	: prostaglandinas
PMSF	: fluoruro de fenil metil sulfonilo
TETRAC	: ácidotetrayodotiroacético
TRLAC	: ácido triyodotiroacético
T ₃	: L-3, 5, 3' triyodotironina
T ₄	: tetrayodotironina o tiroxina
T ₂	: L-3, 5, diyodotironina
Tetraprop	: tetrayodopropiónico
Tripprop	: ácido triyodopropiónico
SDS	: dodecilsulfato de sodio
Tg	: tiroglobulina
TSH	: tirotrofina
D. S.	: desviación standard

INTRODUCCION

La glándula tiroidea está constituida por la suma de innumerables folículos que constituyen su unidad funcional. La tiroides tiene importantes funciones en la regulación del crecimiento, maduración neuromuscular, oxidaciones celulares, etc, que la hacen de suma importancia en el mantenimiento de la normal funcionalidad de los seres vivos. Estas acciones son ejercidas mediante la síntesis y liberación al torrente circulatorio de sus hormonas. Las hormonas tiroideas son aminoácidos yodados: la tiroxina o tetrayodotironina (T₄) y la triyodotironina (T₃).



Las mismas son sintetizadas en la tiroides por la incorporación del yoduro a los grupos tirosilos de la molécula de tiroglobulina.

METABOLISMO DEL YODO

La tiroides posee la capacidad de concentrar en su interior el yodo circulante, mediante un mecanismo activo a nivel de la membrana celular, caracterizado como bomba de yodo. Es así que la tiroides acumula el yoduro logrando que en condiciones normales la concentración intratiroidea sea 20-25 veces la del plasma. Se desconoce aun la naturaleza exacta del sistema de transporte activo del yodo, habiéndose postulado a las lecitinas de la membrana celular como las sustancias transportadoras. Los iones perclorato y tiocianato son capaces de inhibir la captación activa del yoduro por la tiroides, determinando la descarga del yoduro aún no organificado. El yoduro captado por la tiroides, es organificado permaneciendo solo una pequeña proporción en forma inorgánica, 1 a 2 % del total.

La organificación tiene lugar en los grupos tirosilo de la tiroglobulina, dando lugar a la formación de monoyodotirosina (MIT) y diyodotirosina (DIT). Para poder reaccionar, el yoduro debe ser activado mediante oxidación, proceso en el cual juega un importante papel una peroxidasa en presencia de H_2O_2 . Se acepta actualmente que las hormonas tiroideas (T_3 y T_4) se forman por el acoplamiento de las yodotirosinas (MIT y DIT), pero se desconoce aún su mecanismo.

Existen ciertas drogas tíoderivados capaces de impedir la formación de hormonas tiroideas. Entre las más importantes figuran la tiourea, el tiouracilo, metiltiouracilo, propiltiouracilo, y metilmercapto-

imidazol. Por otra parte, variaciones del aporte de yodo a la glándula determinan cambios en la biosíntesis de sus hormonas.

La administración de dosis progresivas de yodo determina un aumento concomitante de la cantidad de yodo organificado presente en la glándula. Si se continúa aumentando la dosis de yodo, se produce una estabilización en la organificación, seguida a dosis mayores de un bloqueo de la misma conocido como efecto Wolff Chaicoff (1948).

Una vez completada la biosíntesis de las hormonas, la tiroglobulina (Tg) que las contiene es almacenada en la luz del folículo constituyendo la sustancia coloide. La secreción de las hormonas tiroideas requiere la pinocitosis de la Tg, constituyendo las gotas de coloide intracelular, que posteriormente se fusionan con los lisosomas produciéndose la hidrólisis de la Tg y la liberación de T_3 y T_4 a la circulación.

REGULACION DE LA FUNCION TIROIDEA

La tiroides e hipófisis coexisten en un equilibrio dinámico, mutuamente balanceado. El lóbulo anterior de la hipófisis, mediante la TSH, estimula la función tiroidea. Esta glándula, a su vez, a través de sus hormonas T_3 y T_4 , actúa frenando la síntesis y secreción de TSH. Vale decir que ambas glándulas modulan un estado de equilibrio, mediado por sus hormonas: TSH, T_3 y T_4 .

A un aumento de las yodotironinas circulantes, responde la hipófisis con una disminución del nivel de TSH, en tanto que cuando se pro-

duce una disminución del nivel de hormonas tiroideas suéricas(carencia de yodo, drogas antitiroideas, lesiones de la glándula por inflamación, radiación, etc,) la hipófisis responde con un aumento de la secreción de TSH, tendiente al restablecimiento del equilibrio perdido . A su vez la actividad hipofisaria, se encuentra bajo control hipotalámico, a través de la hormona liberadora de TSH, la TRH o TSH releasing hormone

Sin embargo, este no es el único sistema de regulación de la función tiroidea. Merecen a si mismo mencionarse el yoduro, el sistema neurovegetativo, las hormonas sexuales, los glucocorticoides, etc. Por otra parte existen evidencias sobre el funcionamiento de un sistema autorregulatorio tiroideo.

AGENTES ESTIMULANTES DE LA TIROIDES

La TSH es una glicoproteína de PM 28000 daltons, en los que comprende un 15 % de hidratos de carbono. Esta hormona ha demostrado regular prácticamente cada uno de los pasos metabólicos que ocurren en la tiroides.

La falta de TSH determina una disminución de la captación tiroidea de yodo y de su organificación, así como de la secreción de hormonas tiroideas. La administración de TSH produce los efectos contrarios. También la TSH regula los mecanismos bioquímicos relacionados con la función celular per se, (metabolismo de la glucosa, respiración, biosíntesis de ácidos nucleicos y proteínas, fosfolípidos, etc).

La especificidad de la acción de la TSH sobre la tiroides se debe a la interacción de la hormona con receptores ubicados en la membrana celular (Lissitzky y col 1973 , Manley y col 1974 , Moore y Wolff 1974) . Como consecuencia de esta reacción se activa por mecanismos no aclarados aún, la adenilato ciclasa, con formación de AMPc (Pochet y col. 1974, Boeynaems y col 1974,). Este compuesto llamado segundo mensajero de la acción hormonal (Sutherland), es el responsable de muchos de los efectos de la TSH sobre la glándula. Esta función se cumple mediante la activación de una familia de enzimas , las proteína quinasa. Estas enzimas están formadas por 2 subunidades, una catalítica y otra regulatoria. Mientras ambas están unidas, la enzima permanece inactiva. Al interactuar el AMPc con la porción regulatoria, esta se separa de la subunidad catalítica, la que se activa y fosforila los diferentes sustratos, utilizando para ello el ATP (Dumont 1971, Spaulding y Burrow 1974, Swillems y col 1974). Aún no se conocen cuales son los sustratos naturales de estas enzimas. Por otra parte la concentración intracelular de AMPc está regulada por la enzima encargada de su degradación, la fosfodiesterasa, que lo transforma en 5' AMP. Las metilxantinas (cafeína, teofilina, teobromina), inhiben esta enzima y potencian la acción del AMPc.

El AMPc reproduce tanto los efectos agudos (Bamstomsky y col 1967,

Wilson y col ,1968, Rodesch y col. 1969), así como los crónicos (Pisarev y col. 1970) de la TSH sobre la tiroides.

Pisarev y col (1970)^a, demostraron que la administración crónica de AMPc a ratones tratados con T_4 , producía un aumento en el contenido total de proteínas y en el peso de la tiroides, aunque la imagen histológica no era igual a la obtenida con TSH. También Rodesch y col. (1969) encontraron que los efectos estimulatorios del DBC y del AMPc sobre algunos parámetros, como oxidación de glucosa y organización del yoduro, han sido siempre menores que los correspondientes efectos de la TSH. Una explicación sería que el AMPc no fuera único en la mediación de la acción de la TSH, y otros nucleótidos fueran necesarios para algunos de los efectos de la hormona. Otra explicación sería que se necesitaran dosis mayores del nucleótido para obtener los mismos efectos que con TSH. La posibilidad que la guanosina monofosfato cíclica (GMPc) pudiese estar involucrada en la regulación de la biosíntesis de proteínas en tiroides, fue sugerida por Pisarev y col. (1971a), quienes encontraron en estudios "in vivo" que el GMPc estimulaba la incorporación de radioleucina a proteínas, así como el contenido total de las mismas y el peso de la tiroides. Similares resultados obtuvieron Macchia y Varrone (1971) estudiando "in vitro" el efecto estimulatorio de DBAMPc y de DBGMPc, sobre la síntesis de proteínas, y DeNayer (1973) en un sistema acelular de tiroides. La enzima guanilato ciclasa, catali-

zadora de la formación de GMPc, ha sido demostrada en tiroides de rata (Barmasch y col, 1973). El GMPc también activa las proteína-quinasa preparadas de varios tejidos, incluyendo tiroides (Kuo y col, 1969) 1970a), aunque no está aclarado si estas enzimas son diferentes de las sensibles al AMPc. La existencia de proteína-quinasa en tiroides dependientes de GMPc, sugeriría un medio paralelo por el cual otra sustancia que la TSH podría regular la función tiroidea. Aparte de esta escasa información poco se conoce acerca del rol del GMPc en este tejido. Van Sande y col (1975a) demostraron que en la tiroides, el AMPc por un lado y el GMPc y/o Ca^{++} por el otro, pueden tener efectos similares y opuestos, lo que concuerda con los efectos encontrados sobre síntesis de proteínas por Pisarev y col. (1971 a). Mas recientemente se ha demostrado en tiroides, confirmando observaciones similares en otros tejidos, que el GMPc es capaz de estimular la hidrólisis del AMPc, actuando sobre la FDE correspondiente (Dumont y col, 1977). Esto ha llevado a postular que en determinadas circunstancias (excesivo aumento del AMPc), el GMPc puede actuar como antagonista del AMPc. Por otra parte si bien ambos nucleótidos tienen acciones paralelas, su regulación es diferente. La TSH regularía solo el AMPc, en tanto que el sistema colinérgico tendría a su cargo el nivel de GMPc (Yamashita y Field, 1972). Estos autores y Van Sande y col (1975a) demostraron que ciertos agentes, como la carbamilcolina, el FNa, el ClK

y el Ca^{++} en presencia del ionoforo A23187, aumentan la acumulación de GMPc y activan la oxidación de la glucosa y la unión del yoduro a proteínas. Estos agentes disminuyen la acumulación de AMPc y la secreción hormonal en cortes de tiroides estimulados por TSH.

El hecho de que el Ca^{++} en presencia de ionoforo A23187, aumenta la acumulación de GMPc, y que los agentes que también aumentan los niveles de GMPc, como la carbamilcolina y el FNa, no tienen efecto en cortes de tiroides deficientes en Ca^{++} , darían validez a la hipótesis de Schultz y col. (1973) de que los niveles intracelulares de Ca^{++} podrían regular la acumulación de GMPc, el cual produce varios efectos metabólicos. Sin embargo debería señalarse que no hay aún argumentos que liguen los niveles de GMPc aumentados con los otros efectos.

PROSTAGLANDINAS

Aunque el tejido tiroideo es una rica fuente de prostaglandinas, se desconoce aún el significado de este hecho. El precursor de la síntesis de las PGs es el ácido araquidónico, que puede originarse ya sea de fosfatidilinositol o de triglicéridos. La liberación del araquidonato ocurriría a expensas de dos reservorios diferentes de precursores, los fosfolípidos, particularmente fosfatidilinositol, y los triglicéridos, por dos mecanismos diferentes e independientes. De los fosfolípidos (fosfatidilinositol), el araquidonato es liberado por acción de una fosfolipasa A₂ estimulada por TSH a través de un proceso en el cual el AMPc no estaría involucrado. De los triglicéridos, el araquidonato es liberado por un a

lipasa AMPc dependiente. Sería posible entonces distinguir dos "pools" de PGs. Uno que sería pre-AMPc y que no necesitaría de la presencia de este nucleótido, y otro que sería post-AMPc y que sería una consecuencia de la activación de la adenilato ciclasa (Haye y col. 1974). Por otro lado el AMPc o el DBAMPc podrían incrementar la actividad de la prostaglandina sintetasa.

Las PGs reproducen algunos de los efectos de la TSH sobre la tiroides, incluyendo la activación del sistema adenilato ciclasa-AMPc (Field y col, 1971; Kaneko y col, 1969). La activación de la adenilato ciclasa por PGs ha sido observada en homogenados de tiroides de perro por Ahn y Rosenberg (1970) y Field y col (1971), y en mitocondrias de tiroides ovina por Burke (1970b). Este último autor observó que agregando IN_a al sistema estimulado por TSH o PGE_1 , (Burke, 1970a), se inhibía la activación de la adenilato ciclasa. También Van Sande y Dumont (1973) encontraron que la PGE_1 aumentaba el contenido de AMPc basal y estimulado por TSH. Burke (1970 a) observó que la PGE_1 , así como la TSH y el DBC aumentaban la producción de $^{14}CO_2$ a partir de glucosa-1- ^{14}C , siendo este efecto abolido por el agregado de IN_a .

Kuehl y col (1970, 1971), propusieron la hipótesis según la cual las PGs representan un paso intermedio en la estimulación hormonal de la adenilato ciclasa:

$$\text{Hormona} \longrightarrow \text{PGs} \longrightarrow \text{AMPc}$$

Sato y col. (1972) sostienen esta teoría en base a la inhibición producida en el efecto estimulador de TSH, PGE_1 y PGE_2 sobre la formación

de AMPc, por los ácidos 7-oxa-13-prostanoico (PY₁) y 7-oxa-15-hidroxi-13-prostanoico (PY₂), análogos estructurales de la PGE. Si el esquema propuesto por Sato y col (1972) fuera cierto, entonces la inhibición de la síntesis de PGE y PGF por indometacina, un inhibidor de la prostaglandina sintetasa, aboliría la respuesta del tejido tiroideo a la TSH.

Burke (1972) encontró que la indometacina y la aspirina inhibían el aumento de las PGs inducido por TSH. Contrariamente a estos resultados en el laboratorio de Wolff y Moore (1973), se encontró que la indometacina no afectaba la estimulación por TSH de la oxidación de glucosa-1-¹⁴C, la secreción hormonal y la actividad de la adenilato ciclasa, concluyendo que la síntesis de PGs no constituye un paso obligatorio en la respuesta del tejido tiroideo a la TSH. Este punto de vista está fortalecido por el hecho que membranas plasmáticas purificadas responden perfectamente a la estimulación por TSH, aunque la síntesis de PGE requiere la participación de componentes microsomales (Burke, 1972). También Mashiter y col (1974) demostraron que la aspirina y la indometacina no inhibían el efecto estimulador de la TSH sobre la formación de AMPc, o la oxidación de glucosa, concluyendo que las PGs no serían intermediarias esenciales en los efectos de la TSH. Es de esperar que futuros estudios aclaren este aspecto de la función tiroidea.

AGENTES NEUROTRANSMISORES Y FNa

Varios autores han observado que el FNa estimula la adenilato

ciclase en tiroides (Pastan y col, 1968), así como en otros tejidos, y en preparaciones acelulares (Pastan y col, 1968; Sutherland y col, 1962, 1968; Zor y col, 1969 b). El mecanismo de la activación de la adenilato ciclase por FNa no se conoce aún con certeza, pero, aparentemente este compuesto no tiene efecto sobre el nivel de AMPc en cortes de tiroides (Sutherland y col, 1968; Kaneko y col, 1969). Por otra parte el FNa aumenta rápidamente la concentración de GMPc en cortes de tiroides (Yamashita y Field, 1972). Sin embargo, este efecto del FNa sobre la concentración de GMPc parece ser inconstante. White y Aurbach (1969) observaron que los efectos del fluoruro varían de un tejido a otro.

El FNa reproduce algunos efectos de la TSH, tales como la estimulación de la oxidación de glucosa y la organificación del yodo.

Hay evidencias acumuladas de que el estímulo del sistema simpático influye en la actividad de la tiroides, por efectos dentro de la glándula.

Los impulsos nerviosos son transmitidos por mediadores químicos liberados en las terminaciones nerviosas. La norepinefrina o noradrenalina es liberada por el sistema simpático, mientras que la acetilcolina es el mediador químico del sistema parasimpático. Existen un número de drogas cuyas acciones mimetizan los efectos estimulatorios de partes del sistema nervioso autónomo, mientras que otras drogas bloquean estos mismos efectos. En ratones cuya secreción de TSH ha sido eliminada, la administración de noradrenalina induce la secreción de hormonas tiroideas. (Melander 1971, Melander y col, 1972, 1975).

Tanto la TSH como las catecolaminas estimulan la adenilato ciclasa tiroidea, y este efecto es reproducido por el DBC. El efecto estimulatorio de las catecolaminas sobre la tiroides es anulado por drogas que bloquean los receptores adrenérgicos (Maayan, 1968, Maayan e Ingbar, 1970, Melander y col, 1975). Por otra parte, el polifloretilfosfato, una droga que es antagonista de las PGs, inhibe el efecto estimulatorio de TSH sobre la secreción hormonal, no así el de la noradrenalina, (Melander y col. 1973).

Ciertas acciones de la TSH son inhibidas por bloqueantes de tipo alfa adrenérgico, en tanto que otras lo son por bloqueantes de tipo beta. Varios efectores alfa-adrenérgicos han sido descriptos como positivos en algunas especies y negativos en otras (Melander y col, 1974; Marshall, 1976; Maayan y col, 1977). Hay evidencias que los efectos hormonales sobre lipólisis en tejido adiposo están mediados a través de la estimulación de la adenilato ciclasa y la generación de AMPc. Ya que muchos de estos efectos son inhibidos por bloqueantes alfa y beta adrenérgicos (Butcher y Sutherland 1967, Fain y col 1966), se sugirió que la adenil ciclasa del tejido adiposo podría estar ligada a un receptor adrenérgico (Turtle y Knipnis, 1967).

Levey y col (1969) observaron que el D-L-propranolol (beta-bloqueante) y la fentolamina (alfa bloqueante) inhiben la activación por TSH de la adenilato ciclasa canina y bovina en homogenados de tiroides, pero

el hecho de que el D-propranolol, que tiene 1/16 de la actividad beta adrenérgica bloqueante de la forma racémica, bloquea a la adenilato ciclasa, sugiere un mecanismo diferente del que implique alfa y beta receptores. También, en este caso, las concentraciones requeridas son 100 veces mayores que aquellas que producen bloqueos de tipo alfa o beta adrenérgicos (Blinks, 1967). Todos estos resultados contradictorios no han permitido una conclusión acerca del tipo de receptor involucrado en la acción de TSH.

La acetilcolina, el mediador químico del sistema parasimpático, aumenta los niveles de Ca^{++} en la tiroides de perro, aumentando los niveles de GMPc, la iodinación de proteínas y disminuyendo la acumulación de AMPc (Van Sande y col, 1975a). La acetilcolina también estimula la oxidación de glucosa (Pastan y col, 1961) y la incorporación de ^{32}P a fosfolípidos en cortes de tiroides. Pero dado que la información sobre el rol del GMPc sobre estos parámetros aún no está aclarado, no se sabe con certeza si los efectos de la acetilcolina sobre los mismos pueden ser atribuidos a la acción del GMPc. Estos resultados no aclaran el mecanismo por el cual la acetilcolina y el FNa ejercen sus efectos, pero indican que el control de AMPc y de GMPc en tiroides es diferente.

AGENTES INHIBIDORES

EFECTO DEL EXCESO DE YODO

Se ha observado en pacientes tratados con solución de Lugol una disminución del tamaño del bocio, así como una mejoría de los síntomas

del hipertiroidismo. Estudios experimentales han demostrado que el IK disminuye marcadamente la respuesta estimuladora de la TSH, AMPc y GMPc sobre el crecimiento tiroideo, el contenido de proteínas y la incorporación de radioleucina a proteínas (Pisarev e Itoiz, 1972). En forma similar, Sherwin y Tong (1975) demostraron, en un sistema de células aisladas, que el exceso de yoduro disminuye la estimulación producida por la TSH sobre la incorporación de radioyodo a proteínas, con efecto supresivo sobre la bomba de yodo (Sherwin y Tong, 1974). Trabajos "in vitro" han demostrado que esta acción se ejerce directamente sobre la tiroides, afectando la síntesis de la tiroglobulina y de otras proteínas tiroideas (Pisarev y Aiello, 1976). En este mismo sentido cabe destacar que en pacientes tratados con aceite yodado se demostró una disminución del ARN tiroideo (Nicolau y col, 1974). Estas acciones del yoduro, así como otras sobre diferentes parámetros, son bloqueadas por el perclorato, el propiltiouracilo y el metilmercaptoimidazol (Green, 1970; Burke, 1970a, Van Sande y col 1975b, Pisarev y Aiello, 1976). Así por ejemplo, Dumont (1961, 1965) demostró un efecto estimulador del IK sobre la oxidación de glucosa-1- ^{14}C , sin el agregado de TSH, siendo esta acción completamente inhibida por el MMLA. Similares resultados llegaron Green (1970) y Burke (1970a) estudiando el efecto estimulador del yoduro sobre el consumo de oxígeno, oxidación de glucosa y piruvato. Por otra parte, el yoduro inhibe el aumento de AMPc inducido por TSH. Este efecto ha sido demostrado "in vitro", en homogenados de tiroides (Burke, 1970a),

en cortes de tiroides (Van Sande y col, 1975b) (Van Sande y col, 1973), en células aisladas (Sherwin y Tong, 1975), en lóbulos de tiroides (Rapoport y col, 1976), así como "in vivo" en animales hipofisectomizados (Rapoport, 1975). Tanto el MMI como el PTU previenen esta acción inhibitoria del yoduro. Este hallazgo indica que el yoduro no actúa "per se" sino mediante una forma intracelular y organizada. Esto concuerda con la demostración de efectos similares a los del yoduro por las yodotironinas (Pisarev y Aiello, 1976). Takasu y col. (1974) demostraron en experimentos "in vitro" el efecto inhibitorio de T_3 y T_4 sobre la acumulación de AMPc producido por la TSH. Resultados similares obtuvieron Gafni y col (1975) quienes estudiaron el efecto de la administración "in vivo" de T_3 sobre la estimulación por TSH de la formación de AMPc "in vitro". Un efecto similar de T_3 y T_4 , "in vivo" e "in vitro", sobre la generación de AMPc ha sido observada por Yu y col (1976). Los trabajos de Yu y col, 1976, Takasu y col. 1974, y Gafni y col. 1975, sugieren la existencia de un mecanismo de retroinhibición, supercorto, "feedback", mediado por las hormonas tiroideas. Sin embargo ha habido desacuerdo, en cuanto a si el mecanismo de retroinhibición, se ejerce en una etapa anterior o posterior a la generación de AMPc inducida por TSH.

