

SECRECIÓN DE HORMONAS TIROIDEAS

M. A. Pisarev

Co-autores: N. Altschuler
J.J. Balatti
E.K. de Valnaggia

El mecanismo de secreción de las hormonas tiroideas incluye varios pasos, tal como se ilustra en la figura 1. Por un mecanismo no muy bien aclarado aún, en el cual según recientes estudios estaría involucrado el sistema intracelular de microtúbulos y microfilamentos, la zona apical de la célula tiroidea emite pseudopodos que engloban gotas del coloide de intrafolicular. Estas gotas de coloide, una vez dentro del citoplasma, se fusionan con lisosomas que han emigrado desde la zona perinuclear, dando lugar a la formación de los fagolisosomas, o lisosomas secundarios. Las enzimas hidrolíticas presentes en los mismos degradan la tiroglobulina liberando tirosinas y tironinas de su matriz. Las primeras son dehalogenadas y el yodo reutilizado, mientras que las tironinas pasan a la circulación. Trabajos previos de Balasubramanian y col demostraron que en tiroides de perro previamente marcadas con yodo radiactivo, la administración de tirotrófina (TSH) determina un aumento de la radiactividad de la fracción subcelular que sedimenta a 15.000 xg. Sin embargo la técnica descrita por estos autores mostró gran variabilidad. En este trabajo se presentan los resultados obtenidos con una técnica original basada en doble marcación isotópica que permite obviar estas dificultades, así como una primera caracterización de la fracción subcelular responsable y de su contenido. Asimismo se investigó el papel de diferentes "pools" de Tg en este proceso.

Primera serie de experimentos: Las ratas fueron inyectadas con dosis trazadoras de I 131 o de I 125 y 5 días más tarde recibieron una inyección i.p. de albúmina o de TSH (250 mU respectivamente). Los animales fueron sacrificados entre 15, 60 minutos más tarde por un golpe en la nuca. La tiroides fue rápidamente disecada.

Se homogeneizaron simultáneamente en sacarosa 0,25 M la glándula de un animal testigo (I 131) y de uno estimulado (I 125) en un homogenizador de tejidos tipo Potter-Elvehjem. Se midió la radiactividad total del homogenado. Este fue luego sometido a centrifugación diferencial a 800 xg (10 min), 15,000 xg (20 min) y 40,000 xg (2 hs.) con lavados de cada uno de los precipitados.

De esta manera se obtuvieron las fracciones subcelular N, L, Mi y S respectivamente. Se determinó la distribución de la radiactividad así como la recuperación de la misma.

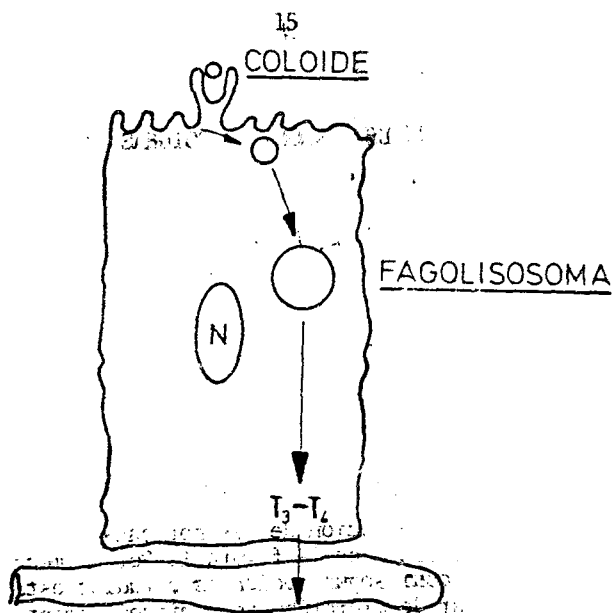


Fig. 1

Esquema del proceso secretorio tiroideo

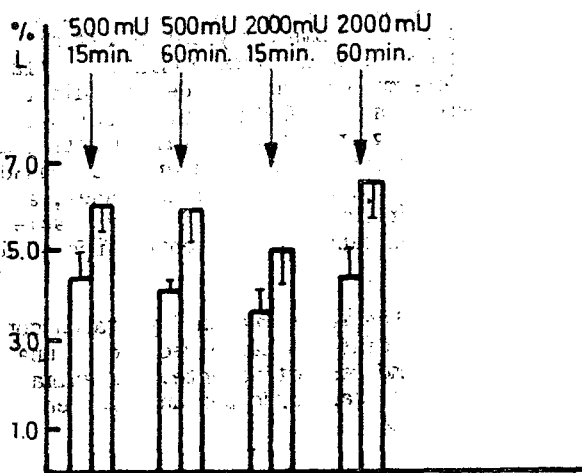


Fig. 2

Acción de la TSH sobre la radiactividad de la fracción lisosomal. En cada par de columnas la de la izquierda corresponde a ratas marcadas con ^{131}I e inyectadas con albúmina. La de la derecha representa los valores de animales estimulados con TSH y marcadas con ^{125}I .

En cada caso se tomó el valor de I 131 (testigo) como 100% expresándose la cifra de estimulación en función de éste.

Los resultados obtenidos pueden observarse en la figura 2. La administración de TSH determinó un aumento significativo de la radiactividad presente en la fracción L principalmente. Para excluir que esto fuese debido a un rápido, aunque improbable, incremento en la organificación de yodo en las mitocondrias contaminantes de esta fracción, se inyectó a un grupo de ratas con PTU (10 mg), por vía i.p. 24 hs. antes de realizar el estudio. Pudo así corroborarse que aún con la administración del antitiroideo se observaba una respuesta en dicha fracción con lo que pudo excluirse el artefacto mencionado.