En el trabajo de Friedman y col. 1976, se presentan evidencias que la T_4 inhibe directamente la actividad de la adenilato ciclasa tiroidea, pero también bloquea el efecto estimulador del DBC.

Van Sande y col. 1975 b, observaron que el efecto estimulador de TSH, mediado por AMPc, sobre la secreción de yodotironinas, oxidación de glucosa y formación de lactato, era inhibido por yoduro, pero no por yoduro mas MMI, sugiriendo que un agente intracelular, resultante de la oxidación de yoduro, actúa sobre el sistema generador de AMPc. Similares acciones, cuando eran provocadas por DBC, no eran inhibidas por yoduro. Sin embargo Pisarev e Itoiz, 1972, demostraron que el IK es capaz de inhibir la estimulación provocada por TSH, AMPc y GMPc sobre la biosíntesis de proteínas. Similares resultados fueron observados al estudiar la secreción de hormonas tiroideas "in vivo" por otros autores (Yamamoto y col. 1972, Ochi y De Groot, 1970). Estos resultados sugieren que el yoduro actúa en un paso distal a la formación de AMPc. Resumiendo, podríamos decir que el principal efecto del exceso de yoduro sería la anulación de ciertos metabolismos tiroideos, basales o estimulados por TSH, tales como la producción de AMPc, la activación de la bomba de yodo, la actividad yodinante (organificación del yodo,) así como la síntesis de proteínas. Como los efectos del yoduro son bloqueados por drogas que inhiben los procesos de yodinación intratiroidea, se ha postulado que el yoduro actuaría a través de un compuesto organificado. Estos resultados estarían de acuerdo con la hipótesis de Halmi(1956) de que las acciones autorregulatorias del yoduro estarían mediadas por algún aspecto de la actividad yodinante.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos por otros autores, y en nuestro laboratorio, y con el objeto de profundizar en el conocimiento del mecanismo de la acción del yoduro sobre la inhibición de la síntesis de proteínas tiroideas, es que encaramos el estudio de los efectos del yoduro sobre la síntesis de ARN.

SINTESES DE ARN EN EUCARIOTES

La transcripción del ADN ocurre principalmente en el núcleo. Los diferentes tipos de ARN (ARNt, ARNr y ARNm) son sintetizados como precursores de alto peso molecular, que son procesados luego para producir las moléculas biológicamente activas (Perry, 1976). Las hormonas podrían actuar en los procesos de pretranscripción, transcripción (iniciación, elongación o terminación), en la síntesis de precursores de ARN, o bien podrían actuar a nivel posttranscriptacional, en el procesamiento del ARN. Otro sitio de acción hormonal sería la alteración de la actividad de templado de la cromatina. Estas acciones serían secundarias a modificaciones en las proteínas nucleares (Davidson y Britten, 1973; Elgin y Weintraub, 1975; Johnson y col, 1974), ya sea por fosforilación, acetilación o metilación. Todos estos procesos podrían estar ligados a acciones hormonales. Las ARN polimerasas son las enzimas responsables de la transcripción del ADN, siendo probablemente instrumentos de la regulación hormonal de este proceso. Existen al menos tres clases de ARN polimerasas nucleares. La ARN polimerasa I, nucleolar, es responsable de la síntesis

del precursor de alto peso molecular(45 S) del ARNr, y es resistente al octapeptido alfa-amanitina. La ARN polimerasa II se encuentra en el nucleoplasma y está relacionada con la síntesis del ARN-hn, precursor del ARN-m. Esta enzima es inhibida por pequeñas dosis de alfa-amanitina. La ARN polimerasa III también está en el nucleoplasma y se relaciona con la síntesis de precursores del ARN-t y del ARN-r de bajo peso molecular(5 S), siendo inhibida por altas dosis de alfa-amanitina. Los mecanismos precisos por los cuales las hormonas pueden regular la transcripción del ADN nuclear no son aún bien comprendidos. Tanto la activación genética(derepresión) como la inactivación(represión) podrían ocurrir bajo la influencia de hormonas específicas(Nyberg y Wang, 1976).

ACCION DE LA TSH SOBRE EL METABOLISMO DE LOS RIBONUCLEOTIDOS Y ACIDOS NUCLEICOS EN TIROIDES

La estimulación crónica de la tiroides por TSH determina un aumento del número de células tiroideas y de la masa celular, así como del ARN tiroideo, (Matovinovic y Vickery, 1959). La estimulación aguda por TSH determina, en algunas horas, un aumento del ARN tisular, (Creek, 1965, Kerkoff y Tata, 1967), sin cambios en el DNA(Fiala y col. 1957). Tal efecto podría ser explicado por una estimulación de la síntesis de ARN, una inhibición de la degradación o por una combinación de ambos mecanismos. Lamy y col(1971)demostraron que el ritmo de degradación del ARN no se altera en presencia de TSH. En cuanto al efecto sobre las etapas

pretranscriptacionales de ARN son numerosos los estudios realizados. Hall (1962, 1963), Hall y Tubmen (1965), encontraron que en cortes de tiroides bovina la TSH aumentaba la incorporación de precursores marcados como formato, glicina y adenina a nucleótidos purínicos de ARN, y de la fracción ácido soluble que contiene los nucleótidos precursores. Estos autores proponían que la estimulación por TSH de la síntesis de ARN ocurriría a través de un aumento de la disponibilidad de ribosa para la producción de nucleósidos precursores, siendo la ribosa generada como un producto del metabolismo aumentado de la glucosa a través del ciclo de las pentosas. Lindsay y col (1969) observaron la estimulación por TSH de la incorporación de ácido orótico a ARN en cortes de tiroides bovina. Estos autores proponían que este efecto se debía a un aumento del aporte de ribosa-fosfato, en forma similar a lo que proponía Hall (1963) para la síntesis de nucleótidos purínicos. Lindsay y col (1969) concluyeron que estos hallazgos no indicaban necesariamente un aumento en la síntesis de ARN, sino que podría deberse a un aumento de la radiactividad específica de los precursores. También Lamy y col (1971) observaron que la estimulación por la TSH de la incorporación de ^3H -uridina a ARN estaba relacionada con un aumento paralelo de la radiactividad ácido soluble, que contiene los nucleótidos precursores de ARN. Kerkoff y Tata (1969) observaron que la TSH agregada a cortes de tiroides de cerdo, aumentaba la incorporación de ^{32}P a ARN. También en cortes de tiroides

porcina, Adiga y col(1971) observaron que la TSH producía un aumento de la incorporación de ^3H -uridina a ARN. Estos efectos eran reproducidos por DBC y, en menor grado, por AMPc. En forma similar, Wilson y Wright(1970) encontraron que la TSH aumentaba la incorporación de ^{14}C -uridina y de ^{14}C -adenina a ARN.

Adiga y col(1971)encontraron en núcleos aislados de cortes de tiroides porcina, que la TSH estimula la actividad transcripcional expresada como actividad de ARN polimerasa Mg^{++} o Mn^{++} dependiente.

Sin embargo , la demostración de transcripción aumentada, aunque es un indicio de una acción de la TSH sobre este proceso, no nos aclara la forma en que la hormona actúa. Podría ser aumentando la disponibilidad del templado o estimulando la actividad de las polimerasas. Nuestros estudios sobre la transcripción en tiroides canina, contribuyen a aclarar este aspecto.

ACCION DE OTRAS HORMONAS POLIPEPTIDICAS SOBRE LA SINTESIS DE ARN

En esta revisión solo se hará referencia a los resultados obtenidos con hormonas polipeptídicas ya que la TSH es una de ellas.

Varios procesos de importancia, en el crecimiento y desarrollo, estan mediados por hormonas, muchas de las cuales son polipeptídicas (de crecimiento, prolactina, gonadotrofinas, eritropoyetina, etc). Las respuestas del tejido efector pueden dividirse en rápidas y lentas. Estas últimas están relacionadas con la hipertrofia y maduración del tejido. Gran parte de las respuestas rápidas a las hormonas están mediadas

por el AMPc(Robinson y col,1971), aunque recientemente se ha sugerido que cambios en las relaciones entre AMPc y GMPc pueden ser más cruciales a las respuestas tempranas que la concentración absoluta del AMPc intracelular(Pliano y col,1973;Goldberg y col,1974). Las respuestas lentas están relacionadas con el crecimiento celular, síntesis de proteínas específicas, como es el caso de las proteínas de la leche para la glándula mamaria, o la tiroglobulina para la tiroides. Estas respuestas tardías dependen de una estimulación de la síntesis de ARN, lo que no ocurre con las respuestas tempranas(Sherwin y Tong,1976). La formación de células diferenciadas, que es en algunos tejidos, hormono-dependiente, está asociada con la síntesis de especies de ARN hibridizables en el núcleo(Turkington,1970). Este autor demuestra que la insulina y la prolactina producen un aumento en la velocidad de la marcación isotópica del ARN pre-ribosomal y del heterogéneo nuclear. En experimentos realizados con hormona de crecimiento, en ratas hipofisectomizadas, Tata(1976) observó un marcado aumento en la capacidad nuclear de síntesis de ARN. Esta tiene lugar antes que se llegue a un máximo en el aumento de la actividad de síntesis de proteínas. Por su parte, la hormona gonadotrófica estimula la síntesis de proteínas y ácido ribonucleico en ovario de ratas inmaduras(Fiala y col,1957;Blackburn y col,1965;Callantine, y col,1965;Civen y col,1966;VanDyke y col,1968). Jungmann y Scweppe(1972b), demostraron que la inyección de gonadotrofina corio-

nica aumenta la disponibilidad de templado(cromatina) de ovario para la transcripción. Estos mismos autores han mostrado que la síntesis de proteínas nucleares, básicas y ácidas, así como sus modificaciones por fosforilación y acetilación, es estimulada por la gonadotropina coriónica. Se acepta actualmente que la fosforilación de algunas proteínas no histónicas de la cromatina podría estar vinculada a la regulación de la actividad de templado de la misma(Alfrey, 1971; Jungmann y Schweppe, 1972a). Es un hecho interesante que la fosforilación de proteínas sea uno de los efectos principales de los nucleótidos cíclicos. Esto plantea un interrogante acerca del papel que juegan las alteraciones en las concentraciones intracelulares de AMPc y GMPc en la síntesis de ARN y proteínas.

Jungmann y col, (1974) purificaron parcialmente y caracterizaron una proteína-quinasa dependiente de AMPc, en el citosol de ovario bovino. Esta preparación activaba y posiblemente fosforilaba las ARN polimerasas I y II de núcleos de ovario. Estos resultados sugieren que el AMPc y las proteína-quinasas juegan un importante papel en el control hormonal de la síntesis de ARN nuclear, a través de la regulación, y tal vez de la fosforilación, de las ARN polimerasas.

La estimulación hormonal de la actividad de las ARN polimerasas nucleares ha sido descripta en varios tejidos eucarióticos(Farese, y Schnure, 1967, Blatti y col. 1970, Adiga y col. 1971, Jungmann y Schweppe,

1972 b, Piantadosi y col. 1976).

Un hecho interesante en el aumento temprano de la actividad de la ARN polimerasa en hígado de ratas estimuladas por la hormona de crecimiento, es el paralelismo entre la estimulación de esta enzima y el de la enzima ornitina decarboxilasa, responsable de la síntesis de poliaminas (Raina y Janne, 1970; Snyder y Russell, 1970; Korner y Hogan, 1971). Estos compuestos pueden afectar la actividad de la ARN polimerasa. (Mandel y Chambon, 1974; Janne y col, 1975).

MATERIALES Y METODOS

MATERIALES

TSH, Thytropar, Armour

TSH-B₆ - National Pituitary Agency, USA.

ARN de levadura, Sigma Chemical Co, USA

Omnifluor, New England Nuclear, USA.

Nucleótidos cíclicos, Sigma Chemical Co. , USA.

Actinomicina D, obsequio de laboratorios Merck, Sharp & Dhome, USA.

Protosol , New England Nuclear, USA.

Filtros de micro fibra, de vidrio, Whatman GF/C.

Aquasol , New England Nuclear.

Alfa amanitina „ Sigma.

Poly (dA-dT), Boehringer- Mannheim.

Tiroxina y triyodotironina, donación de Laboratorios Glaxo, Argentina.

Prostaglandinas(E₁, A₁, F₁α, y F₂α), donación de Upjohn Co, Michigan, USA

Indometacina, obsequio de laboratorios Merck, Sharp & Dhome, Argentina.

Aspirina, obsequio de Farmasa S. A. , Argentina.

TRIAQ, TETRAC, Diyodotironina, isopropil- T₃, e isopropil- T₂, donación de laboratorios Smith, Kine & French, USA.

Los otros productos químicos utilizados, eran drogas pro- análisis.

Productos radiactivos:

¹³¹I : libre de portador, Comisión Nacional de Energía Atómica, Argentina.

¹²⁵I : libre de portador, CEA- Sorin , Francia

5-³H- Uridina : actividad específica, 28.3 Ci/m mol, y 5-15 Ci/ m mol,
New England Nuclear, USA.

³²P : como fosfato, Comisión de Energía Atómica, Argentina.

Inulina-³H-G. : actividad específica , 103.9 mCi/g, New England Nuclear,
USA.

4, 5 ³H- leucina : actividad específica, 44.2 Ci/ m mol, New England Nu-
clear, USA.

COMPOSICION DEL MEDIO DE INCUBACION

Krebs- Ringer bicarbonato (Krebs y col. 1932)

ClNa 124 mM, ClK 5 mM, SO₄Mg 1, 25mM , Cl₂Ca 1, 45 mM , PO₄KH₂
1, 25 mM, CO₃HNa 25, 3 mM, Tris-HCl, pH 7, 4mM.

OBTENCION DEL TEJIDO

1- Bovino

Las tiroides eran obtenidas en mataderos locales, inmediatamente después de la muerte del animal y transportadas hasta el laboratorio en solución salina isotónica (Cl Na 8, 5%) o buffer Krebs-Ringer bicarbonato, pH 7. 4, a 4°C. Cada lóbulo fue disecado, luego se prepararon cortes de tejido, con un micrótopo manual tipo Stadie-Riggs (A. Thomas U. S. A.). Cada corte de tejido tenía un peso húmedo entre 40-80 mg. Si bien los cortes se preparaban a 0°C se encontró que con los cortes obtenidos a 20°C los resultados eran similares.

2- Canino

En los estudios con tiroides caninas, se usaron perros de 12-19 kg. de peso, pretratados por vía oral durante dos días con 130 mg. de tiroides desecada. Este tratamiento se efectuaba para poner la tiroides en reposo por supresión, a nivel de la hipófisis, de la secreción de tirotrófina. La mitad de los animales fue inyectado con 10U. I. de TSH por vía intravenosa. Las tiroides se sacaban 90 minutos mas tarde, bajo anestesia por pentotal y eran rápidamente cortadas con tijera y homogeneizadas.

OBTENCION DE FRACCIONES SUBCELULARES

Preparación de núcleos aislados

La obtención de fracciones subcelulares exige la ruptura de la membrana celular. En nuestros experimentos esto se lograba por homogenización del tejido en una solución de sacarosa 2,1 M en TRIS-ClH 50mM, pH 7,4; Cl₂ Mg 1mM, PMSF 0,5 mM y DTT 1 mM en una relación (1:5 p/v).

Para ello se empleaba un homogenizador de teflón tipo Potter Elvehjem, accionado por un motor, en el cual la acción es suficientemente fuerte para romper la membrana celular, sin deteriorar las estructuras subcelulares.

Luego de filtrar por gasa, el homogenado era centrifugado a 50.000 x g durante 60 minutos, en un rotor SS34 en una centrífuga Sorvall refrigerada Modelo RC-5.

El precipitado nuclear era enjuagado con una solución 50 mM TRIS, pH 8, glicerol 25%, Cl₂ Mg 1mM, EDTA 0,1mM, PMSF 0,5mM y DTT 1mM, y luego se resuspendía en la misma solución en una relación (2:0,5 peso original/vol) para tirbides canina.

La pureza de la preparación fue controlada por microscopía de contraste de fase. Se retiraba una alícuota para ser utilizada para la determinación de A D N, por el método de Burton (1968), y el resto se conservaba en nitrógeno líquido.

CONDICIONES DE INCUBACION

Incubaciones con cortes de tiroides bovinas

I - La solución de Krebs-Ringer-bicarbonato (KRB) se utilizaba habitualmente sin el agregado de glucosa y era preparada fresca en el día del experimento. Antes de utilizarla era gaseada durante 15-30 minutos con una mezcla de 95% O₂ y 5% CO₂ (u/v).

En general se colocaban 4 cortes de tejido en un frasco de 25-50 ml de capacidad conteniendo 10 ml de K R B.

El tejido se preincubaba a 37°C durante 30-60 minutos. Durante este lapso se incluían en el KRB las diferentes sustancias cuya acción se quería estudiar. Luego se agregaba al medio de incubación el marcador radioactivo, y previo gaseado la incubación proseguía por 60-120 minutos.

La incubación era terminada por inmersión de los diferentes Erlenmeyers en hielo, sacando rápidamente los cortes de tiroides de cada uno de ellos, los que eran extensivamente lavados con KRB (o solución salina). Experimentos previos demostraron que tres lavados sucesivos eran suficientes para eliminar la radioactividad adsorbida.

Determinación de la actividad transcripcional

2 - La actividad transcripcional fue medida en un sistema in vitro. Los núcleos aislados (40 ug de ADN/tubo) fueron incubados en un volu-

men total de 100 μ l, conteniendo 30 mM sulfato de amonio, 0,4 mM Cl_2Mg , 1mM Cl_2Mn , 50 mM TRIS-HCl, pH 7,4, 1mM DTT, 1mM ATP, 1mM GTP, 1mM CTP, 10 μ g de ARN de levadura y 10 mM FNa.

La reacción era iniciada por el agregado de 10^6 cpm de ^3H -UTP conteniendo UTP frío para una concentración final de 0,1mM. Luego de incubar 10 minutos a 30°C la reacción, era detenida por el agregado de 2 ml de ATA 10% conteniendo 8mM de pirofosfato de sodio. A cada tubo se le agregó 50 μ l de una solución conteniendo 1,5 mg/ml de albumina bovina y 0,5 mg/ml de ARN de levadura. Después de 30 minutos a 0°C , los precipitados se separaban por centrifugación a 3000rpm durante 10 minutos, en una centrífuga Sorvall refrigerada. El precipitado era resuspendido en ATA 5%, pirofosfato de sodio 4 mM, y su radiactividad determinada según la técnica correspondiente. (ver Medición de radiactividad)

EXTRACCION DE ARN DE CORTES DE TIROIDES SEGUN EL METODO DE MUNRO Y FLECK.

Después de la incubación y lavado de los cortes de tiroides, estos eran escurridos en papel de filtro, pesados y homogenizados en 1 ml de solución salina o agua destilada con un homogenizador de vidrio, tipo Potter Elvehjem. Todas estas operaciones se realizaban manteniendo los cortes a 4°C . El ARN se extraía de acuerdo al método de Munro y Fleck (1966).

Cada homogenizado era precipitado con 0,5 ml de APC 0,6 N, luego se centrifugaba a 3000 rpm durante 20 minutos en una centrífuga International, y el precipitado se lavaba dos veces con APC 0,2N, juntándose los sobrenadantes para la determinación de la fracción APC soluble, que contiene los nucleótidos precursores de ARN. Luego el precipitado se resuspendía en 1 ml de HOK 0,3N y se incubaba a 37°C durante la noche. La hidrólisis se detenía con 0,6 ml de APC 1,2N, y previa centrifugación a 3000 rpm durante 20 minutos, el sobrenadante era separado. El ARN se estimaba espectrofotométricamente, comparando con una solución de ARN de levadura. Se separaba también una alícuota para la determinación de la radiactividad.

EXTRACCION DE ARN SEGUN EL METODO DE PERRY Y COL. 1977

Los cortes de tejido eran incubados usando ^{32}P como trazador radioactivo y luego se homogeneizaban en una solución buffer A (TRIS-Cl H 0,01M), pH 8,5, 1mM EDTA, 0,1M ClNa y 0,5% SDS. De inmediato se agregaba un volumen igual de solución de cloroformo-fenol (1:1, v/v) saturada con el mismo buffer, y la mezcla era enérgicamente agitada. Luego de centrifugar, la fase acuosa era separada y reextraída con igual volumen de cloroformo-fenol. El ARN se recuperaba de la fase orgánica por el agregado de un volumen igual de buffer de homogeneización, con agitación. Se unían las fases acuosas y el ARN era precipitado por el agregado de 2 volúmenes de etanol absoluto a -20°C durante la noche.

El ARN precipitado era redissuelto en buffer A .. La pureza del ARN obtenido era estimada mediante el cálculo de la relación D. 0 260/D. 0280 siendo en las buenas preparaciones mayor de 1,8 y generalmente cercano a 2,0.

DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE ADN POR EL METODO DE BURTON (1968)

De la suspensión de núcleos se tomaba un alicuota y se lo precipitaba con APC 0,4 N, se centrifugaba a 3000 rpm durante 10 minutos. El precipitado se lavaba 2 veces con APC 0,4 N. Luego de la última centrifugación, se sacaba el sobrenadante exhaustivamente y se resuspendía el precipitado en APC 0,4 N. Se tapaba y se calentaba a 70°C durante 20 minutos. Se enfriaba inmediatamente y se centrifugaba a 3000 rpm durante 20 minutos. El sobrenadante se utilizaba para la determinación de la concentración de ADN.

Se colocaban alicuotas ,por duplicado , de las muestras y se llevaba el volumen a 1 ml con APC 0,4 N. Luego se agregaban 2 ml del reactivo de difenilamina. Se dejaba en la oscuridad por toda la noche, leyéndose su DO a 600 nm, utilizándose como referencia una curva patrón con ADN de timo bovino. La reacción era lineal hasta 60 ug/ml de ADN.

Reactivo de difenilamina: 1,5% de difenilamina en ácido acético glacial, mas 1,5 ml de ácido sulfúrico concentrado. Antes de utilizar el reactivo se le agregaba 0,1 ml de una solución de acetaldehido 1,6% por cada 20 ml de reactivo de difenilamina.

I ESTUDIOS DE LA INCORPORACION DE ^3H -URIDINA A ARN TIROIDEO

Los cortes de tiroides eran incubados en KRB a 37°C en presencia de las sustancias cuya acción se deseaba estudiar. Al final de este período se agregaba una dosis trazadora ($0,1-1 \mu\text{Ci/ml}$) de ^3H -uridina y la incubación se continuaba por 60-120 min. Se detenía la incubación y el ARN era extraído según el método de Munro y Fleck, 1966. Se determinaba la radiactividad, y los resultados se expresaban como cpm/mg o μg de ARN. En el caso de los nucleótidos precursores se expresaba como cpm/mg de peso húmedo.

II ESTUDIOS DE LA DEGRADACION DE ARN

Los cortes de tiroides eran incubados en frascos de Erlenmeyer con KRB y una dosis trazadora de ^3H -uridina. Luego de 60 minutos de marcación se procedía a sacar los cortes, lavarlos rápidamente con KRB y a distribuirlos en frascos de incubación conteniendo KRB, $7 \mu\text{g/ml}$ de actinomicina D, con o sin la presencia de las sustancias cuya acción sobre la degradación de ARN se quería estudiar. Las incubaciones se continuaban por diferentes períodos, hasta 120 minutos. El ARN se extraía y su radiactividad se determinaba según el método de Munro y Fleck (1966), según ya se describió.

III ANALISIS DE LOS NUCLEOTIDOS DE URIDINA PRECURSORES DE ARN

Los cortes de tiroides eran incubados tal como se describió, con una dosis trazadora de ^3H -uridina. Luego de homogeneizar los cortes de tiroides, se agregaba ATA al 20%. El precipitado obtenido era lavado 2 veces con ATA

al 10%, mezclándose todos los sobrenadantes. La fracción ácido soluble era entonces extraída con un volumen igual de eter sulfúrico, por 5 veces, neutralizada con hidróxido de amonio y evaporada al vacío. Las muestras fueron analizadas por cromatografía descendente en papel Whatman N 1, durante 18 hrs, usando como solvente de desarrollo etanol:acetato de amonio 1 M: ácido acético 1 M (150:8:52, v/v). En cada cromatograma se corrían simultáneamente testigos de uridina, UMP, UDP y UTP para ayudar a la identificación de los compuestos. Los cromatogramas fueron observados bajo luz ultravioleta, cortados y contados en viales conteniendo Omnifluor (NEN) (Paladini y Leloir, 1952).

IV DETERMINACION DE LA CAPTACION DE ^3H -URIDINA

Luego de finalizada la incubación, cada corte de tejido fue lavado, secado sobre papel de filtro y pesado. Del homogenado se tomó una alícuota para la determinación de su radiactividad, la que se expresó como cpm/mg de tejido.

V DETERMINACION DEL ESPACIO EXTRACELULAR DE LOS CORTES DE TIROIDES

Fue estimado mediante el uso de ^3H -inulina, de acuerdo con el método de Kostyo y Engel (1960) modificado por Debons y Pittman (1962), pero usando APC 0.6 N en lugar de ácido acético para la precipitación de las proteínas. Brevemente, los cortes de tiroides fueron incubados en KRB durante 30 minutos, con y sin IK. Al cabo de ese tiempo se agregó inulina (1, 3 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$) y, previo gaseado, se continuó la incubación durante 60 minutos. En experimentos preliminares se determinó que a este tiempo la inulina ya estaba en

completo equilibrio. Al final de la incubación los cortes eran exhaustivamente lavados, secados sobre papel de filtro, pesados y homogeneizados en agua.

VI INCORPORACION DE ^3H -LEUCINA A PROTEINAS

Los cortes de tiroides fueron incubados en condiciones similares a las ya descritas pero el KRB fue suplementado con 2 mM de L-leucina. Trabajos previos de Lecoq y Dumont(1972) mostraron que, cuando se incuban cortes de tiroides en condiciones similares a las aquí utilizadas, la adición de TSH causa un marcado aumento de la proteólisis de la tiroglobulina. Por este efecto se incrementa la cantidad de aminoácidos intracelulares, lo que diluye al aminoácido marcado que se agrega. De ahí que durante muchos años diferentes investigadores fracasaran en sus intentos de demostrar una acción de TSH sobre la incorporación de aminoácidos a proteínas. Agregando leucina no marcada tanto a los cortes testigos como a los estimulados por TSH, fue posible obviar este "artefacto".

Al final del período de marcación con ^3H -leucina, por 60 minutos los cortes de tiroides fueron lavados y homogeneizados. La radiactividad incorporada a proteínas fue determinada mediante precipitación con ATA al 20%, seguida de dos lavados con ATA al 10%. La cantidad de proteínas presentes en cada corte era determinada en un alicuota según la técnica de Lowry y col(1951).

VII INCORPORACION DE YODO

La organificación del yodo fue analizada en cortes de tiroides incubados en 5 ml de KRB conteniendo las diversas sustancias cuya acción se

deseaba estudiar. Luego de 30 minutos se agregó una dosis trazadora de ^{131}I o de ^{125}I , continuándose la incubación por 15 minutos. Al final de este periodo los cortes fueron lavados, secados sobre papel de filtro y homogeneizados en 1 ml de metilmercaptoimidazol (MMI) 2 mM con un homogeneizador de vidrio tipo Potter-Elvehjem. La radiactividad unida a proteínas (yodo proteico u organificado) fue precipitada con ATA al 20% , seguida de dos lavados con ATA al 10%. La radiactividad total, así como la ATA precipitable fueron contadas en un contador gama automático. Los resultados se expresan como % de radiactividad ATA precipitable en función del total de radiactividad de cada corte.

VIII ESTUDIOS CON NUCLEOS AISLADOS

a- Bovinos

Los núcleos de tiroides bovinas, preparados según la técnica ya descrita, se utilizaban para determinar la actividad transcripcional. Cuando se estudió la acción del IK y de la T_4 sobre núcleos aislados, se realizó una preincubación (sin el agregado del ribonucleótido marcado) de 10 minutos en presencia de dichas sustancias. Luego de enfriar por 10 minutos, se determinaba la actividad transcripcional, (ver pag. 28)

b- Caninos

La acción de la TSH sobre el proceso de transcripción fue estudiada en perros. Los estudios iniciales de caracterización del sistema fueron realizados utilizando tiroides obtenidas de perros sacrificados en la División de Cirujía Experimental (State University of New York, Buffalo).

En cada experimento se utilizaron 4 perros, dos de los cuales fueron inyectados con 10 UI de TSH por vía intravenosa, en tanto que los otros dos recibieron solución salina. Noventa minutos más tarde los animales fueron anestesiados con pentotal y las tiroides fueron obtenidas quirúrgicamente. Como ya se mencionó anteriormente, se obtuvieron los núcleos tiroideos, que se conservaban en nitrógeno líquido hasta el momento de determinar su actividad transcripcional (generalmente se utilizaban antes de las 24 horas de obtenidos), en tanto que un alícuota se utilizaba para determinar ADN según el método de Burton (1966).

Cada espécimen de núcleos tiroideos era incubado, por lo menos por duplicado, bajo las diferentes condiciones. Se determinaba la actividad transcripcional total, empleando la mezcla de incubación ya descrita. La actividad sensible a alfa-amanitina (ARN polimerasa II), se determinaba sustrayendo de la actividad total, la actividad alfa-amanitina resistente (ARN polimerasa I+III). Esta última se determinaba incubando los núcleos en la forma ya descrita, con el agregado de 4 µg/ml de alfa-amanitina en el medio.

La actividad del templado endógeno puede ser inhibida agregando a la mezcla de incubación 50 µg/ml de actinomicina D (disuelta en etanol). La actividad en presencia de templado sintético se determinaba agregando 0.2 U de DO de poli(dA. dT) y 50 µg/ml de actinomicina D a la mezcla de incubación. El poli (dA. dT) se disolvía en ClNa 0.1 M a los efectos de preservar su doble cadena. A la actividad transcripcional medida bajo estas condiciones se le restaba el valor de la medida con actinomicina D sola.

MEDICION DE LA RADIATIVIDAD

Los contajes de la radiactividad se realizaron con diferentes soluciones centelleadoras, según el caso.

a) Fracción de radiactividad incorporada a proteínas

El precipitado proveniente de la precipitación con ATC, se digería con 0,5-1 ml de Protosol(NEN), mediante incubación a 37°C hasta obtener una solución clara. Previo agregado de 10 ml de Omnifluor las muestras eran contadas.

b) Fracción de ARN obtenida según Munro y Fleck(1966)

Del sobrenadante proveniente de la digestión alcalina y posterior precipitación con APC 1,2 N, se tomaban 0.1 ml y se le agregaban 10 ml de solución de Bray o de Aquasol.

c) Determinación de la radiactividad de los nucleótidos precursores de ARN separados por cromatografía

Después del desarrollo del cromatograma, se localizaban los nucleótidos bajo luz ultravioleta. El trozo correspondiente de papel era recortado y se lo colocaba en viales conteniendo 10 ml de Omnifluor.

d) Determinación de la radiactividad en homogenado de tejido

Un alícuota del homogenado se digería en Protosol a 37°C hasta obtener una solución clara, a la que se agregaban 10 ml de solución de Bray u Omnifluor.

e) Estudios sobre la organificación del yodo

La radiactividad unida a proteínas (yodo proteico u organificado) proveniente de los cortes de tiroides incubados con ^{131}I o ^{125}I , se determinaba en un contador gama automático. Los resultados se expresan como % de radiactividad precipitable en función del total de la radiactividad de cada corte de tejido.

f) Incorporación de radiactividad en núcleos aislados

El precipitado proveniente de la mezcla de incubación, para la determinación de la actividad transcripcional, se resuspendía en 4 ml de ATA al 5% conteniendo pirofosfato de sodio 4 mM, y era vertido sobre filtros de microfibras de vidrio Whatman GF/C colocados sobre un aparato de filtración al vacío (Millipore). Luego de lavar exhaustivamente con la misma solución de ATA-pirofosfato de sodio, el filtro era lavado con etanol absoluto, colocado en un vial, secado en una estufa, enfriado y, previa adición de 10 ml de Aquasol, contado en un contador de centelleo líquido.

ANALISIS ESTADISTICO DE LOS DATOS

Se realizaba de acuerdo al test de significación estadística de Student. En los estudios realizados utilizando tiroides canina, dada la variación de la actividad transcripcional de un animal a otro, los resultados fueron sometidos a un análisis de doble variancia (modelo de efecto fijo), realizado por el Dr. P. Reese (State University of New York, Buffalo).

RESULTADOS

PARTE I

ESTUDIOS CON TIROIDES BOVINAS

A : ACCION DEL YODO Y COMPUESTOS YODADOS SOBRE LA SINTESIS DE ARN

El yodo, y algunos compuestos yodados, han sido utilizados en el tratamiento del bocio y del hipertiroidismo. Sin embargo no se conoce aún el mecanismo de su acción terapéutica (ver Introducción). Trabajos "in vivo" mostraron que la administración de IK bloquea la acción estimuladora de la TSH, el AMPc y el GMPc sobre el crecimiento tiroideo y la biosíntesis de proteínas (Pisarev e Itoiz, 1972). Mas recientemente se demostró, en estudios "in vitro", que el IK es capaz de inhibir la síntesis basal (no estimulada) de proteínas tiroideas totales, así como de las proteínas solubles y de tiroglobulina (Pisarev y Aiello, 1976). Esta acción es específica para este tejido. Resultaba por lo tanto de interés analizar la acción del IK sobre la síntesis de ARN tiroideo.

Estudios preliminares

Linealidad de la incorporacion de ^3H -uridina a ARN, con el tiempo

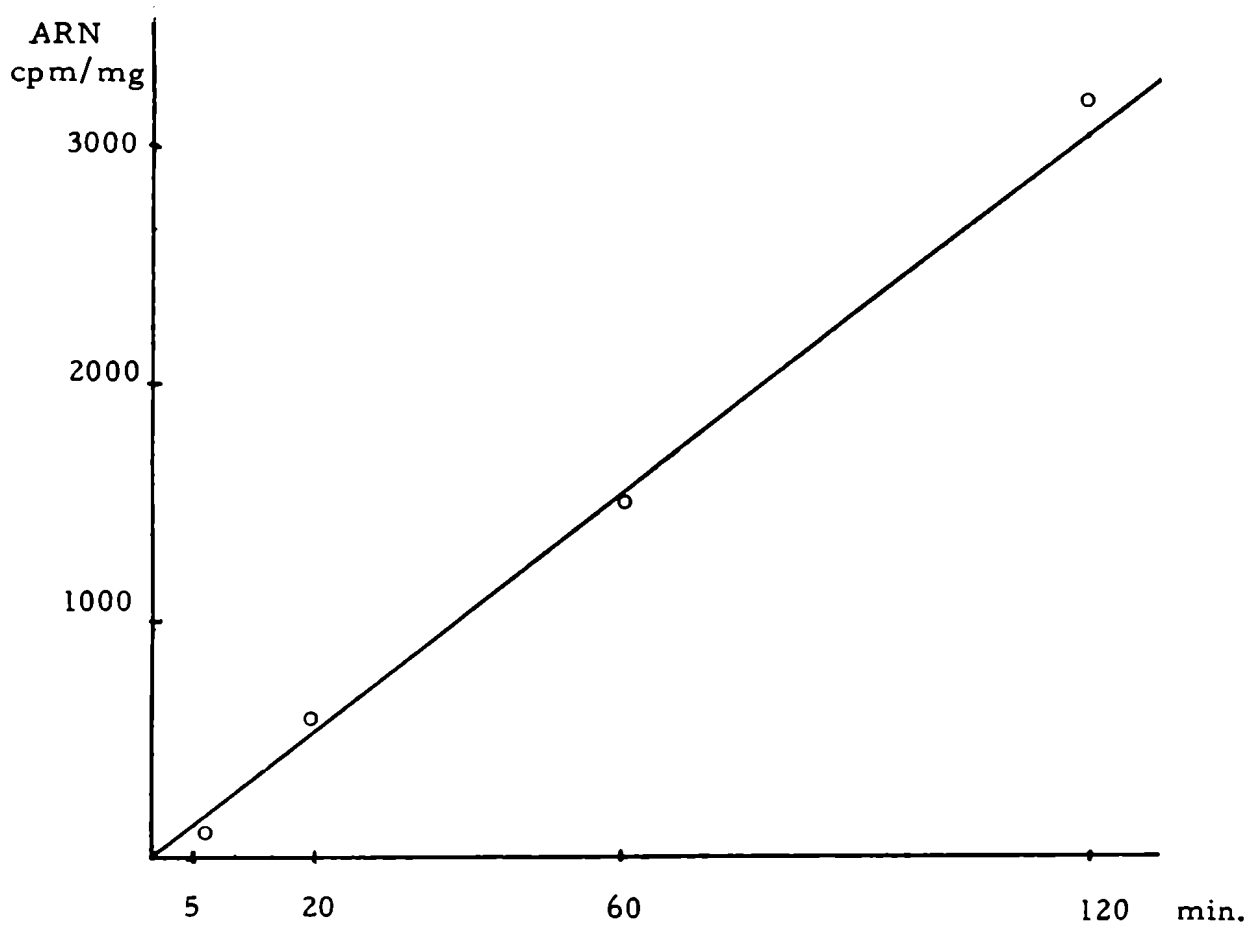
Tal como muestra la figura 1, bajo nuestras condiciones de incubación, la incorporacion de ^3H -uridina a ARN es lineal con el tiempo.

ACCION DEL IK SOBRE LA INCORPORACION DE ^3H -URIDINA A ARN

El cuadro 1 muestra que la preincubación de cortes de tiroides con IK a 10^{-5} M producía una significativa reducción en la incorporación de ^3H -uridina a ARN. El efecto del IK sobre la incorporación de este nucleótido

FIGURA 1

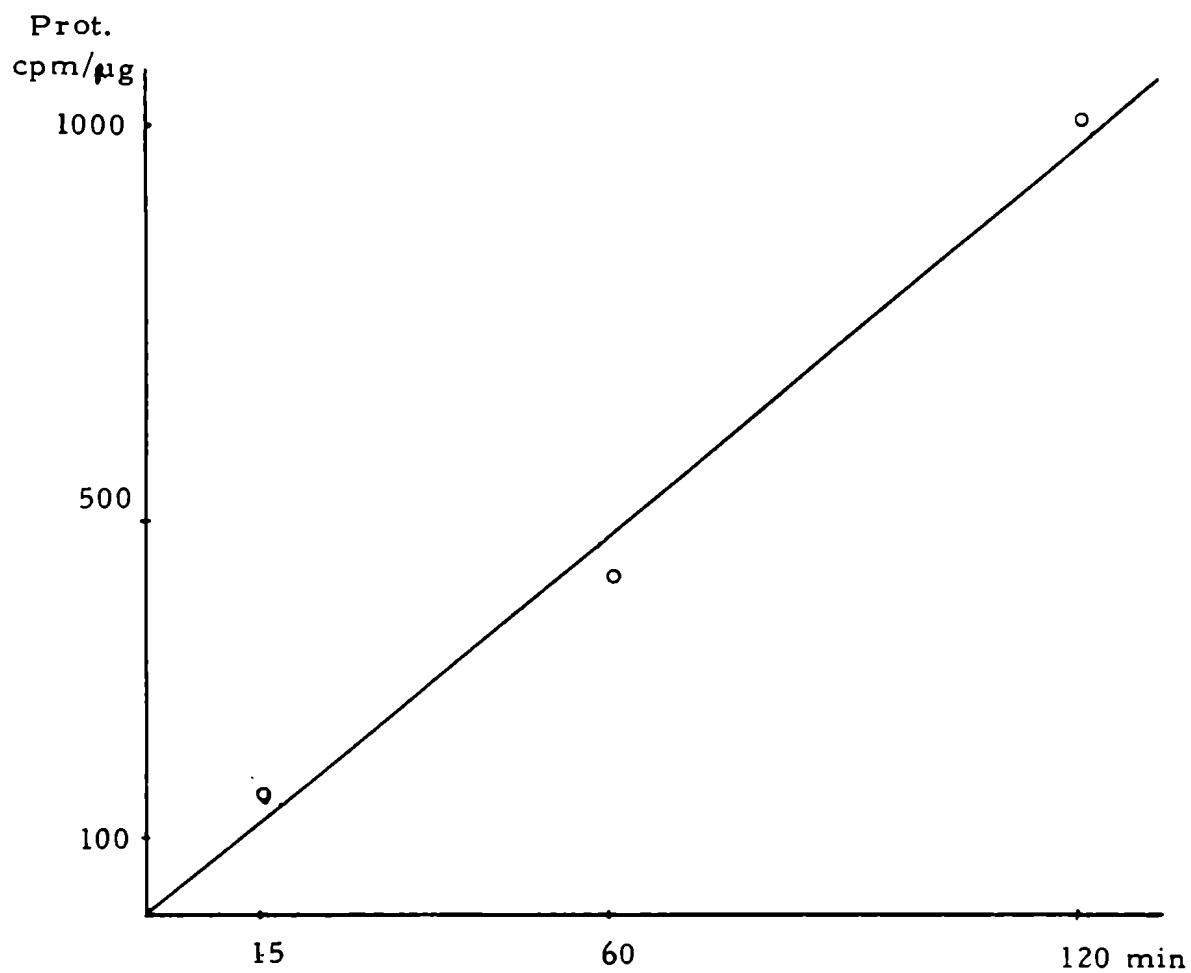
LINEALIDAD DE LA INCORPORACION DE ^3H -URIDINA A ARN CON EL TIEMPO



Cada valor es el promedio de 4-6 cortes de tejido.

El tejido se preincubaba por 60 min. y luego se agregaba ^3H -uridina, (5-15 Ci/mmol, N. E. N.), y se proseguía la incubación durante el tiempo indicado.

FIGURA 2

LINEALIDAD DE LA INCORPORACION DE ^3H -LEUCINA A PROTEINAS

Las incubaciones se realizaban en presencia de $1\mu\text{Ci}$ de ^3H -L leucina, (4, 5- ^3H leucina: 44, 2 Ci/mmol; N. E. N.), durante los tiempos indicados.

CUADRO 1

ACCION DEL IK SOBRE LA INCORPORACION DE ³H-URIDINA A ARN

Tratamiento	ARN cpm/mg	p <
Testigos	1815 ± 339	—
IK 10 ⁻⁵ M	824 ± 88	0.001

Cada valor es el promedio de cuatro cortes de tejido ± 1 D. S.

Los cortes de tiroides se preincubaban durante 60 minutos, en KRB, con y sin IK. Luego se agregaba 2 µCi/ml de ³H- uridina(N. E. N. 5-15 Ci/mmol), y la incubación proseguía por 60 minutos.

a ARN parece ser muy rápido. Cuando los cortes de tiroides fueron marcados con ^3H -uridina durante 60 minutos, y luego transferidos a Erlenmeyers con y sin IK, e incubados durante diferentes tiempos, no se observó acción del halógeno. El cuadro 2 muestra un experimento de este tipo, con incubaciones en presencia de IK de hasta 1 hora.

La disminución de la marcación de ARN producida por el IK puede ser debida a una acción a nivel de:

- 1) entrada del precursor a la célula
- 2) alteración de los nucleótidos precursores de ARN
- 3) proceso de polimerización de los nucleótidos (transcripción)
- 4) aumento de la degradación del ARN

ACCION DEL IK SOBRE LA ENTRADA DEL PRECURSOR Y SOBRE EL ESPACIO EXTRACELULAR TIROIDEO

En lo que respecta a la entrada del precursor (nucleótido marcado) a la célula, el cuadro 3 muestra que, bajo condiciones en que la marcación de ARN esta significativamente disminuída, el IK no altera la entrada de ^3H -uridina a la célula. Por otra parte el espacio extracelular tiroideo, medido por la distribución de ^3H -inulina, no mostraba diferencias entre los testigos y los cortes tratados con IK a 10^{-4} M.

ACCION A NIVEL DE LOS NUCLEOTIDOS PRECURSORES

La posibilidad de una acción a nivel de los nucleótidos de uridina, precursores de ARN, fue luego explorada. Como puede apreciarse en el

CUADRO 2

EFEECTO DE LA ADICION TARDIA DE IK SOBRE LA INCORPORACION DE ^3H -URIDINA A ARN

Tiempo (min)	Tratamiento	
	Testigos	IK 10^{-5}M
0	1527	—
30	2034	2270
60	2916	2787

Despues de un pulso de 60 min con ^3H - uridina, los cortes de tejido eran incubados con y sin IK en el medio. Cada valor es el promedio de triplicados cercanos. Los resultados se expresan como cpm/mg de ARN.

CUADRO 3

ACCION DEL IK SOBRE LA CAPTACION DE ^3H - URIDINA Y LA
DISTRIBUCION DE ^3H - INULINA

Trazador	Parámetro	Testigos	IK 10^{-4} M	p <
^3H -uridina	ARN cpm/ mg	1422 \pm 72	952 \pm 100	0.001
	Rad. total cpm/mg tejido	1132 \pm 75	1150 \pm 177	n. s.
^3H -inulina	cpm/mg tejido	1013 \pm 129	1063 \pm 254	n. s.
	espacio distri- bución %	19 \pm 3.5	23.9 \pm 5.6	n. s.

Cada valor es el promedio de 4 cortes de tejido \pm 1 D. S.
n. s. sin diferencia significativa

cuadro 4, se analizó la distribución de uridina y derivados fosforilados en cortes de tejido testigos y tratados con IK a 10^{-5} M. Bajo estas condiciones experimentales la marcación de ARN tiroideo estaba francamente disminuída. El análisis de la distribución porcentual de uridina, UMP, UDP y UTP no mostraba, sin embargo, diferencias significativas entre los testigos y los cortes tratados con IK, excluyendo una acción a nivel de estos pasos metabólicos.

ACCION A NIVEL DE LA DEGRADACION DE ARN

Una tercera explicación sería que el yoduro acelerara la velocidad de degradación del ARN. Los datos previos de la literatura no apoyaban esta idea, ya que se demostró que el tratamiento crónico de ratas con IK disminuye marcadamente algunas enzimas lisosomales, tales como la proteasa ácida (Pisarev y Altschuler, 1973). Sin embargo, se decidió analizar esta posibilidad. Los cortes de tiroides fueron marcados en presencia de ^3H -uridina y luego transferidos a frascos conteniendo actinomicina D, para bloquear toda ulterior incorporación de uridina a ARN, con y sin el agregado de IK a 10^{-5} M. La figura 3 muestra que la curva de degradación del ARN tiroideo no se alteró por la adición del IK.

ACCION SOBRE EL PROCESO DE TRANSCRIPCION

Finalmente se analizó la acción del IK y de la T_4 (por razones que se explicarán luego) sobre el proceso de transcripción. Para ello se utilizaron núcleos aislados de tiroides bovinas, los cuales fueron preincubados

CUADRO 4

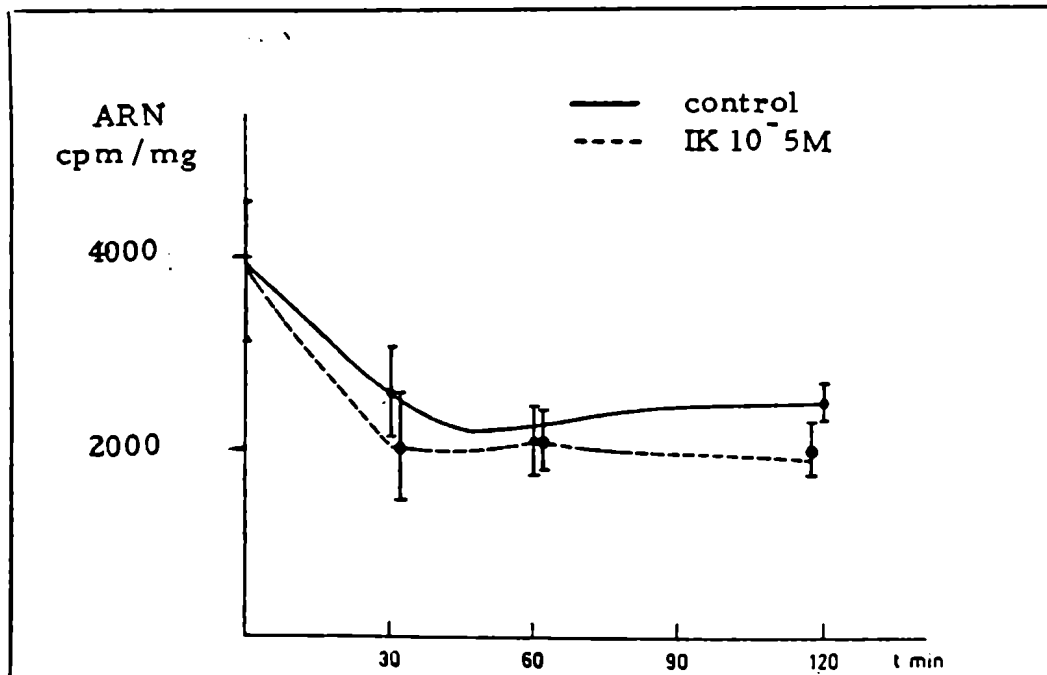
ACCION DEL IK SOBRE LA DISTRIBUCION CROMATOGRAFICA DE
³H-URIDINA Y DERIVADOS

Tratamiento	ARN (cpm/mg)	% de distribución			
		Urid	UMP	UDP	UTP
Testigos	18871	24.1	44.2	23.6	8.1
IK 10 ⁻⁵ M	12410	22.3	39.0	30.1	9.6

Cada valor es el promedio de triplicados cercanos. El IK estaba presente tanto durante la preincubación como durante el período de marcación, que en este caso era de 60 min. Las incubaciones se realizaron en presencia de 15 µCi/ml de ³H-uridina, (28, 3 Ci/mmol, N. E. N.).

FIGURA 3

ACCION DE IK SOBRE LA DEGRADACION DE ARN TIROIDEO



Cada valor es el promedio de 4-6 cortes de tiroides \pm 1D. S. Las incubaciones se realizaban en presencia de 3 uCi/ml de ^3H -uridina (5-15 Ci/mmol, N. E. N.), durante 60 minutos. Ver Materiales y Métodos.

con IK o T_4 a 10^{-3} M, enfriados, procediéndose luego a medir la actividad transcripcional. Bajo estas condiciones experimentales no pudo demostrarse una acción inhibitoria del IK o de la T_4 (cuadro 5).

En los trabajos previos "in vitro" (Pisarev y Aiello, 1976) sobre la acción del IK en la biosíntesis de proteínas tiroideas se había demostrado que:

- 1) esta acción es específica para la tiroides, ya que no se observa en otros tejidos (hígado, salivares)
- 2) es inhibida por la adición de perclorato de potasio, lo que indica que el IK actúa a nivel intracelular
- 3) es inhibida por la adición del metilmercaptoimidazol (MMI), lo que indica que la forma intracelular que media este efecto es un compuesto organificado de yodo
- 4) es mimetizada por la tiroxina, que es uno de los principales compuestos yodados intratiroides
- 5) comparando dosis equimolares, la tiroxina y la triyodotironina son más potentes en su acción inhibitoria que el yoduro.

Resultaba entonces de gran interés determinar si la acción del yoduro sobre la incorporación de 3H - uridina a ARN tenía las mismas características.

La figura 4 muestra que la acción significativamente inhibitoria de IK a 10^{-5} M es bloqueada tanto por 0,5 mM. de perclorato de potasio

CUADRO 5

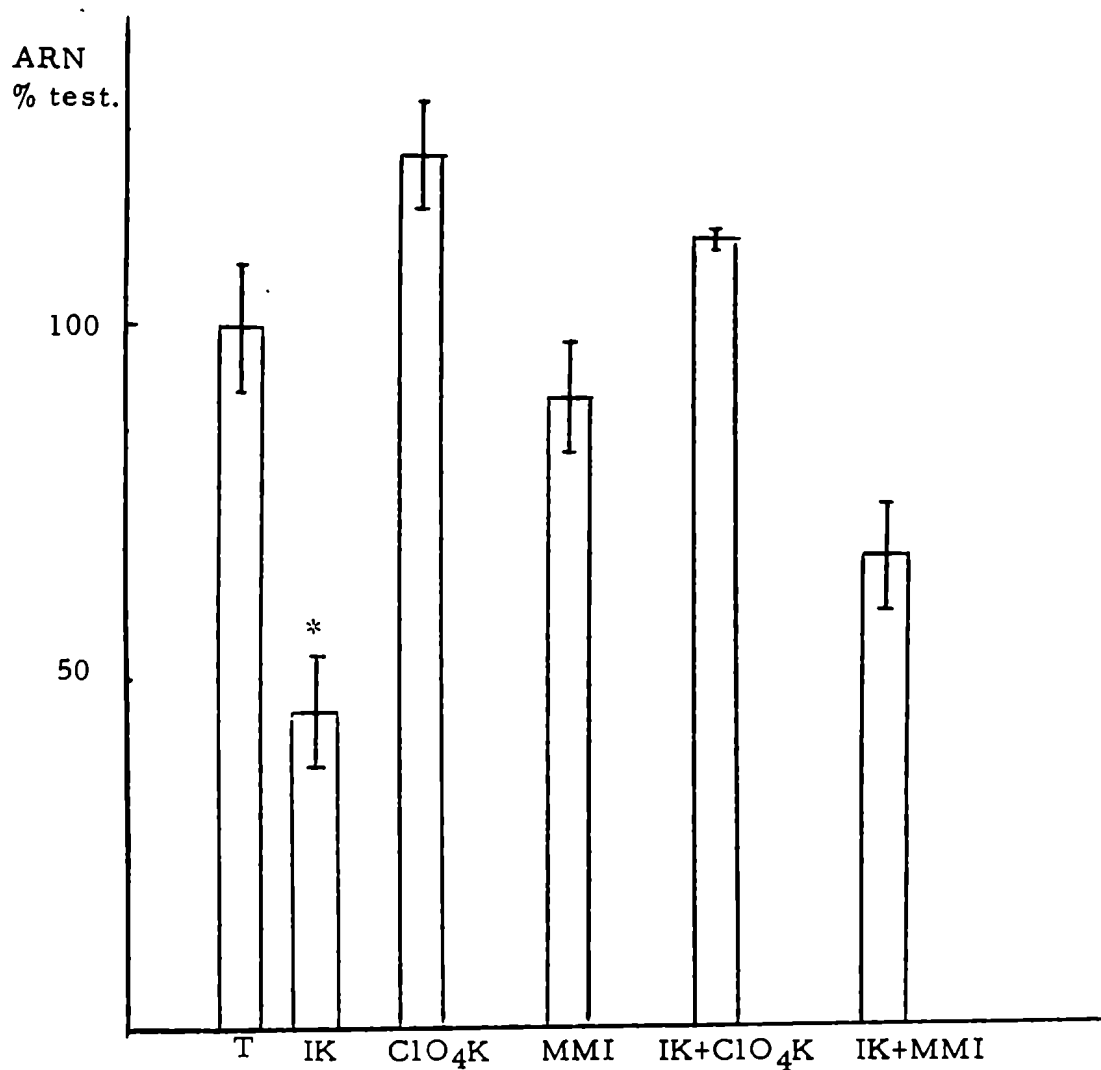
ACCION DE IK Y T₄ SOBRE LA SINTESIS DE ARN EN NUCLEOS
AISLADOS DE TIROIDES

Tratamiento	Act. total	ARN polim I	ARN polim I + III
Testigos	411	207	204
IK 10 ⁻³ M	451	229	222
T ₄	419	191	228

Cada valor es el promedio de cuadruplicados, expresados como cpm de ³H-UMP, incorporadas a ARN. Cada ensayo tenía 105 µg de DNA nuclear por tubo.

FIGURA 4

ACCION BLOQUEANTE DE MMI Y ClO_4K EN EL EFECTO INHIBITORIO
DE IK SOBRE LA SINTESIS DE ARN



Cada valor es el promedio de 4 cortes de tejido \pm 1 D. S.

* $p < 0.001$ cuando se compara con los testigos

Las incubaciones se realizaron durante 120 min., en presencia de $1 \mu\text{Ci/ml}$ de ^3H -uridina, (5-15 Ci. mmol), N. E. N. . La radiactividad de los testigos era 798 ± 53 cpm/mg.

IK 10^{-5}M , ClO_4K 0.5mM, MMI 1 mM

como por 1 mM de MMI. Esto indica que el yodo inhibe la síntesis de ARN a través de un compuesto yodado intracelular.

ACCION DE T₄ SOBRE LA MARCACION DE ARN

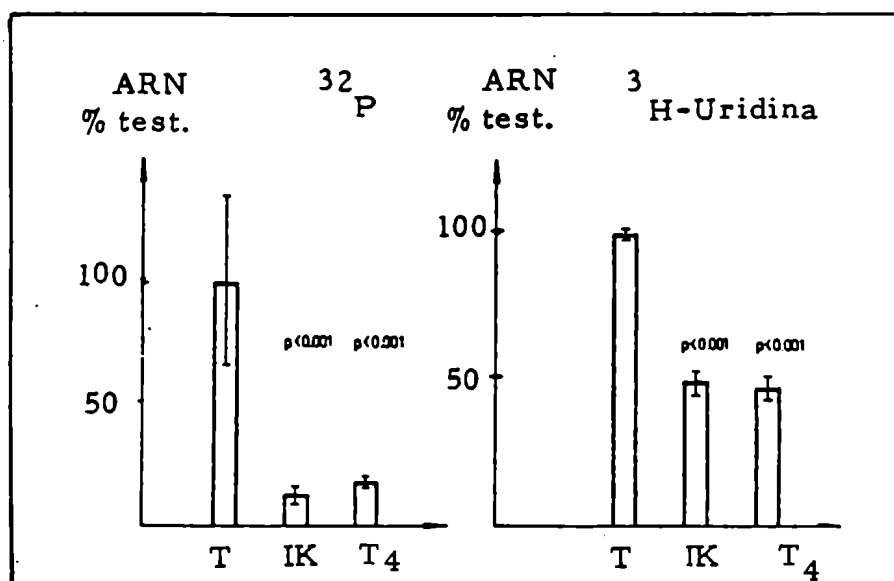
El paso siguiente fue determinar si la tiroxina era capaz de mimetizar la acción del yoduro. Se realizaron dos tipos de experimentos, utilizando como precursores la ³H-uridina y el ³²P. Como puede apreciarse en la figura 5 tanto el IK como la T₄ a 10⁻⁵M causaron una muy significativa disminución de la marcación del ARN tiroideo con ambos precursores marcados.

Se comparó entonces la potencia inhibitoria del IK y la T₄ sobre la síntesis de ARN. El cuadro 6 muestra que a 10⁻⁶M, cuando el IK ya no inhibía este parámetro, la T₄ producía una significativa disminución del mismo.

EFEECTO DEL IK SOBRE LA ACCION DE NUCLEOTIDOS CICLICOS EN LA INCORPORACION DE ³H-URIDINA A ARN.

Todos los estudios mencionados fueron realizados con cortes de tiroides no estimulados. Dado que en trabajos anteriores "in vivo" se había observado que el IK inhibe la biosíntesis de proteínas tiroideas estimulada por TSH, AMPc y GMPc (Pisarev e Itoiz, 1972) se decidió estudiar también la acción "in vitro" del IK sobre la síntesis de ARN estimulada.

FIGURA 5

ACCION DE IK Y T₄ SOBRE LA MARCACION DE ARN

IK y T₄ 10⁻⁵ M. Los cortes de tejido eran preincubados en KRB durante 60 min, y luego se incubaban en presencia del trazador radiactivo, 1 μCi/ml de ³H-uridina N. E. N. (5-15Ci/mmol) o ³²P como fosfato, durante 120 min. Cada valor es promedio de 4 cortes de tiroides ± 1 D. S.

CUADRO 6

ACCION DE IK Y T₄ SOBRE LA INCORPORACION DE ³H-URIDINA
A ARN EN CORTES DE TEJIDO

Tratamiento	ARN (cpm/mg)	P <
Testigos	1751 ± 251	-
10 ⁻⁵ M IK	1168 ± 161	0.005
10 ⁻⁵ M T ₄	957 ± 117	0.005
10 ⁻⁶ M IK	2235 ± 348	n. s.
10 ⁻⁶ M T ₄	1036 ± 288	0.005

Cada valor es el promedio de 4 cortes de tejido ± 1 D. S. , excepto para T₄ a 10⁻⁵ M , en que son promedio de 3 cortes.

El cuadro 7 muestra que el IK a 10^{-5} M inhibió completamente la acción estimuladora de AMPc y de GMPc 2mM.

INFLUENCIA DE LA GLUCOSA SOBRE LA INHIBICION POR IK

Como se discutirá en la Sección B, la glucosa es también un potente estimulante de la incorporación de ^3H -uridina a ARN. Como puede apreciarse en el cuadro 8 una concentración de IK de 10^{-5} M inhibió significativamente la acción estimulante de la glucosa a 8 mM.

ACCION DE DIFERENTES COMPUESTOS YODADOS

Con el objeto de obtener información acerca de la relación entre la estructura de los compuestos yodados y su acción inhibitoria sobre la síntesis de ARN se realizaron estudios utilizando derivados de las hormonas tiroideas. En el cuadro 9 se muestran los resultados obtenidos. De la lista de compuestos estudiados fueron inhibitorios: L-tiroxina, L-triyodotironina, isopropil-triyodotironina, Tetrac, Triac, tetraclorotironina, ácido tetrayodopropiónico, ácido triyodopropiónico y, en leve acción, ácido tetrayodofórmico. No fueron inhibitorios: ácido triyodofórmico, diyodotironina, isopropil-diyodotironina y la L-tironina.

CUADRO 7

ACCION DEL IK SOBRE LA ACCION DE NUCLEOTIDOS CICLICOS EN LA
INCORPORACION DE ^3H -URIDINA A ARN

Tratamiento	ARN(cpm/mg)	p <
Testigos	889 \pm 160	
AMPc 2 mM	1824 \pm 140	0.001
GMPc 2 mM	1599 \pm 240	0.005
IK 10^{-5} M	564 \pm 39	0.005
IK+AMPc	621 \pm 94	0.001(a)
IK+GMPc	604 \pm 163	0.001(a)

Cada valor es el promedio de cuadruplicados \pm 1 D. S. El KRB contenía 1 mM cafeína. (a) cuando se lo compara con el respectivo nucleótido cíclico.

CUADRO 8

INFLUENCIA DE LA GLUCOSA SOBRE LA INHIBICION POR YODURO

Tratamiento	ARN(% de testigos)	P <
Testigos	100 \pm 17	
Glucosa 8 mM	213 \pm 5	0.001
IK 10^{-5} M	59 \pm 8	0.005
Glucosa +IK	150 \pm 8	0.005

Cada valor era promedio de 4 cortes de tejido \pm 1 D. S. La radiactividad de los testigos(cpm/mg)fué de 4688 \pm 840.

CUADRO 9

ACCION DE DIFERENTES COMPUESTOS YODADOS

Tratamiento	% de los Testigos
IK	41
T ₃	53
Tetrac	50
Triac	60
Isopropil-T ₃	50
Acido Tetrayodopropiónico	39
Acido Triyodopropiónico	61
Tetraclorotironina	33
Acido Tetrayodofórmico	77
Acido Triyodofórmico	108
Diyodotironina (T ₂)	100
Isopropil -T ₂	100
L-tironina	96

B : ACCION DE NUCLEOTIDOS CICLICOS, NEUROTRANSMISORES Y PROSTAGLANDINAS SOBRE LA SINTESIS DE ARN

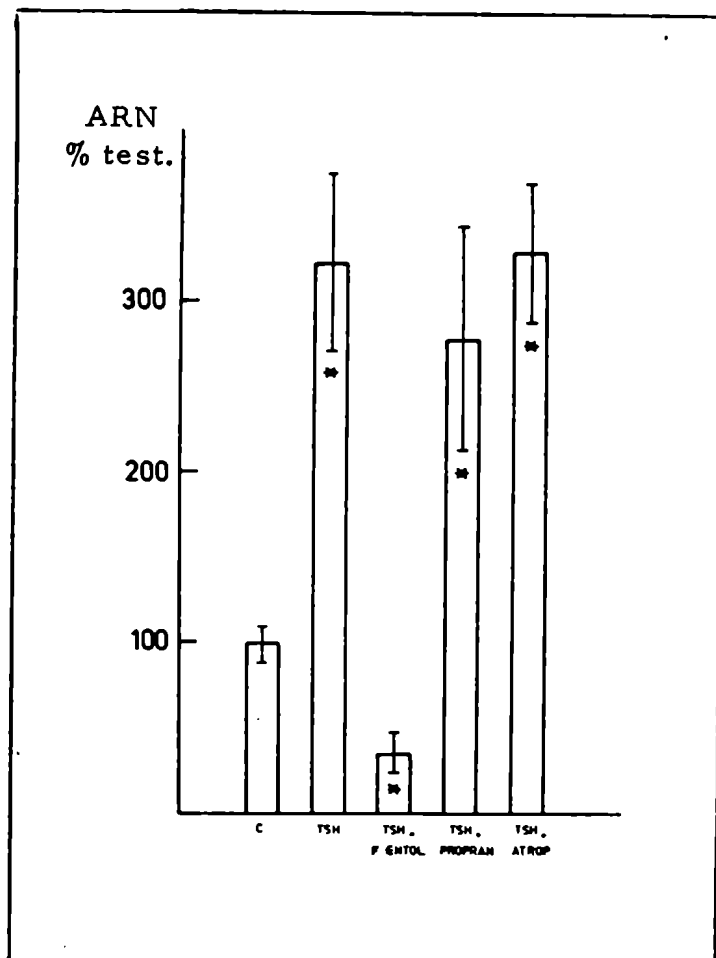
Como ya se mencionó, la función tiroidea se encuentra bajo la regulación de la TSH hipofisaria. La secuencia de pasos metabólicos en la acción de esta hormona involucran su interacción con receptores en la membrana celular, activación de la adenilato ciclasa con subsiguiente formación de AMPc. Pero este nucleótido cíclico no es único en su capacidad de estimular la tiroides. Se ha demostrado que otro nucleótido cíclico, el GMPc, es capaz de estimular la biosíntesis de proteínas tiroideas, tanto *in vivo* (Pisarev y col 1971a), como *in vitro* (DeNayer, 1973). Existe en la tiroides la enzima encargada de catalizar la formación del GMPc, la guanilato ciclasa (Barmasch y col, 1973) aunque su acción no es regulada por la TSH sino por el sistema colinérgico (Yamashita y Field, 1972). Es por ello que resultaba de interés analizar el papel de estos dos nucleótidos en la síntesis de ARN tiroideo.

ACCION DE LOS NEUROTRANSMISORES Y SUS BLOQUEANTES

La figura 6 muestra la acción de diferentes bloqueantes sobre la estimulación de la síntesis de ARN causada por la TSH. Puede observarse que sólo la adición de 1 mM fentolamina, bloqueante de tipo alfa-adrenérgico, inhibió completamente la acción de la TSH, en tanto que el bloqueante de tipo beta-adrenérgico, propanolol, y el inhibidor colinérgico, atropina, no alteraron la respuesta a la hormona.

FIGURA 6

ACCION DE BLOQUEANTES DE NEUROTRANSMISORES SOBRE LA SINTESIS DE ARN , ESTIMULADA POR TSH.



Los cortes de tiroides se preincubaban 60 min con las sustancias efectoras y luego la incubación proseguía por otros 60 min, con el marcador radiactivo. Cada valor es el promedio de 4 cortes de tejido \pm 1 D. S. * Estadísticamente significativo, $p < 0.001$. La TSH se usaba a 150 mU/ml mientras que la fentolamina, el propranolol y la atropina se usaban a una concentración de 1 mM. La radiactividad específica de los testigos era 997 ± 110 cpm/mg.

En otra serie de experimentos se estudió la acción de diferentes drogas sobre la marcación de ARN a partir de ^3H -uridina. La carbamilcolina, mediador colinérgico, en una concentración de 1 mM, produjo una marcada estimulación (mayor del 300%), que fué totalmente abolida por la adición simultánea de 1 mM atropina. La norepinefrina, también en una concentración 1 mM, aumentó en un 400% la marcación de ARN. Por su parte, el FNa, en dosis de 1 y 5 mM, causó un progresivo aumento de este parámetro (figura 7).

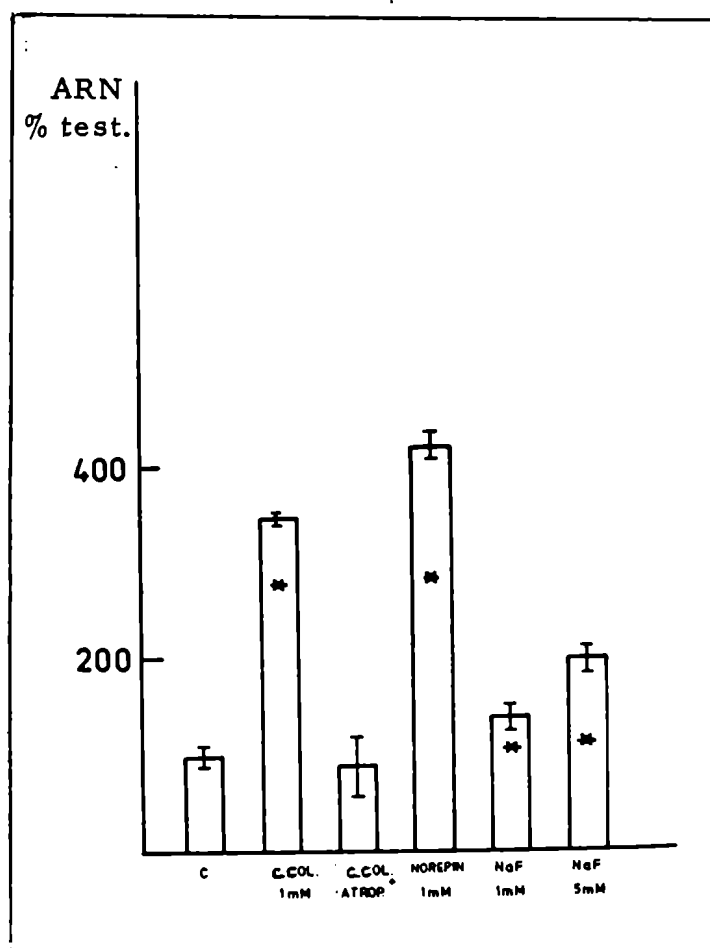
ACCION DE LAS PROSTAGLANDINAS

El papel de las prostaglandinas en la regulación de la función tiroidea, y especialmente en el mecanismo de acción de la TSH, es aún objeto de controversia. Como se analizará en mayor detalle en la sección Discusión, las opiniones se dividen entre quienes les atribuyen un papel en la acción de la TSH, hasta quienes les niegan toda relevancia. Por ello era de gran interés analizar el probable efecto de las prostaglandinas en la regulación de la síntesis de ARN. Para ello se diseñaron dos tipos de experimentos. En una primera serie se estudió la acción de dos inhibidores de la enzima prostaglandina sintetasa, aspirina e indometacina, sobre el efecto estimulante de la TSH. En otra serie se estudió directamente la acción de las diferentes prostaglandinas.

En el cuadro 10 se muestran los resultados obtenidos con el primer tipo de experimentos. La adición de TSH produjo una estimulación significativa de la síntesis de ARN (173 % con 50 mU/ml y 325 % con 150 mU/ml)

FIGURA 7

ACCION DE NEUROTRANSMISORES SOBRE LA MARCACION DE ARN



Los cortes de tiroides se preincubaban 60 min con las sustancias efectoras y luego 1 uCi/ml de $5\text{-}^3\text{H}$ -Uridina, (28,3 Ci/mmol), se agregaba y la incubación proseguía por 60 min. Cada valor es el promedio de 4 cortes de tiroides \pm 1 D. S. Los testigos se toman como 100%.

*Estadísticamente significativo : $p < 0.001$. La actividad específica de los testigos era de 2219 ± 230 cpm/mg.

CUADRO 10

PAPEL DE LAS PROSTAGLANDINAS EN LA INCORPORACION DE
³H-URIDINA A ARN

Expto	Tratamiento	ARN (cpm/mg)	% Testigo	p <
A	Testigos	991 ± 110	—	—
	PGE ₁ 25 µg/ml	1064 ± 143	106	n. s.
	cafeína 1 mM	2198 ± 245	221	0.001
	cafeína + PGE ₁	2297 ± 632	231	n. s(a)
	TSH 150 mU/ml	3220 ± 534	325	0.001
	TSH + aspirina 100µg/ml	3784 ± 278	385	0.001
B	Testigos	440 ± 50	—	—
	TSH 50 mU/ml	765 ± 123	173	0.005
	TSH + indometacina 5µg/ml	743 ± 78	169	0.001

Cada valor es el promedio de cuatro cortes de tejido ± 1 D. S.

(a): estadísticamente no significativo comparado con cafeína 1 mM

que no fue alterada por la adición de los inhibidores de la prostaglandina sintetasa, aspirina e indometacina. En cambio, cuando se incubó en presencia de 25 ug/ml de PGE₁, con o sin agregado de cafeína 1 mM, no se encontró estimulación alguna. Es de hacer notar que la cafeína per se, tuvo un marcado efecto estimulante.

En otro grupo de estudios se analizó la acción de diferentes prostaglandinas (A₁, E₁, F₁ alfa y F₂ alfa) sobre la incorporación de ³H-uridina a ARN. Se utilizaron dosis variables entre 5 y 50 ug/ml, con o sin el agregado de cafeína 1 mM. Pero en ninguna de estas condiciones se logró demostrar un efecto. Los resultados de un típico experimento se muestran en el cuadro 11.

Esta acción negativa de las prostaglandinas sobre la síntesis de ARN podía explicarse porque estos compuestos no juegan un papel en la misma. Pero existía la posibilidad de que, con tejido bovino y en nuestras condiciones de incubación, las prostaglandinas carecieran de efecto. Trabajos previos de Rodesch y col(1969) demostraron que la PGE₁ tiene un marcado efecto estimulante sobre la organificación del yodo. El cuadro 12 muestra que tanto la TSH como la PGE₁ causaron un significativo aumento en este parámetro en nuestros cortes de tiroides bovina.

ACCION DE AMPc Y DE GMPc

En trabajos anteriores (Pisarev y col. 1970a, Pisarev y col. 1971a), se había demostrado la acción de AMPc y de GMPc sobre la biosíntesis de proteínas tiroideas. Además, TSH y norepinefrina por un lado, y carbamilcolina

CUADRO 11

ACCION DE DIFERENTES PROSTAGLANDINAS SOBRE LA SINTESIS
DE ARN

Tratamiento	ARN (cpm/mg)
Testigos	525 \pm 90
PGE ₁	577 \pm 40
PGA ₁	551 \pm 124
PGF ₁ α	570 \pm 28
PGF ₂ α	582 \pm 64

Cada valor es el promedio de cuatro cortes de tiroides \pm D. S. Las prostaglandinas fueron utilizadas en una concentración de 5 μ g/ml. Las incubaciones se realizaron en presencia de 0.3 μ Ci/ml de ³H-uridina, (28, 3Ci/mmol), durante 60 min.

CUADRO 12

ACCION DE PGE₁ Y DE TSH SOBRE LA ORGANIFICACION DEL YODO

Tratamiento	PB ¹²⁵ I(% total)	% de testigos	p <
Testigos	4,8 \pm 1,1	—	—
TSH 5 mU/ml	8,8 \pm 1,2	183	0.01
PGE ₁ 25 ug/ml	10,6 \pm 2,1	221	0.01

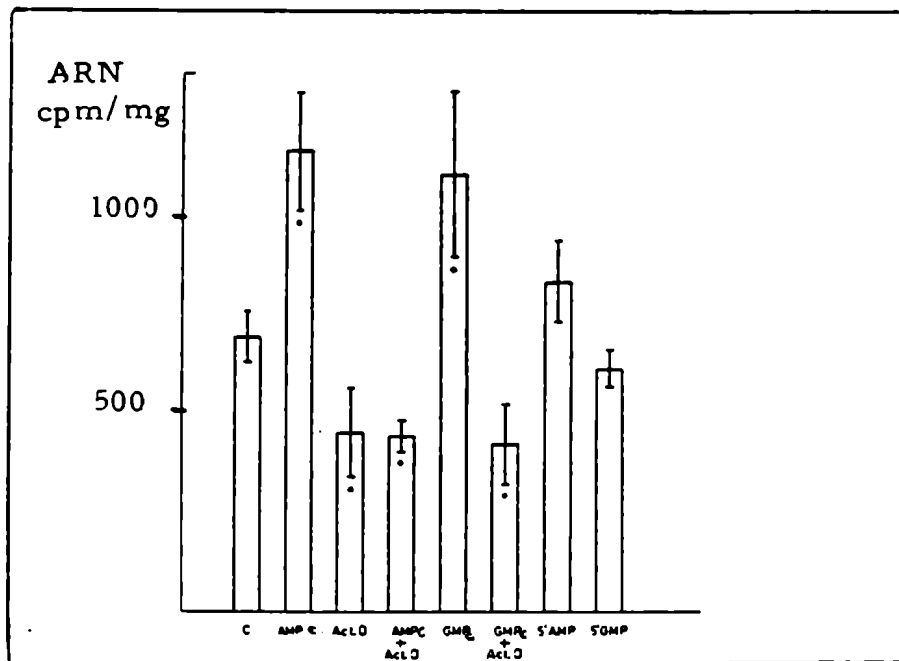
Cada valor es el promedio de cuatro cortes de tiroides \pm 1 D. S.

y FNa por el otro, eran capaces de aumentar la síntesis de ARN. Por lo tanto se decidió estudiar la acción de AMPc y GMPc sobre este parámetro. La figura 8 muestra la acción de AMPc y GMPc, en una concentración 1 mM, sobre la incorporación de ^3H -uridina a ARN. La acción estimuladora de estos compuestos fue inhibida totalmente por la adición de actinomicina D ($4\ \mu\text{g}/\text{ml}$), y no fue reproducida por 5'AMP o 5'GMP. El hallazgo que la actinomicina D inhibe la acción de AMPc y GMPc indicaba que el efecto de estos compuestos tiene lugar en una etapa pretranscriptacional y/o transcriptacional. En apoyo de una acción pretranscriptacional son los datos que muestran un aumento en la radiactividad ácido soluble, que contiene los nucleótidos precursores (cuadro 13). Resultados preliminares de nuestro laboratorio, por otra parte, han mostrado que tanto el AMPc como el GMPc aumentan el porcentaje de la radiactividad en la zona correspondiente a UTP en el cromatograma. En tanto que los testigos (incubados con cafeína 1 mM) mostraron un % de UTP de $2,4 \pm 0,4$, los cortes incubados con AMPc dieron valores de $4,9 \pm 1,3$ ($p < 0.001$) y los de GMPc de $5,3 \pm 0,5$ ($p < 0.005$).

La posibilidad de que los nucleótidos cíclicos actuaran estimulando la entrada del precursor marcado a las células, fue descartada en los experimentos que se muestran en el cuadro 14. Se observa que bajo condiciones en que la marcación de ARN estaba significativamente aumentada, la entrada de ^3H -uridina a la célula sólo lo estaba leve y no significativamente, sin explicar el mayor aumento de la actividad específica del ARN.

FIGURA 8

ACCION DE AMPc y GMPc SOBRE LA INCORPORACION DE ³H- URIDINA
A ARN



Actinomicina D 4µg/ml. Cada valor es el promedio de cuadruplicados \pm 1 D. S. * : $p < 0.001$, cuando se comparaban con los testigos.

CUADRO 13

ACCION DE LOS NUCLEOTIDOS CICLICOS SOBRE LA INCORPORACION
DE ³H- URIDINA A LA FRACCION ACIDO SOLUBLE

Tratamiento	ARN (cpm/ mg)	p <	APC soluble cpm/mg tej.	p <
Testigos	4350 \pm 820	—	492 \pm 48	—
AMPc 1.5 mM	7990 \pm 1240	0.001	905 \pm 93	0.001
GMPc 1.5 mM	8100 \pm 700	0.001	1036 \pm 172	0.001

Cada valor es promedio de 4 cortes de tejido, incubados durante 2 horas con 1 mM de cafeína y 1.4 uCi/ml de uridina-G-³H

CUADRO 14

ACCION DE LOS NUCLEOTIDOS CICLICOS SOBRE LA ENTRADA DE
³H-URIDINA A LA CELULA E INCORPORACION A ARN.

Tratamiento	Captación de uridina cpm/mg tejido	ARN (cpm/mg)
Testigos (1mM cafeína)	1305	2131 ± 376
AMPc 2 mM	1558	4062 ± 336
GMPc 2mM	1587	3925 ± 575

Cada valor es el promedio de cuádruplicados. El período de mar-
cación era de 120 minutos.

Si bien ambos nucleótidos cíclicos(AMPc y GMPc) tenían acciones paralelas, sus efectos no eran aditivos. La figura 9 muestra un típico experimento realizado utilizando 1 mM de ambos compuestos, aunque los mismos resultados fueron obtenidos en otros experimentos con dosis menores.

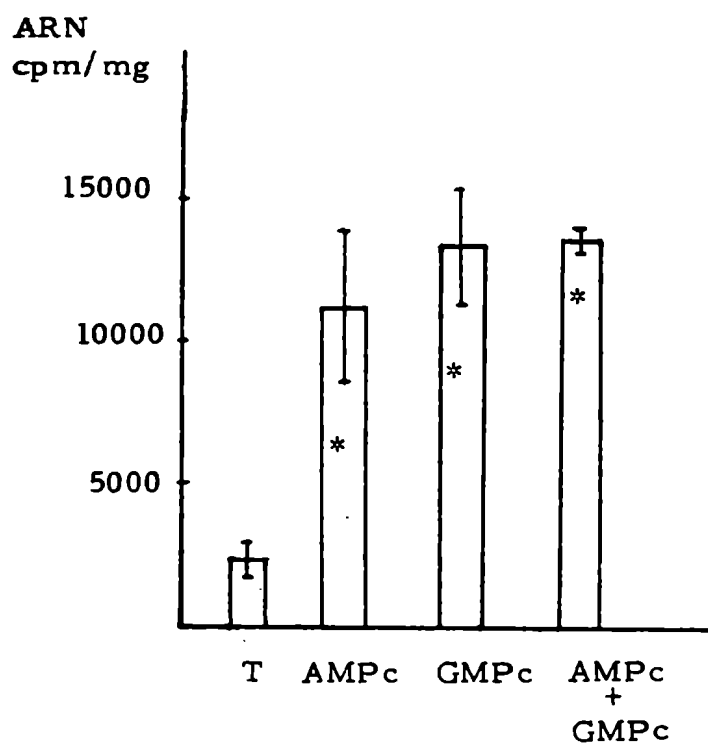
ACCION DEL CMPc

Nuestros resultados, así como los obtenidos por otros investigadores, indican que la tiroides es un sistema en que tanto AMPc como GMPc tienen efectos paralelos. Este sistema de regulación es similar, en este aspecto, al de las células leucémicas L-1210. En estas últimas la acción de estos dos nucleótidos es contrabalaceada por un 3er nucleótido, el 3'5' citidin monofosfato cíclico(CMPc)(Bloch y col,1974). En los experimentos que se describen a continuación se analizó la acción de este nucleótido cíclico sobre la biosíntesis de proteínas y ARN tiroideo.

El cuadro 15 muestra la acción del CMPc sobre la incorporación de ³H-uridina a ARN y a la fracción APC soluble. En condiciones basales, dosis progresivas entre 0,35 y 1,5 mM produjeron un escalonado descenso en ambos parámetros. Se estudió entonces la influencia del CPMc sobre la estimulación tiroidea. El cuadro 16 muestra el efecto de 0,2 mM. Esta dosis bloqueó totalmente la acción de la TSH pese a que esa misma dosis no tenía efecto significativo sobre los valores basales de ARN. Asimismo el CMPc bloqueaba la acción del AMPc sobre la incorporación de ³H-Uridina a la fracción APC soluble y a la de ARN(cuadro 17). Por otra parte, como se ve en el cuadro 16, la acción del GMPc fue también inhibida por

FIGURA 9

ACCION DE AMPc Y GMPc SOBRE LA INCORPORACION DE 3 H-URIDINA
A ARN



Cada valor es el promedio de 4 cortes de tiroides \pm 1 D. S.

* : estadísticamente significativo p 0.001 . El medio de incubación contenía 1mM de cafeína o 1 mM de isometilbutilxantina(MIX).

La concentración de los nucleótidos era 1 mM.

CUADRO 15

ACCION DEL CMP_c SOBRE LA INCORPORACION DE ^3H -URIDINA A ARN

Tratamiento	ARN(cpm/mg)	p <	APC soluble (cpm/mg tej.)	p <
Testigos	4351 \pm 827		492 \pm 48	
CMP_c 0,35 mM	1415 \pm 138	0.001	250 \pm 28	0.001
0.70 mM	908 \pm 97	0.001	224 \pm 13	0.001
1.50 mM	717 \pm 74	0.001	212 \pm 13	0.001

Cada valor es promedio de cuatro cortes de tiroides \pm 1 D. S.
Las incubaciones se realizaron en presencia de cafeína 1 mM.

CUADRO 16

ACCION DEL CMP_c SOBRE LA ESTIMULACION POR TSH Y GMP_c
DE LA INCORPORACION DE ^3H -URIDINA A ARN

Experimento	Tratamiento	ARN (cpm/ mg)	p<
A	Testigos	568 \pm 53	—
	TSH 50 mU/ml	733 \pm 49	0.01
	TSH + CMP_c 0.2 mM	462 \pm 20	n. s.
B	Testigos	2183 \pm 311	—
	GMP_c 0.5 mM	3849 \pm 316	0.001
	CMP_c 0.2 mM	1885 \pm 238	n. s.
	GMP_c \pm CMP_c	1750 \pm 178	n. s.

Los valores son promedio de cuatro cortes de tiroides \pm 1 D. S.

A: experimento realizado con tiroides bovina, en USA.

B: experimento realizado con tiroides bovina en Argentina.

CUADRO 17

ACCION DEL CMPc SOBRE LA ESTIMULACION POR AMPc

Tratamiento	³ H-leucina ATA precip cpm/ug proteína	Incorporación de ³ H- uridina			p <
		ARN (cpm/mg)	p <	APC soluble cpm/mg tejido	
Testigos	398	2297 ± 110	—	173 ± 14	—
AMPc 0.7 mM	516	3297 ± 177	0.001 a	237 ± 12	0.001
CMPc 0.7 mM	199	610 ± 80	0.001 a	76 ± 11	0.001
AMPc + CMPc	196	850 ± 74	0.001 a, b	97 ± 12	0.001

Los valores de ³H - leucina son promedio de triplicados cercanos y los de ³H- uridina son cuadruplicados ± 1D. S. Las comparaciones estadísticas fueron hechas con los testigos (a) o con AMPc (b).

el CMPc. Es de destacar que, bajo nuestras condiciones de incubación la incorporación de ^3H -leucina a proteínas tiroideas era lineal con el tiempo (figura 2).

ACCION DE LA GLUCOSA SOBRE LA INCORPORACION DE ^3H -URIDINA A ARN

Como ya se mencionó, trabajos previos de otros autores (Hall, 1963; Hall y Tubmen, 1965; Lindsay y col, 1969) demostraron que la glucosa tiene un efecto estimulador sobre la incorporación de precursores marcados (adenina, formato, orotato) a ARN tiroideo. Estos autores postularon que probablemente esta acción es debida a un aumento de la actividad de la vía metabólica de hexosamonofosfato, que provee el PRPP necesario para la ulterior síntesis de los nucleótidos precursores de ARN. Sin embargo, una explicación alternativa sería que el factor limitante de este proceso fuera la disponibilidad de ATP, necesario para las fosforilaciones celulares, y que la acción de la glucosa, fuera ejercida a través de la producción de ATP. El cuadro 18 muestra que la adición de glucosa, en dosis entre 4 y 24 mM, producía una progresiva estimulación de la incorporación de ^3H -uridina a ARN. Este efecto no fue alterado por la adición de dinitrofenol, 1 mM. Cuando

Cuando se analizó la acción de la glucosa 8 mM, se encontró (cuadro 19), que se producía un aumento, tanto en la radiactividad presente en la fracción ácido soluble (nucleótidos precursores), como en la del ARN. Esta acción de la glucosa es similar a la observada por Lamy y col. 1971, con TSH.

CUADRO 18

ACCION DE LA GLUCOSA SOBRE LA INCORPORACION DE ^3H -URIDINA
A ARN

Tratamiento	ARN % de testigos
Testigos	100 \pm 12
Glucosa 4 mM	151 \pm 19
Glucosa 8 mM	241 \pm 23
Glucosa 16 mM	305 \pm 23
Glucosa 24 mM	366 \pm 21
Dinitrofenol 1 mM	20 \pm 5
Dinitrofenol + glucosa 8 mM	260 \pm 17

Cada valor es promedio de 4 cortes de tejido \pm 1 D. S.

CUADRO 19

ACCION DE LA GLUCOSA SOBRE LA INCORPORACION DE ^3H -URIDI-
NA A ARN Y FRACCION ACIDO SOLUBLE

Tratamiento	APC soluble cpm/mg tejido	ARN (cpm/mg)
Testigos	88 \pm 18	3165 \pm 446
Glucosa 8 mM	172 \pm 27	6242 \pm 574

Cada valor es promedio de triplicados cercanos. Las incubaciones se realizaron en presencia de cafeína 1 mM.

PAPEL DEL CALCIO

Se ha propuesto que el Ca^{++} juega un importante papel en la acción de diferentes hormonas (Rasmussen y col, 1975; Berridge, 1975). En algunos sistemas ha sido vinculado a la elevación del GMPc causada por la carbamilcolina. Se decidió estudiar el papel del Ca^{++} en la regulación de la síntesis de ARN. Para ello se incubaron los cortes de tiroides en tres diferentes medios: KRB usual; KRB preparado sin la adición de Cl_2Ca (produciendo lo que llamaremos depleción "leve" de calcio) (KRB- Ca^{++}); y KRB sin calcio al que se agregó el quelante EGTA en una concentración 2 mM, produciendo lo que llamaremos depleción "severa" de calcio (KRB- Ca^{++} + EGTA). Los cortes de tiroides fueron incubados en las diferentes condiciones durante 30 minutos, utilizando como estimulantes la TSH, el AMPc y el GMPc. Durante 60 minutos se marcó con una dosis trazadora de ^3H -uridina.

El cuadro 20 muestra que cuando los cortes de tiroides fueron sometidos a una depleción "leve" de Ca^{++} , la síntesis basal de ARN disminuyó leve aunque no significativamente. Bajo estas condiciones la respuesta a TSH, AMPc y GMPc estaba notablemente disminuída pero era aun significativa comparada con los testigos. Cuando los cortes fueron incubados en condiciones de depleción "severa" de calcio, la síntesis basal de ARN estaba significativamente disminuída, en tanto que la respuesta a TSH, AMPc y GMPc estaba totalmente abolida.

CUADRO 20

INFLUENCIA DEL Ca^{++} SOBRE LA ESTIMULACION DE LA SINTESIS
DE ARN POR TSH, AMPc Y GMPc.

Solución de Incubación	Testigos	AMPc	GMPc	TSH
KRB	1312 \pm 263	5652 \pm 263	6451 \pm 856	5291 \pm 682
KRB - Ca^{++}	1225 \pm 146	1911 \pm 270	1616 \pm 193	2299 \pm 53
KRB - Ca^{++} +EGTA 2mM	912 \pm 190	1052 \pm 142	1089 \pm 268	938 \pm 248

Los resultados se expresan como cpm/mg ARN y cada valor es promedio de 4 cortes de tiroides \pm 1 D. S. Todas las soluciones contenían 0.1 mM de MIX (isobutilmetilxantina), La concentración de los nucleótidos cíclicos era de 1mM, la de TSH 50 mU/ml. La incorporación sin Ca^{++} fue significativamente menor ($p < 0.001$) que en su presencia, y con EGTA fue significativamente menor que KRB - Ca^{++} ($p < 0.01$ o menos). La estimulación (TSH, AMPc y GMPc) fue significativamente mayor que los controles ($p < 0.01$ o menos), en KRB con o sin Ca^{++} , pero no era significativa en el grupo con EGTA.

En otra serie de experimentos se analizó la influencia de la depleción "leve" de calcio sobre la estimulación con 1 mM norepinefrina. Como puede apreciarse en el cuadro 21 la ausencia de Ca^{++} en el medio de incubación no efectuó en absoluto la acción de la norepinefrina sobre la síntesis de ARN tiroideo.

Microscopía electrónica (gentileza de la Dra. Beatriz Molinari de Rey, CNEA)

Bajo la depleción "leve" de calcio se observaron discretas alteraciones en la estructura tisular, tales como condensación de las mitocondrias, y del retículo endoplásmico rugoso. En cambio, en los cortes incubados en condiciones de depleción "severa" de Ca^{++} se observaron llamativos cambios. Había desorganización celular y alteración de las estructuras subcelulares! las células habían perdido gran parte de sus conexiones intercelulares, las membranas mostraban imágenes de plegamiento y, a veces, pérdida de la continuidad. Las mitocondrias mostraban una profunda condensación y los núcleos estaban muy hinchados, desplazando a los otros componentes celulares.

CUADRO 21

INFLUENCIA DEL Ca^{++} EN LA ESTIMULACION POR NOREPINEFRINA

Tratamiento	ARN(cpm/mg)	%estimulación	p <
Testigos	2410 \pm 180	-	-
Norepinefrina 1mM	4178 \pm 534	174	0.001
KRB - Ca^{++}	2010 \pm 543	-	-
KRB - Ca^{++} + Norepinefrina	3918 \pm 217	196	0.001 (a)

Cada valor es promedio de 4 cortes de tejido \pm 1 D. S. . (a) comparado con testigos con y sin Ca^{++} .

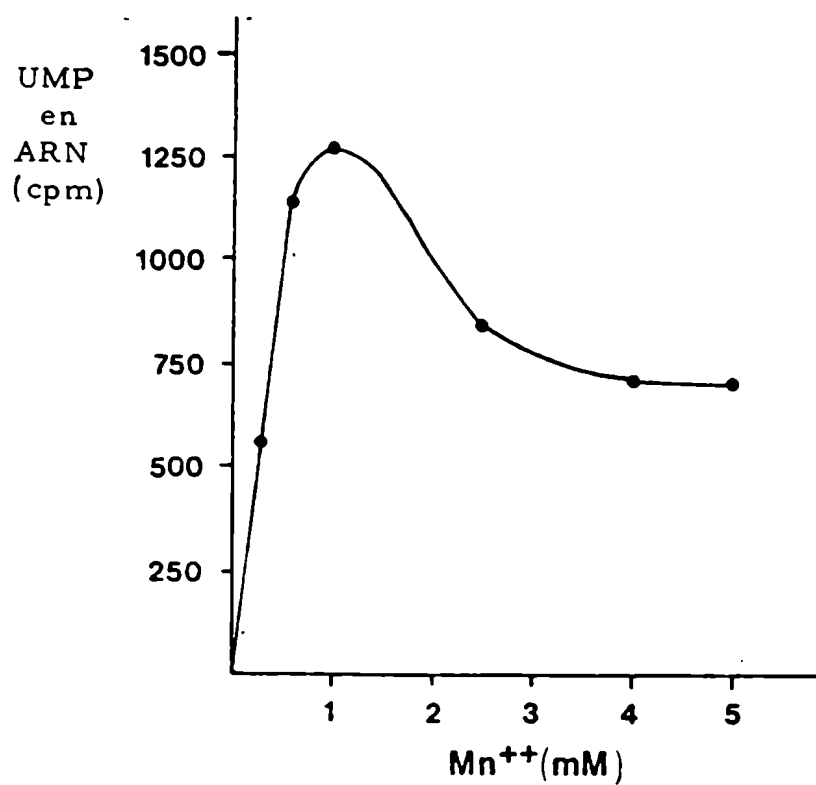
PARTE II

ESTUDIOS CON TIROIDES CANINAS

Con el objeto de demostrar un efecto de la TSH sobre el proceso de transcripción se realizaron estudios con cortes de tiroides bovina incubadas con KRB bajo diferentes condiciones experimentales. Lamentablemente no fue posible demostrar un efecto de esta hormona sobre la transcripción de núcleos aislados provenientes de cortes de tiroides incubados previamente con la TSH. Esto concuerda con las publicaciones realizadas hasta el presente en otros tejidos. Los estudios publicados en la literatura muestran que es posible demostrar un efecto hormonal sobre la transcripción solo si se inyecta la hormona "in vivo" (Jungmann y Schweppe, 1972; Jungmann y col, 1974 en ovario; Fuhrman y Gill, 1974, en adrenal; Farese y Schnure, 1967, en adrenal; Hardin y col, 1976, en útero; Jänne y col, 1976, en riñón; Mishra y Feltham, 1975 en riñón; Pegg y Korner, 1965, en hígado; Piantadosi y col, 1976, en bazo). La única excepción la constituye el trabajo de Adiga y col. (1971) en que se demuestra una acción "in vitro" de TSH en cortes de tiroides porcina.

Es por ello que se decidió estudiar el efecto de la TSH "in vivo" utilizando perros como animales experimentales. En estudios preliminares, se caracterizó el sistema en lo que respecta a tiempo óptimo de incubación, cantidad de núcleos en la misma, concentración óptima de nucleótidos, etc. La figura 10 muestra la curva de requerimiento de Mn^{++} del sistema. Se encontró que la incorporación era óptima con una concentración 1 mM de Cl_2Mn .

FIGURA 10

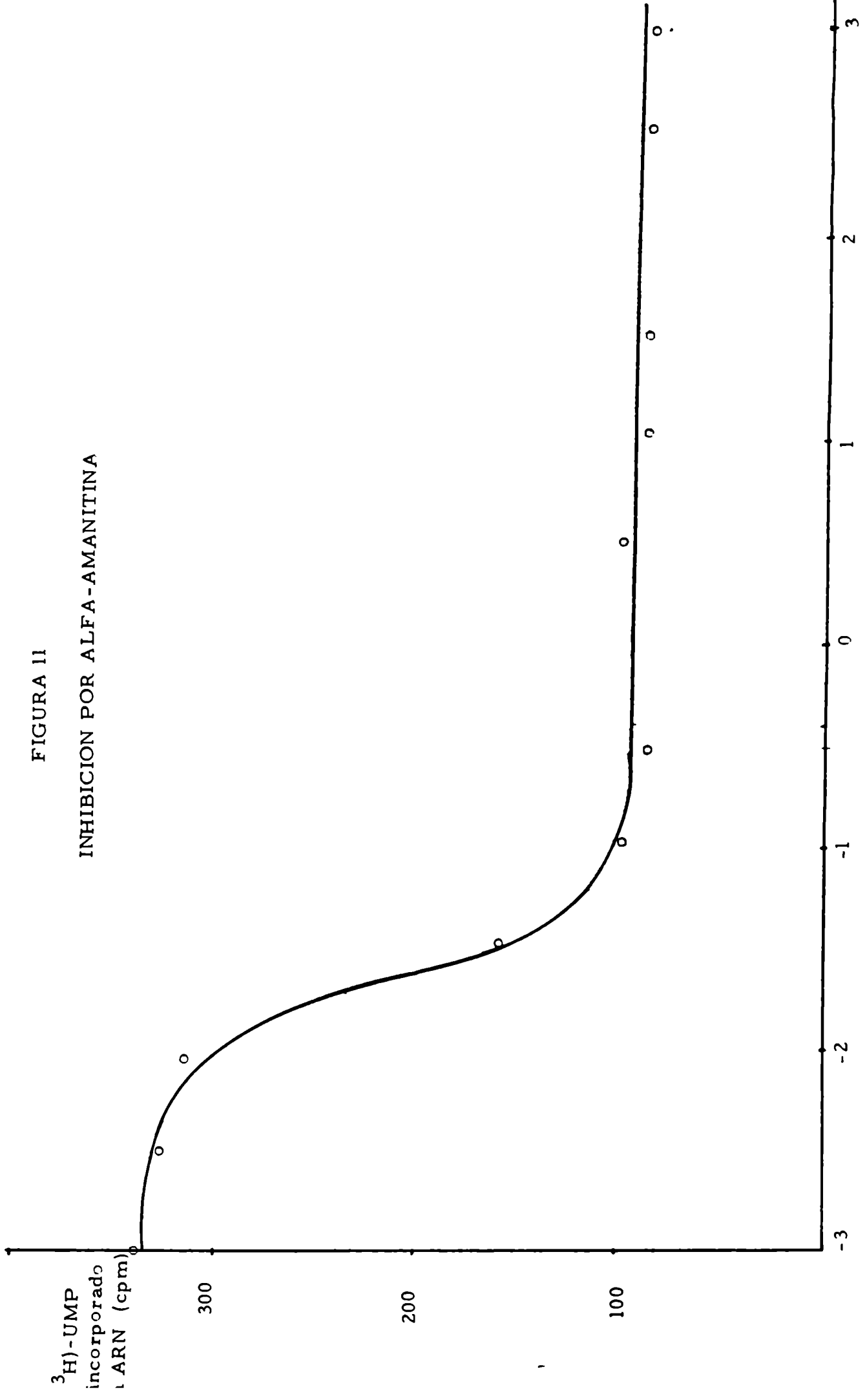
DETERMINACION DE LA CONCENTRACION OPTIMA DE Mn^{++} 

Los resultados se expresan como cpm de UMP incorporadas a ARN por 36 μ g de ADN nuclear.

La transcripción de ADN a ARN tiene lugar por acción de las enzimas ARN polimerasas(I, II y III), recientemente aisladas de tiroides bovinas por Spaulding(1977). La actividad transcripcional debida a cada una de estas enzimas puede ser estimada en base a su diferente sensibilidad a la alfa-amanitina(Weil y col,1977). La figura 11 muestra la curva obtenida incubando nucleos tiroideos en presencia de cantidades crecientes de alfa-amanitina. Esta droga produjo una progresiva disminución de la transcripción, llegando a una meseta con alrededor de 4 $\mu\text{g/ml}$. Esta inhibición era debida al bloqueo de la enzima ARN polimerasa II, involucrada en la síntesis de ARN mensajero. En algunos experimentos pudo observarse una segunda caída de la actividad transcripcional con mayores concentraciones de alfa amanitina. Esta última caída probablemente se debe a una inhibición de la ARN polimerasa III, que existe en pequeña cantidad en tiroides(Spaulding,1977) y ha sido involucrada en la síntesis de ARNs de bajo peso molecular(ARN-t y ARN-r de bajo peso molecular)(Weinman y Roeder,1974). La ARN polimerasa I, vinculada a la síntesis de ARN-r, es resistente a la alfa-amanitina. De esta manera, utilizando la diferente sensibilidad a alfa-amanitina fue posible estimar la actividad debida a ARN polimerasa II(inhibida por 4 $\mu\text{g/ml}$) y la de las ARN polimerasas I + III (resistentes a esa concentración).

El cuadro 22 muestra el efecto de la TSH, administrada 90 minu-

FIGURA II
INHIBICION POR ALFA-AMANITINA



Los resultados se expresan como cpm de ³H-UMP, incorporadas a ARN, por 33 ug de DNA.

CUADRO 22

EFECTO DE LA TSH SOBRE LA TRANSCRIPCIÓN EN NUCLEOS AISLADOS DE TIROIDES CANINA

Tratamiento	Actividad total ^a				ARN polimerasa II ^b				ARN polimerasa I+III ^c				
	Expto.	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Testigos		1742	362	1646	1970	832	257	1206	1338	910	110	440	632
		1909	105	1153	4794	870	36	919	3982	1039	69	234	812
TSH		2984	838	2299	7460	2117	507	1958	5410	867	331	341	2025
		4148	1354	2425	9129	3062	867	1754	6526	1086	487	671	2603
% sobre testigos		95	364	69	145	204	369	75	124	0	357.	50	220
% promedio		.	168	*		193	*				155	**	

Los resultados se expresan como cpm de UMP incorporadas a ARN por 40 ug de ADN: promedio

de duplicados cercanos. a- Actividad de templado endógeno menos blanco a tiempo cero.

b - Actividad total menos actividad alfa amanitina resistente.

c- Actividad alfa amanitina resistente menos blanco a tiempo cero.

..Test de significación calculado segun análisis de variancia(Modelo de efecto fijo) * p<0.003

** p<0.001

tos antes "in vivo", sobre la transcripción de núcleos aislados posteriormente. Puede observarse que la hormona aumentó significativamente la actividad transcripcional total, así como la sensible a alfa-amanitina (ligada a ARN polimerasa II) y la resistente al octapéptido (ligada a las ARN polimerasas I y III). Este aumento de la transcripción causado por la administración de la TSH, puede ser debido ya sea a un aumento de la disponibilidad de templado (ADN), a un aumento de la actividad de las enzimas respectivas, ARN polimerasas, o a ambos mecanismos. Con el objeto de aclarar este aspecto de la acción hormonal se realizaron estudios incubando los núcleos con actinomicina D.

. Esta droga bloquea la transcripción uniéndose a los grupos deoxiguanosina del ADN. Si en esas condiciones se agrega un exceso de templado sintético que no posee deoxiguanosina, en nuestro caso poli(dA. dT), es posible medir la actividad transcripcional con las enzimas endógenas ARN polimerasas como factor limitante. El cuadro 23 muestra los resultados obtenidos en un experimento de este tipo. Los núcleos fueron incubados en presencia de 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de actinomicina D. En presencia de esta concentración del inhibidor casi no hay actividad transcripcional endógena. La adición de cantidades crecientes de templado sintético poli (dA. dT) determina un aumento lineal de la incorporación de la radiactividad a ARN, llegando a un máximo con una concentración de 2 U de DO/ml (ver figura 12). Cuando se analizaron los núcleos obteni-

CUADRO 23

ACTIVIDAD TRANSCRIPTACIONAL CON TEMPLADO SINTETICO

EXOGENO

Tratamiento	(a)				
	Incremento neto en actividad de ARN polimerasa				
	Expto.	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>4</u>
Testigos		925	1416	3053	4378
		1478	805	2090	5316
TSH		1811	2843	2861	8703
		1868	2318	2564	10954
% sobre testigos		53	132	5	103
% promedio				76**	

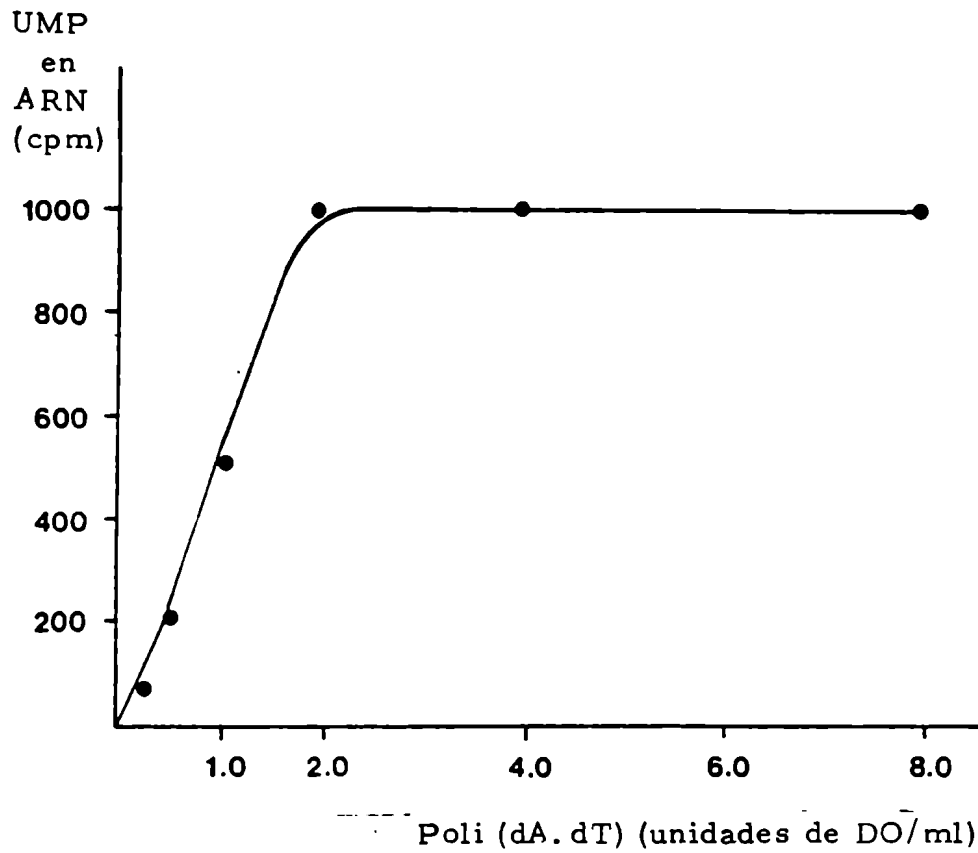
Los resultados se expresan como cpm de UMP incorporadas a ARN por 40 μ g de ADN : promedio de duplicados cercanos.

Test de significación calculado segun análisis de variancia (Modelo de efecto fijo) $p < 0.001$ **

(a)- Actividad sintética en presencia de poly (dA-dT), menos actividad en presencia de 50 μ g/ml de Actinomicina D.

FIGURA 12

REQUERIMIENTO DE TEMPLADO SINTETICO



Los resultados se expresan como cpm de UMP incorporadas a ARN por 31 μ g de ADN.

dos de tiroides de perros testigos y tratados con TSH se observó que la actividad total con templado endógeno (vale decir sin actinomicina D ni templado sintético) estaba aumentada alrededor de 170 % luego de la administración de TSH. Cuando la misma actividad fue medida con templado sintético, el incremento debido a la administración de la TSH fue del 76%.

DISCUSSION

A ACCION DEL YODO Y COMPUESTOS YODADOS

Los presentes resultados proveen una base bioquímica para la acción terapéutica del yodo en el tratamiento del bocio. A este respecto merece destacarse que recientemente se demostró que el contenido de ARN está aumentado en tiroides de personas con bocio y que los valores disminuyen luego del tratamiento con aceite yodado, coincidiendo con la mejoría clínica del bocio(Nicolau y col, 1974) . Aunque el yodo, y compuestos yodados, han sido utilizados con éxito en el tratamiento de estas afecciones no se tenía, hasta el presente, una explicación clara de su mecanismo de acción. Durante mucho tiempo se aceptó que el solo sitio de acción de estos compuestos(hormonas tiroideas fundamentalmente) era a nivel hipofisario, frenando la secreción de la TSH. Sin embargo, estudios posteriores demostraron que si bien en algunas zonas de endemia bociosa la TSH suérica está elevada, (Delange y col, 1975) en otras solo lo está moderadamente(Pisarev y col 1970b), por lo que la acción de estos compuestos debería ejercerse, además, a otro nivel. A este respecto resulta de interés destacar que se ha demostrado que, en ratas sometidas a una crónica deficiencia de yodo, la tiroides es hipersensible a la estimulación con TSH, por lo que dosis consideradas "fisiológicas" pueden llegar a causar bocio (Bray, 1968).

Nuestros estudios demuestran que el efecto del yodo y compuestos yodados tiene lugar directamente sobre la célula tiroidea. Las dosis

utilizadas coinciden con las empleadas farmacológicamente en el ser humano. El yodo y los compuestos yodados tienen dos acciones clínicas manifiestas: una, ostensible en forma mas o menos rápida como es la inhibición de la secreción de las hormonas tiroideas y el bloqueo de la organificación del yodo (efecto Wolff-Chaikoff), y la otra, más lenta, como es la disminución del tamaño del bocio. Los resultados aquí presentados se relacionan fundamentalmente con este último aspecto de la acción del yodo y derivados.

En este trabajo se demuestra que el yodo inhibe la síntesis de ARN tiroideo luego de haber penetrado a la célula y de haber sido organificado (figura 4). Los estudios realizados utilizando ClO_4K y MMI apoyan esta idea y concuerdan plenamente con los estudios realizados sobre la biosíntesis de proteínas (Pisarev y Aiello, 1976). A este respecto es de destacar que otras acciones del yodo sobre la tiroides comparten la misma característica. Burke (1970a) y Green (1970) encontraron que la acción del yodo sobre el metabolismo tiroideo es bloqueado por el ClO_4K y el PTU (droga de acción similar al MMI), lo que coincide con los resultados de Van Sande y Dumont (1973) al estudiar la acción del yoduro sobre la estimulación de la formación de AMPc por la TSH.

Aunque el compuesto intracelular que media la acción del yodo no ha sido aún identificado (algunos autores lo denominan XI). Los conocimientos previos acerca de la fisiología tiroidea sugieren que se trata-

ría de una sustancia relativamente abundante en la glándula, y cuya síntesis sería paralela, hasta un cierto grado, a la concentración intracelular del halógeno. Existen en tiroides dos tirosinas (MIT y DIT) y dos tironinas (T_3 y T_4) que satisfacen estas condiciones. Las primeras no pueden ser consideradas como intermediarias en la acción del yoduro dado que existen en la tiroides la enzima responsable de su dehalogenación (tirosina-dehalogenasa) que actúa sobre estos compuestos, librándoles de su yodo. En cambio las yodotironinas pueden ser postuladas como mediadoras de esta acción. Los resultados aquí presentados muestran que la T_4 , por ejemplo, es capaz de reproducir la acción inhibitoria del IK sobre la síntesis de ARN. Esta acción es demostrable utilizando dos precursores diferentes de la síntesis de ARN (^3H -uridina y ^{32}P), así como distintas técnicas de extracción de ARN (figura 5). Por otra parte las yodotironinas mostraron tener mayor potencia inhibitoria que el IK (cuadro 6). Todos estos resultados muestran que la acción del IK y de las yodotironinas, tanto sobre la biosíntesis de ARN como sobre la de proteínas (Pisarev y Aiello, 1976) poseen características comunes.

Por otra parte, en coincidencia con estudios sobre la biosíntesis de proteínas (Pisarev y Aiello, 1976) y sobre la secreción de las hormonas tiroideas (Pisarev y col, 1971b), se encontró que el IK inhibe la estimulación de estos parámetros causada por TSH y nucleótidos cíclicos. Todos estos resultados señalan que la acción inhibitoria del IK (y de su mediador

intracelular) tiene lugar en un paso bioquímico posterior a la formación de AMPc y GMPc. Esto no excluye otros posibles sitios de acción, tal como fue postulado por Van Sande y Dumont(1973) al estudiar la acción del IK sobre la formación de AMPc estimulada por la TSH. Sin embargo, no está aclarado aún donde actúa el IK para inhibir la síntesis de ARN. Existen varios sitios o pasos metabólicos posibles:

- a) entrada de los precursores de ARN a la célula
- b) metabolismo de los precursores
- c) polimerización de los precursores (transcripción)
- d) degradación del ARN

Los resultados aquí presentados muestran que el IK no altera la entrada de ^3H -uridina a la célula tiroidea, en condiciones en que la marcación de ARN esta significativamente disminuída(cuadro 3). Por otra parte, no se observan variaciones en el espacio extracelular de los cortes de tejido que apoyen la idea de un "secuestro" o dilución de la uridina en este espacio.

El siguiente lugar de acción explorado fue el de los nucleótidos de uridina precursores de ARN. Nuevamente no se encontró diferencia en las distribución de nucleótidos en el cromatograma(cuadro 4). Esto indicaría que el efecto del yoduro tiene lugar en un paso bioquímico posterior a la fosforilación de la uridina. En cierta medida otros resultados obtenidos tambien apoyan este punto de vista . Hemos mostrado que la glucosa tiene un marcado efecto estimulante sobre la

síntesis de ARN y que ello probablemente se deba a una mayor provisión de PRPP para la síntesis de ribonucleótidos (cuadro 18). También hemos observado que el IK inhibe esta acción de la glucosa, (cuadro 8)

En otra serie de estudios, se analizó el probable efecto del IK sobre la degradación del ARN, excluyéndose este sitio de acción (figura 3).

Todos estos resultados llevaron a postular que el yoduro, mediado por un compuesto orgánico de yodo (tironinas?), inhibe la síntesis de ARN a nivel transcripcional. Sin embargo cuando se midió transcripción en núcleos aislados de tiroides bovina no se encontró una acción inhibitoria del IK ni de la T_4 (cuadro 5). La falta de acción del IK era imaginable, dado que ya habíamos demostrado que el halógeno no actúa per se, sino a través de un compuesto orgánico, y en los núcleos aislados faltan los sistemas enzimáticos responsables de la organificación del yodo. Estos resultados son la confirmación de nuestra hipótesis. La falta de acción de la T_4 se puede explicar ya sea porque este compuesto no es el verdadero mediador de la acción del yoduro, o porque antes de inhibir la transcripción debe sufrir algún otro tipo de transformación. Por analogía con lo que sucede con otras hormonas de bajo peso molecular (esteroides), se pensó en la necesidad de su unión previa a algún receptor intracelular. A este respecto debe señalarse que estudios preliminares han mostrado la presencia de

proteínas en fracciones subcelulares de tiroides, que unen las hormonas tiroideas con las características de un receptor, aunque se ignora aún su papel en la regulación glandular (Barbasch y col, 1977).

Por otra parte, este sistema proveía un excelente modelo para estudiar la correlación entre actividad biológica (inhibición de la síntesis de ARN) de los yodocompuestos, y modificaciones en su estructura química. Si bien cabe reconocer que el número de los compuestos analizados hasta el presente es limitado, nos permite extraer algunas conclusiones en lo que respecta a requerimientos mínimos de estructura para que se evidencie la actividad inhibitoria sobre la síntesis de ARN (cuadro 9). La presencia de tres átomos de yodo en la estructura tironínica parece ser necesaria para la actividad biológica, ya que la L-tironina, diyodotironina e isopropil-diyodotironina carecen de efecto. Los átomos de yodo pueden ser reemplazados por otro halógenos, cloro en este caso, con mantenimiento pleno de la acción inhibitoria. En lo que respecta a la cadena alfa amino, su rol parece ser aleatorio. En tanto existe yodo en la molécula (3 o 4 átomos) su reemplazo por grupos acetilo o propionilo (Tetrac, Triac, Tetraprop y Triprop) no altera la acción inhibitoria. Cuando, en cambio, se la reemplaza por los grupos formilo, su acción disminuye notablemente (caso del ácido tetrayodofórmico) o desaparece (ácido triyodofórmico).

Todos estos resultados apoyan la hipótesis postulada por diferentes autores acerca de la existencia de un mecanismo autorregulatorio tiroideo (Halmi y Stuelke, 1956; Ingbar, 1972). En este mismo sentido cabe señalar que se demostró que si a un animal hipofisectomizado se lo somete a una dieta pobre en yodo, es capaz de adaptarse a la nueva situación aumentando la captación de yodo (Studer y Greer, 1968). Se cree que el contenido intratiroideo de yodo (o de algún compuesto yodado) es el factor determinante de este mecanismo adaptativo. Sin embargo, la respuesta tiroidea a la deprivación de yodo es más lenta en condiciones de hipofisectomía, lo que indica la importancia de la TSH en este proceso. Estos mismos autores observaron que en animales enteros sometidos a una dieta pobre en yodo, el aumento significativo de la captación tiroidea de yodo, así como del tamaño glandular (bocio) suele producirse en etapas tempranas, en que los niveles séricos de TSH aún no han aumentado. Coincidiendo con esta observación, Bray (1968) demostró que las ratas alimentadas con dieta pobre en yodo muestran una hipersensibilidad a la acción de TSH. En estos estudios, dosis de TSH que no eran capaces de producir bocio en animales bajo dieta normal, causaban un significativo aumento del peso glandular en los sometidos a dieta pobre en yodo. Estos resultados, así como los de otros autores y los nuestros comentados precedentemente, han llevado al concepto que existe un mecanismo regulatorio intrínseco tiroideo (autorregulación), que está vinculado al contenido de yodo o de un compuesto yodado intratiroideo (tironinas?).

Cuando la concentración glandular de los mismos disminuye, la célula tiroidea activa sus mecanismos (captación, síntesis de hormonas, ARN, etc), en tanto que cuando estos compuestos aumentan (administración de yodo o compuestos yodados) la función tiroidea se deprime (bloqueo de la organificación del yodo o efecto Wolff-Chaikoff, inhibición de la síntesis de AMPc, de la secreción hormonal, de la síntesis de proteínas y ARN, etc). Los resultados nuestros, así como los de los diferentes autores ya mencionados, señalan que la acción inhibitoria del yodo se ejerce a través de un compuesto intracelular y orgánico de yodo. Nuestros resultados apoyan la idea que los responsables de este "feedback" supercorto (retroalimentación) , serían las mismas hormonas tiroideas.

B ACCION DE TSH Y NUCLEOTIDOS CICLICOS

Los presentes resultados confirman la acción de la TSH sobre la incorporación de ^3H -uridina a ARN. Se acepta actualmente que el mecanismo de acción de esta hormona sobre la tiroides involucra su interacción con receptores específicos a nivel de la membrana celular, con subsecuente activación de la adenilato ciclasa y formación de AMPc. Los fundamentos experimentales de este modelo, aplicado a la tiroides, han sido exhaustivamente discutidos (Schell-Frederick y Dumont, 1970; Tong, 1974). En otros sistemas biológicos se ha demostrado que los receptores hormonales corresponden a las características de los llamados receptores alfa o beta adrenérgicos. Nuestros resultados señalan que la acción de TSH sobre la síntesis de ARN estaría ligada a la interacción con un receptor de tipo alfa adrenérgico ya que la fentolamina fue capaz de bloquearla (figura 6), en tanto que el bloqueador beta, propranolol no tenía efecto. En lo que hace a este aspecto de la acción de TSH no existe consenso aun en la literatura. Levey y col (1969) observaron que la acumulación de AMPc y la oxidación de la glucosa estimuladas por TSH son inhibidas tanto por el bloqueo de tipo alfa, fentolamina, como por el propranolol, beta. En cambio Zor y col (1969a) encontraron que la acción de TSH sobre la oxidación de la glucosa era inhibida por un bloqueante beta, propranolol, pero no por otro, el dicloroisoproterenol, o por el bloqueante alfa, fenoxibenzamina. Estas discrepancias

pueden ser explicadas por diferencias experimentales, así como porque los parámetros medidos (oxidación de glucosa, acumulación de AMPc, síntesis de ARN) no son los mismos. Por otra parte la atropina no modificó la acción de la TSH, indicando que los mecanismos colinérgicos no jugarían un papel en la acción de la hormona (figura 6).

Cuando se estudió la acción de los neurotransmisores sobre la incorporación de ^3H -uridina a ARN se encontró que tanto la norepinefrina como la carbamilcolina son capaces de aumentarla. La acción de este último compuesto fue totalmente inhibida por la atropina, indicando la relevancia fisiológica del hallazgo (figura 7). Además, dosis crecientes de FNa también aumentaron la marcación de ARN. Trabajos de Yamashita y Field (1972) y de Van Sande y col (1975a) han demostrado que tanto la carbamilcolina como el FNa son capaces de aumentar el GMPc intracelular en cortes de tiroides canina. Por lo tanto la acción de estos compuestos sobre la síntesis de ARN se asemeja a la del GMPc, tal como se demuestra en esta tesis (vide infra). La norepinefrina, en una concentración 1 mM, aumentó significativamente la marcación de ARN, pero fue inefectiva a 10^{-6} M (dato no mostrado). Recientemente se ha demostrado que la norepinefrina, 1 mM, produce un aumento de AMPc y de GMPc en tiroides de perro, en tanto que a 10^{-6} M aumenta sólo a este último nucleótido cíclico (Kabak y Spaulding, 1976). Estos resultados sugerirían que, bajo nuestras condiciones experimentales,

la acción de la norepinefrina sería mediada fundamentalmente, a través del AMPc.

El papel de las prostaglandinas en la regulación de la función tiroidea es aún tema de controversia. En un intento de demostrar una acción de estos compuestos sobre la incorporación de ^3H -uridina a ARN, realizamos incubaciones bajo diferentes condiciones (cuadro 11). Bajo ninguna de ellas se pudo demostrar una acción estimulante. Sin embargo, bajo similares condiciones de incubación, la PGE_1 aumentó la organificación del yodo (cuadro 12), tal como fue demostrado previamente por Rodesch y col (1969). Por otra parte, y en apoyo a la falta de acción de las prostaglandinas sobre la síntesis de ARN, el efecto estimulador de la TSH no fue alterado por la adición de aspirina o indometacina, ambos inhibidores de la prostaglandina sintetasa (cuadro 10). Estos resultados concuerdan con los de Wolff y Moore (1973) quienes estudiaron el efecto de la indometacina sobre la oxidación de glucosa, secreción hormonal y actividad de adenilato ciclasa estimuladas por TSH. Por lo tanto cabe concluir de nuestros resultados que las prostaglandinas no jugarían un papel en la regulación de la incorporación de ^3H -uridina a ARN tiroideo. Otros autores han postulado que las prostaglandinas están implicadas en la regulación de la oxidación de la glucosa y estimulación de la adenilato ciclasa, pero no en la incorporación de ^{32}P a fosfolípidos, (Zor y col. 1969 a). Onaya y Solomon, (1970), encontraron que la PGE_1 estimulaba la formación de gotas de coloide y la liberación

de ¹³¹I . Sin embargo, Wolff y Moore(1973) concluyen que "la síntesis de prostaglandinas no es un paso obligatorio en la activación de la oxidación de la glucosa, la secreción hormonal y la formación de AMPc" por la TSH. Esta opinión coincide con la de Mashiter y col(1974). Los datos contradictorios de la literatura hacen difícil aún una conclusión acerca del papel de las prostaglandinas en la regulación tiroidea. Por ejemplo, se ha demostrado que la PGE₁ aumenta los niveles de AMPc tiroideos(Mashiter y col,1974;Sato y col,1972;Van Sande y Dumont,1973). Para explicar estas discrepancias se han postulado diversas hipótesis. Haye y col(1974) sugirieron la existencia de diferentes "pools" intracelulares de prostaglandinas. Por otro lado el AMPc podría estar compartimentalizado(Terasaki y Brooker,1977) respondiendo cada uno de ellos a diferentes mecanismos de regulación. Sin embargo, la falta de datos experimentales en tiroides hace difícil por ahora una elaboración racional de este problema.

La glucosa, en cantidades crecientes, produjo un progresivo aumento de la incorporación de ³H-uridina a ARN(cuadro 18). Trabajos previos(Lindsay y col,1969;Hall,1962,1963;Hall y Tubmen,1965) mostraron que esta sustancia aumenta la incorporación de precursores (adenina, formato, orotato) a ARN. Además, Lindsay y col(1969) encontraron que la glucosa aumenta los nucleótidos pirimidínicos, proveyendo el sustrato para la síntesis de ARN. Esta acción de la glucosa podría explicarse por una estimulación de la vía hexosamonofosfato o, alternativa-

mente, por un aumento del ATP intracelular, consecutivo a la oxidación de la glucosa. En este último caso cabría suponer que la cantidad de ATP es un factor limitante de la fosforilación de los precursores de ARN. La demostración, en nuestro trabajo, que la acción de la glucosa sobre la marcación de ARN no es afectada por la adición de dinitrofenol nos permitiría excluir esta última hipótesis y apoyar la propuesta de Lindsay y col(1969).

En lo que concierne a los nucleótidos cíclicos, los resultados aquí presentados confirman nuevamente la acción paralela de AMPc y de GMPc. Ambos compuestos aumentaron significativamente la marcación de ARN a partir de ^3H -uridina, y esta acción fue inhibida por la actinomicina D(figura 8). La demostración de un incremento significativo en la proporción de ^3H -UTP en el cromatograma provee una explicación para la estimulación de la síntesis de ARN. A este respecto cabe destacar que Lamy y col(1971) postularon que uno de los sitios de acción de la TSH era la etapa de la fosforilación de los nucleótidos precursores de ARN. Por otra parte, Peck y col(1974), estudiando la acción de la hormona paratiroidea sobre la síntesis de ARN en células de hueso aisladas, también encontraron que esta hormona proteica tiene como uno de los sitios de acción la fosforilación de los nucleótidos precursores de ARN. En este mismo aspecto resalta la similitud entre la acción de la TSH y de la glucosa, aunque no puede decirse aun con certeza que ambos

mecanismos sean iguales.

La acción paralela de AMPc y GMPc sobre diferentes parámetros tiroideos es aun objeto de conjeturas, a falta de una explicación para la existencia de dos sistemas paralelos. Como ya se mencionó, la regulación de la concentración de ambos nucleótidos, sin embargo, obedece a muy diferentes factores. La TSH, probablemente a través del sistema adrenérgico (receptor alfa?) regula los niveles de AMPc; El sistema parasimpático, a través de los mediadores colinérgicos y el Ca^{++} , modula la producción de GMPc. En nuestros estudios, si bien AMPc y GMPc tuvieron las mismas acciones, sus efectos no fueron aditivos (figura 9). Una posible explicación a este hecho la dan los experimentos de Appleman y Terasaki (1975), confirmados para la tiroides por Erneux y col (1977). Se ha demostrado que el GMPc es capaz de estimular la actividad de la fosfodiesterasa del AMPc. Vale decir que es probable que, en nuestras condiciones experimentales, el GMPc ejerza las dos acciones: estimular el metabolismo respectivo (síntesis de proteínas, ARN, etc), e impedir el aumento del AMPc, estimulando su hidrólisis. Esto explicaría la falta de aditividad observada en nuestros estudios.

Se sabe por otra parte que estos nucleótidos cíclicos actúan mediante la fosforilación de sustratos específicos, a través de las enzimas proteína quinasas (PQ), de ubicua distribución en la célula. En el caso de la tiroides, aunque se ha detectado la presencia de PQs en diferentes fracciones subcelulares, sensibles o independientes de los nucleótidos, así co-

como algunas proteínas cuya fosforilación ejercen, no se ha logrado aún ligar estos fenómenos con funciones específicas celulares.

Con la intención de disociar las acciones de AMPc y GMPc se estudió la influencia del Ca^{++} en sus efectos. Los resultados obtenidos demuestran que ambos nucleótidos tienen los mismos requerimientos de Ca^{++} , similares a la TSH. Los estudios de microscopía electrónica han dado muestras inequívocas de lo poco fisiológico que es realizar estudios incubando sin Ca^{++} y en presencia de EGTA. Las profundas alteraciones morfológicas encontradas restan validez a resultados bajo estas condiciones (por ejemplo Van Sande y col 1975).

La demostración de la acción de un tercer nucleótido cíclico, el 3' 5' citidin monofosfato cíclico (CMPc) abre nuevas perspectivas en el campo de regulación tiroidea. Este compuesto, en dosis relativamente bajas, inhibe parámetros tiroideos basales y estimulados, ya sea por TSH, AMPc y GMPc (cuadro 16 y 17). Esto sugeriría que la acción del CMPc se ejerce en un paso bioquímico posterior a la síntesis de AMPc y GMPc. Evidentemente restan diferentes estudios por realizar antes de asignar al CMPc un papel en la fisiología tiroidea. Como un primer paso, en estudios no publicados, hemos logrado (en colaboración con el Dr. A. Bloch, Roswell Park Memorial Institute, Buffalo, NY) determinar la existencia del CMPc en la tiroides. Restan aún por determinar los factores que lo regulan, así como la correlación de las variaciones en su nivel con diferentes funciones

tiroideas. A este respecto cabe destacar que fue Bloch (1974) qui en descubrió la existencia del CMPc en un cultivo de células leucemicas L-1210. Posteriormente Bloch y col (1974) encontraron que el CMPc antagoniza las acciones de AMPc y GMPc sobre el crecimiento de estos tejidos, en forma similar a nuestros resultados. Mas recientemente se ha demostrado en hígado la existencia de la citidilato ciclasa, enzima encargada de la síntesis del CMPc (Ceche y Ignarro, 1978) así como de una fosfodiesterasa específica para este nucleótido(Cheng y Bloch , 1978)

Si bien nuestros estudios demuestran que uno de los sitios de regulación por la TSH de la síntesis de ARN es la etapa de la fosforilación de los nucleótidos precursores (cuadro 19), esta acción sería, evidentemente, muy difícil de entender como la clave de la especificidad de la acción hormonal. De ahí el interés en analizar el efecto de la TSH sobre el proceso de transcripción de ADN a ARN. Nuestros estudios demuestran que la hormona tiene un efecto estimulatorio temprano sobre la síntesis de ARN. Trabajos previos de Spaulding(1977) demostraron que la espermina y espermidina son potentes estimulantes de la ARN polimerasa II purificada de tiroides bovina . Esto llevó a Scheinmany Burrow (1977) a postular que la enzima ornitina decarboxilasa (ODC) jugaría un importante papel en la regulación de la síntesis de ARN. Estos autores , al igual que Spaulding , demostraron que la TSH es capaz de aumentar de manera muy importante, la actividad de la ODC tiroidea. Sin embargo, en ambos estudios esta estimulación no era aparente hasta por lo menos 4 horas post- TSH. Dado que nosotros hemos

logrado una significativa estimulación de la transcripción a sólo 90 minutos de administrada la TSH, debería descartarse la idea que la ODC jugara un papel, por lo menos en la regulación temprana de este proceso.

El aumento en la transcripción observado en estos estudios podría deberse a modificaciones en el templado (ADN), o en las enzimas, ARN polimerasas. Los experimentos realizados utilizando actinomicina D y templado sintético han dado una respuesta a este interrogante (cuadro 23). Bajo nuestro diseño experimental, la TSH aumenta tanto la disponibilidad del templado como la actividad de las ARN polimerasas. En este sentido cabe señalar que se ha encontrado que la hormona de crecimiento, tiene un efecto similar en ovario (Jungmann y Schweppe, 1972 b).

En lo que concierne al aumento en la disponibilidad del templado se han sugerido diversos mecanismos. Algunos autores han vinculado este fenómeno con la fosforilación y acetilación de proteínas no histónicas que forman parte de la cromatina. Esto causaría una "derepresión" genética. El reciente hallazgo de que la TSH estimula la fosforilación de una proteína no histónica (Spaulding y Schubart, a publicarse) podría tener relación con este proceso. En lo que respecta a la activación de las ARN polimerasas los trabajos de Jungman y col(1974), han demostrado que en ovario, esto se debe a un aumento de la actividad enzimática y no de la síntesis de enzima. Estos autores sugirieron que este aumento de la actividad enzimática se debería a la fosforilación de las moléculas de la enzima.

CONCLUSIONES

De todos estos estudios cabe concluir que se ha avanzado en el conocimiento del mecanismo de acción de los agentes relacionados con la producción e involución del bocio. En lo que respecta al yodo y compuestos yodados se han dado las bases bioquímicas para explicar su acción terapéutica. Nuestros resultados muestran que el yoduro, a través de un compuesto intracelular y organificado, es capaz de inhibir la síntesis de ARN tiroideo. Esta acción probablemente se ejerce sobre el proceso de transcripción de ADN a ARN aunque probablemente no de una manera directa sino previa unión a un "receptor" intratiroideo. La demostración de una acción directa de las hormonas tiroideas sobre la glándula dan apoyo a la idea que, además de la regulación ejercida a través de las fluctuaciones de la TSH circulante, existe un mecanismo autoregulatorio tiroideo. (Studer y Greer, 1968, Ingbar, 1972). Este estaría dado por los niveles intracelulares de hormonas tiroideas quienes ejercerían una modulación negativa, probablemente tanto sobre la formación del AMPc como en una etapa posterior a la síntesis de los nucleótidos cíclicos (AMPc y GMPc).

Los factores estimulantes de la síntesis de ARN canalizan su acción a través de dos sistemas aparentemente paralelos, aunque interrelacionados. La TSH hipofisaria, a través de su interacción con un receptor de tipo alfa adrenérgico, activa la formación de AMPc. El sistema colinérgico, por su lado estimula la acumulación de GMPc probablemente en un mecanismo Ca^{++} - dependiente. Ambos nucleótidos cíclicos aumentan la síntesis de ARN

por probable estímulo del reservorio de nucleótidos precursores. Por otro lado el CMPc jugaría un papel contrarregulatorio modulando negativamente la función tiroidea. Esta es la primera evidencia acerca de la existencia de un mecanismo antagónico al de AMPc y GMPc en la tiroides. Las acciones a nivel de los nucleótidos precursores de ARN proveen un mecanismo de estímulo a la síntesis global de ARN.

La demostración de una acción directa de la TSH sobre el proceso de transcripción, da la base para un estudio de una modulación de la función tiroidea más específica (ARN mensajeros de proteínas características).

El mecanismo para esta acción sería, al igual que lo demostrado para otra hormona hipofisaria, a dos niveles. Por un lado aumentando la disponibilidad de templado por el otro activando las enzimas encargadas de su lectura, las ARN polimerasas. Es de esperar que los futuros estudios, contribuyan a terminar de aclarar los mecanismos bioquímicos, responsables de la regulación tiroidea.

BIBLIOGRAFIA

- Adiga P. R. , Murthy P. V. N. y McKenzie J. M.
Biochemistry, 10, 702, (1971)
- Ahn, S. C. , y Rosenberg I. N.
Endocrinology 86, 396 (1970)
- Allfrey V. G. in
Histones and Nucleohistones , Phillips D. M. P. ed, Plenum Press
241 (1971)
- Appleman M. M. y Terasaki W. L.
Adv. Cyclic Nucl. Res. 5, 153 (1975)
- Barmasch M. , Altschuler N. y Pisarev M. A.
Comunicación al 5º Congreso Argentino de Biología y Medicina
Nuclear, Buenos Aires, (1977)
- Barmasch M. , Pisarev M. A. y Altschuler N.
Acta endocr. panamer. 4, 19 (1973)
- Bastomsky C. H. y Mc Kenzie J. M.
American J. Physiol. 213, 753 (1967)
- Berridge M. J. in
Adv. Cyclic Nucleotide Res. 6, 1 (1975)
- Blackburn N. M. y Kostyo J. L.
Biochim. Biophys. Acta (Amst) 107, 168 (1965)
- Blatti S. P. , Ingles C. J. , Lindell T. J. , Morrie P. W. , Weaver R. F.
Weinberg F. y Rutter W. J. en
Cold Spring Harbor Symp . Quant. Biol. 35, 649 (1970)
- Blinks J. R.
Ann. N. Y. Acad. Sci. , 149, 673 (1967)
- Bloch A.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 58, 652 (1974)
- Bloch A. , Dutschman G. y Mane R.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 59, 955, (1974)

- Boeynaems J. M. , Van Sande J. , Pochet R. y Dumont J. E.
Molecular and Cellular Endocrinology, 1,139 (1974)
- Bray G. A.
J. Clin. Invest. 47, 1640 (1968)
- Burke G.
J. Clin. Endocr. Metab. 30, 76 (1970) a.
- Burke G.
Am. J. Physiol. 218,1445 (1970) b.
- Burke G.
Prostaglandins 2, 413 (1972)
- Burton K.en
Methods in Enzymology, v. XIIB, L. Grossman y K. Moldave,
eds. , Academic Press, N. Y. ,163 (1968)
- Butcher R. W. y Sutherland E. W.
Ann. N. Y. Acad. Sci. ,139, 849 (1967)
- Callantine M. R. , Humprey R. R. y Lee S.
Endocrinology 76, 332 , (1965)
- Cech S. Y. y Ignarro L. J.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 80, 119 (1978)
- Cheng Y. C. y Bloch A.
J. Biol. Chem. 253, 2522 (1978)
- Civen M. , Brown C. B. y Hilliard J.
Biochim. Biophys. Acta (Amst), 114, 127 (1966)
- Creek R. O.
Endocrinology76, 1124 (1965)
- Davidson E. H. y Britten R. J.
Quart. Rev. Biol. 48, 56 (1973)
- Debons A. F. y Pittman J. A.
Endocrinology 70, 937 (1962)

- Delange F. M. y Ermans A. M.
Pharmac. Ther. C ,1, 57 (1976)
- De Nayer P.
Biochimie 55, 1507 (1973)
- Dumont J. E.
Compt Rend. Soc. Biol. 155, 2225 (1961)
- Dumont J. E.
Ann. Soc. Roy. Sci Med. Natur. (Bruxelles), 18,105 (1965)
- Dumont J. E.
Vitam and Horm. 29, 288 (1971)
- Dumont J. E. , Boeynaems J. M. , Van Sande J. , Erneux C. , Decoster C. Van Cauter E. , and Mockel J. , en
First European Symposium on Hormones and Cell Regulation. Eds. Dumont J. E. and Nunez J. , Elsevier, North Holland Biomedical Press, pag. 171 (1977)
- Elgin S. C. R. and Weintraub H.
Ann. Rev. Biochem. , 44, 725 (1975)
- Erneux C. , Van Sande J. , Dumont J. E. y Boeynaems J. M.
Eur. J. Biochem. . 72, 137 (1977)
- Fain J. N. , Galton D. J. y Kovacev V. P.
Molec. Pharmacol. 2, 237 (1966)
- Farese R. V. y 'chnure J. J.
Endocrinology 80, 872 (1967)
- Fiala S. , Sproul E. E. y Fiala A. E.
J. Biophys. Biochem. Cytol. 2,115 (1956)
- Fiala S. , Sproul E. E. y Fiala A. E.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 94, 517 (1957)
- Field J. B. , Zor U. y Kaneko T.
Program of the 51st Meeting of the Endocrine Society, pag. 98, (1969)
- Field J. B. , Dekker A. , Zor U. y Kaneko T.
Ann. N. Y. Acad. . Sci. 180 , 278 (1971)

- Friedman Y. y Burke G.
Program of the 58th Annual Meeting of the Endocrine Society,
San Francisco, pag 103 (1976)
- Fuhrman S. A. y Gill G.
Endocrinology 94, 691 (1974)
- Fuhrman S. A. y Gill G. N.
Biochemistry 14 , 2925 (1975)
- Gafni M. y Gross J.
Endocrinology 97, 1486 (1975)
- Gafni M., Sirkis N. y Gross J.
Endocrinology 97, 1256 (1975)
- Goldberg N. D. , Haddox M. K. , Estensen R. , Lopez C y Hadden J. W. , en
Cyclic AMP, Cell Growth and the Immune Response. Braun W. ,
Lichtenstein L. M. and Parker C. W. , eds. , Springer-Verlag, N. Y.
1973, 247.
- Green W. L.
Endocrinology 86, 706 (1970)
- Hall R.
Biochem. Biophysic. Acta (Amst) 61, 530 (1962)
- Hall R.
J. Biol. Chem. 238, 306 (1963)
- Hall R. y Tubmen J.
J. Biol. Chem. 240, 3132 (1965)
- Halmi N. S. y Stuelke R. G.
Metabolism 5, 646 (1956)
- Hardin J. W. , Clark J. H. , Glasser S. R. y Peck E. J. Jr.
Biochemistry 15, 1371 (1976)
- Haye B., Champion B. y Jacquemin C.
Febs Letters 41, 89 (1974)
- Illiano G. , Tell G. P. , Siegel M. I. y Cuatrecasas P.
Proceed. Natl. Acad. Sci. U. S. , 70, 2443 (1973)

- Ingbar S. H.
Mayo Clinic Proceedings 47 , 814 (1972)
- Jänne J. Bardin C. W. y Jacob S. T.
Biochemistry 14, 3589 (1975)
- Jänne O. , Bullock L. P. , Bardin C. W. y Jacob S. T.
Biochim. Biophys .Acta 418 , 330 (1976)
- Johnson J. D. , Douvas A. S. y Bonner J.
Int. Rev. Cytol. Suppl. 4, 273 (1974)
- Jungmann R. A. y Schweppe J. S.
J. Biol. Chem. 247, 5535 (1972) a.
- Jungmann R. A. y Schweppe J. S.
J. Biol. Chem. 247 , 5543 (1972)b.
- Jungmann R. A. , Hiestand P. C. y Schweppe J. S.
J. Biol. Chem. 249, 5444 (1974).
- Kabak J. y Spaulding S. W.
Abstract of the 58th Annual Meeting , Endocrine Society,
pag 188, (1976)
- Kaneko T. , Zor U. y Field J. B.
Science 163, 1062 (1962)
- Kerkof P. R. y Tata J. R.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 28, 111 (1967)
- Kerkof P. R. y Tata J. R.
Biochem. J. 112, 729 (1969)
- Kish V. M. y Kleinsmith L. J.
J. Biol. Chem. 249, 750 (1974)
- Korner A. y Hogan B. L. M. en
Growth and Growth Hormone, Excerpta Medica, Amsterdam,
ICS 244, pag 98, (1971)
- Kostyo J. L. y Engel F. L.
Endocrinology 67, 708, (1960)

- Krebs H. A. y Henseleit K.
Z. Physiol. Chem. 210, 33 (1932)
- Kuehl Jr. F. A. , Humes J. L. , Tarnoff J. , Cirillo V. J. y Hamm E. A.
Science 169, 883 (1970)
- Kuehl Jr. F. A. , Humes J. L. , Mander L. R. , Cirillo V. J. , Zanetti M. E.
y Ham E. A.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 44, 1464 (1971)
- Kuo J. F. y Greengard P.
Proceed. Natl. Acad. Sci. U. S.A. 64, 1349 (1969)
- Kuo J. F. , Krueger B. K. , Sanes J. R. y Greengard P.
Biochim. Biophys. Acta 212, 79 (1970) a.
- Lamy F. Willems C. Lecocq R. Delcroix C. y Dumont J. E.
Hormone and Metabolic Research 3, 414 (1971)
- Lecocq R. y Dumont J. E.
Biochim. Biophys. Acta 281, 434 (1972)
- Levey G. S. , Roth J. y Pastan I.
Endocrinology 84, 1009 (1969)
- Lindsay R. H. , Cash A. G. y Hill J. B.
Endocrinology 84, 534 (1969)
- Lindsay R. H. y Cohen P. P.
Endocrinology 76, 737 (1965)
- Lissitzky S. , Fayet G. Verrier B. , Hennen G. y Jaquet P.
Febs Letters 29, 20 (1973)
- Lowry O. H. , Rosebrough N. J. , Farr A. L. y Randall R. T.
J. Biol. Chem. 193, 265 (1951)
- Maayan M. L. , Debons A. F. , Volpert E. M. y Krimsky I.
Metabolism 26, 473 (1977)

- Maayan M. L. y Ingbar S. M.
Science 162, 124 (1968)
- Maayan M. L. y Ingbar S. H.
Endocrinology 87, 585 (1970)
- Macchia V. y Varrone S.
Febs Letters 13, 342 (1971)
- Mandel J. L. y Chambon P.
European J. Biochem 41, 363 (1974)
- Manley S. W., Bourke J. R. y Hawker R. W.
J. Endocr. 61, 419 (1974)
- Marshall N. J. en
Eukaryotic Cell Function and Growth, Eds. Dumont J. E.
Brown B. L. y Marshall N. J., Plenum Press, N. Y. pag 125, (1976)
- Mashiter K., Mashiter G. D. y Field J. B.
Endocrinology 94, 370 (1974)
- Matovinovic J. y Vickery A. L.
Endocrinology 64, 149 (1959)
- Melander A.
Acta Physiol. Scand. 83 (suplem. 370), 1 (1971)
- Melander A., Nilsson E. y Sundler F.
Endocrinology 90, 194 (1972)
- Melander A., Sundler F. y Ingbar S. H.
Endocrinology 92, 1269 (1973)
- Melander A., Ericson L., Sundler F. y Westgren V.
Rev. Physiol Biochem. Pharmacol 73, 39 (1975)
- Melander A., Ericson L. E. y Sundler F.
Life Sci. 14, 237 (1974)
- Mishra R. K. y Feltham L. A.
Can. J. Biochem. 53, 70 (1975)
- Moore W. V. y Wolff J.
J. Biol. Chem. 249, 6255 (1974)

- Munro H. N. y Fleck A. en
Glick D. Ed., *Methods in Biochemical Analysis* 1st ed. Vol 14
John Wiley & Sons, New York, N. Y. (1966), 113
- Nicolau W., Medeiros-Neto G. A., Takeda A. y Ulhoa - Cintra A. B.
PAHO, WHO, public. cientif. N°292, 255 (1974)
- Nyberg L. M. y Wang T. Y.
J. Steroid Biochem. 7, 267 (1976)
- Ochi Y. y De Groot L. J.
Endocrinology 84, 1409 (1970)
- Onaya T. y Solomon D. H.
Endocrinology 86, 423 (1970)
- Paladini A. C. y Leloir L. F.
Biochem J. 51, 426 (1952)
- Pastan I., Herring B., Johnson P. y Field J. B.
J. Biol. Chem. 236, 340 (1961)
- Pastan I., Macchia V. y Katzen R.
Endocrinology 83, 157 (1968)
- Peck W. A., Messinger K., Kimmich G. y Carpenter J.
Endocrinology 95, 289 (1974)
- Pegg A. E. y Korner A.
Nature, 205 904 (1965)
- Perry R. P.
Ann. Rev. Biochem 45, 605 (1976)
- Perry R. P., de la Torre A. y Greenberg J. R.
Biochim. Biophys. Acta (Amst), 262 220 (1972)
- Piantadosi C. A., Dickerman H. W. y Spivak J. L.
J. Clinical Investigation 57, 20 (1976)
- Pisarev M. A. De Groot L. J. y Wilber J. F.
Endocrinology 87, 339 (1970) a).
- Pisarev M. A., Utiger R. D., Salvaneschi J. P., Altschuler N. y
De Groot L. J.
J. Clin. Endocr. Metab. 30, 680 (1970) b).

- Pisarev M. A. , De Groot L. J. , Wilber J. F. y Altschuler N.
Endocrinology 88, 1074 (1971) a.
- Pisarev M. A. , De Groot L. J. y Hati R.
Endocrinology 88, 1217 (1971) b
- Pisarev M. A. y Itoiz M. E.
Endocrinology 90, 1409 (1972)
- Pisarev M. A. y Altschuler N.
Acta Endocr. (Kbh) 74, 703 (1973)
- Pisarev M. A. y Aiello L. O.
Acta endocr. (KBH), 82, 298 (1976)
- Pochet R. , Boeynaems J. M. y Dumont J. E.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 58 , 446 (1974)
- Raina A. y Janne J.
Fed. Proceed. 29. , 1568 (1970)
- Rapoport B. , West M. N. y Ingbar S. H.
Endocrinology 99, 11 (1976)
- Rapoport B. , West M. N. y Ingbar S. H.
J. Clin. Invest. 56, , 516 (1975)
- Rasmussen H. , Jensen P. Lake W. , Friedmann N. y Goodman D. B. P.
Advances in Cyclic Nucleotide Res. 5, 375 (1975)
- Robinson G. A. , Butcher R. W. y Sutherland E. W.
Cyclic AMP, Academic Press , New York, (1971)
- Rodesch F. Neve P. , Willems C. y Dumont J. E.
Europ. J. Biochem 8, 26 (1969)
- Sato S. , SZabo M. , Kowalski K. y Burke G.
Endocrinology 90, 343 (1972)
- Scheinman S. J. y Burrow G. N.
Endocrinology 101, 1088 (1977)

- Schell- Frederick E. y Dumont J. E. en
Litwack, Ed. *Biochemical Actions of Hormones*, Vol 1. Academic
Press; N. Y., 415, (1970)
- Schultz G., Hardman J. G., Schultz K., Baird C. E. y Sutherland, E. W.
Proceed. Natl. Acad Sci. U. S. 70, 3889 (1973)
- Sherwin J. R. y Tong W.
Endocrinology 94, 1465 (1974)
- Sherwin J. R. y Tong W.
Biochim. Biophys. Acta 404, 30 (1975)
- Sherwin J. R. y Tong W.
Biochim. Biophys. Acta 425, 502 (1976)
- Snyder S. H. y Russell D. H.
Fed. Proceed. 29, 1575 (1970)
- Spaulding S. W. y Birrow G. N.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 59, 386 (1974)
- Spaulding S. W.
Endocrinology 100, 1039 (1977)
- Studer H. y Green M. A. en
The regulation of thyroid function in iodine deficiency.
H. Huber publ., Bern (1968)
- Sutherland E. W., Rall T. W. y Menon T. S.
J. Biol. Chem. 237, 1220 (1962)
- Sutherland E. W., Robinson G. A. y Butcher R. W.
Circulation 37, 279 (1968)
- Swillens S, Van Cauter E. y Dumont J. E.
Biochim. Biophys. Acta 364, 250 (1974)
- Takasu N., Sato S., Tsukui T., Yamada T., Furihata R, y Makiuchi M.
J. Clin. Endocr. Metab. 39, 772 (1974)
- Tata J. R.
*Ciba Found. Symp. on Polypeptide hormones: Molec. & Cell
Aspects.* Elsevier, N. Y. (1976), 297.

- Terasaki W. L. y Brooker G.
J. Biol Chem. 252, 1041 (1977)
- Tong W.
Handbook of Physiol. Sect 7. Endocr. Vol III. Thyroid, p. 255 (1974)
Sect. Eds. Greep R. O., Astwood E. B.; Vol Eds. Greer, Solomon
D. H., Amer. Phys. Soc. Wash. D. C.
- Turkington R. W.
J. Biol. Chem. 245, 6690 (1970)
- Turtle J. R. y Kipnis D. M.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 28, 797 (1967)
- Van Dyke K. y Katzman P. A.
Endocrinology 83, 107 (1968)
- Van Sande J. y Dumont J. E.
Biochim. Biophys. Acta 313, 320 (1973)
- Van Sande J., Decoster C. y Dumont J. E.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 62, 168 (1975)a.
- Van Sande J., Grenier G., Willems C. y Dumont J. E.
Endocrinology 96, 781 (1975)b.
- Weil A. P., Sidikaro J., Stancel G. M. y Blatti S. P.
J. Biol. Chem. 252, 1092 (1977)
- Weimann R. y Roeder R. G.
Proceed. Natl. Acad. Sci. 71, 1790 (1974)
- White A. A. y Aurbach G. D.
Biochim. Biophys. Acta 191, 686 (1969)
- Wilson B. W., Raghupathy E., Tonoue T. y Tong W.
Endocrinology 83, 877 (1968)
- Wilson B. D. y Wright R. L.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 41, 217 (1970)
- Wolff J. y Chaikoff I. L.
J. Biol. Chem. 172, 555 (1948)

- Wolff J. y Moore W. V. Moore
Biochem. Biophys. Res. Commun. 51, 34 (1973)
- Yamamoto K., Onaya T., Yamada T. y Kotani M.
Endocrinology 90, 986, (1972)
- Yamashita K. y Field J. B.
J. Biol. Chem. 247, 7062, (1972)
- Yu S., Friedman Y., Richman R. y Burke G.
J. Clin. Invest. 57, 745 (1976)
- Zor U., Bloom G., Lowe I. P. y Field J. B.
Endocrinology 84, 1082 (1969) a
- Zor U., Kaneko T., Lowe I. P., Bloom G. y Field J. B.
J. Biol. Chem. 244, 5189 (1969) b.

Maribel
Diana K. K. K.