La naturaleza de los compuestos radiactivos que participan de este proceso fue analizada. La fracción L fue rota mediante incubación con agua destilada. El material soluble fue analizado mediante cromatografía ascendente en papel utilizando n-butanol: etanol:hidróxido de amonio IN(5:1:2, v/v) (BEA), como sistema de solvente. Este método demostró que aproximadamente el 90% de la radiactividad correspondía a yodo-proteínas. Estos valores coincidieron con los obtenidos mediante precipitación con ácido tricloroacético sugiriendo la presencia de Tg en esta fracción subcelular.

Asimismo se determinó la distribución subcelular de fosfatasa ácida, usando p-nitrófenolfosfato como sustrato. Los resultados obtenidos mostraron que la fracción L es la que presenta la más alta actividad específica, indicando así la presencia de lisosomas en la misma.

Segunda serie de experimentos.

Se realizaron con el objeto de determinar el papel de los diferentes "pools" de Tg en el proceso secretorio, con tal fin una misma rata fue marcada con una dosis trazadora de I 125 (5 días) y de I 131 (1 día). Grupos de animales fueron alimentados durante 45 días con dieta de Forramez (Molinos Rio de la Plata, 400 µg de I 127/Kg) o de labina (Cabe-ca SCA, 200 µg I 127/Kg).

La metodología utilizada fue similar a la de los experimentos anteriores.

La figura 3 muestra que en las ratas alimentadas con labina la administración de TSH determina un aumento de radiactividad lisosomal correspondiente tanto a I 131 (1 día) como a I 125 (5 días). En cambio en los animales alimentados con la dieta de más alto contenido con yodo sólo el I 125 aumentó significativamente en la fracción L. Esto es debido a que en las ratas del primer grupo la velocidad de recambio es mayor llegando a un equilibrio a tiempos más precoces lo que permite la fagocitosis de ambas tiroglobulinas (I 125 y I 131).

La fracción L de los animales alimentados con labina fue asimismo analizada mediante cromatografía en BEA. Se analizó la relación I 131/I 125 en las zonas de T4 y T3 observándose que el incremento de las hormonas marcadas con I 131 era mayor que el de las de I 125 (cuadro 1). Estos resultados concuerdan con los datos previos de Schneider quien postuló que el último yodo que es organificado en la tiroides es el primero

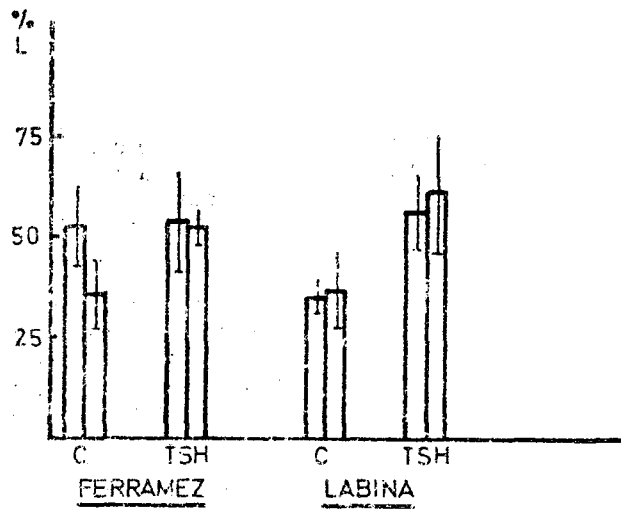


Fig. 3

Radiactividad de la fracción lisosomal. La columna a la izquierda corresponde a 1 día y la de la derecha a 5 días de marcación "in vivo". C: testigos; TSH: 500 mU.

Cuadro I

	T ₄		T ₃	
	TSH	C	TSH	C
40000 g "S"				
131I	17.9	6.9	3.0	1.9
125I	19.3	7.4	4.0	2.6
131I/125I	0.9	0.9	0.8	0.7
15000 g "L"				
131I	5.4	3.1	4.4	1.7
125I	3.9	2.7	2.6	1.4
131I/125I	1.4	1.2	1.7	1.2

Cromatografía de yodotironinas

que sale (LIFO, "last in, first out").

El contenido de la fracción L fue solubilizado ya sea mediante ruptura con agua destilada y frío, tratamiento con triton x-100 o sonicación. En todos los casos, al analizar el material mediante gradientes de sacarosa en ultracentrífuga se observó el pico característico correspondiente a Tg (fig. 4).

De los resultados obtenidos cabe concluir:

- a) La fracción L es la que contiene los lisosomas tiroideos.
- b) La administración de TSH determina un aumento de la radiactividad de la misma, en nuestras condiciones experimentales.
- c) El material radiactivo involucrado en este proceso ha sido identificado mediante diferentes técnicas como tiroglobulina.
- d) La fagocitosis de Tg ocurre a nivel de la interfase entre la zona apical tiroidea y el coloide estando limitada por la longitud de losseudopodos. Nuestros resultados indican que la hipótesis de Schneider (LIFO) se cumple. Cabe suponer entonces que el almacenamiento de la Tg ocurre dentro del coloide en forma de "hojas o catáfilas de una cebolla", siendo las capas más externas las más recientemente sintetizadas.

Esto explicaría la fagocitosis preferencial del material más "nuevo", tal como se ilustra en la figura 5 y localizaría así el sitio subcelular de la "selección" de Tg, primer paso del proceso secretorio.

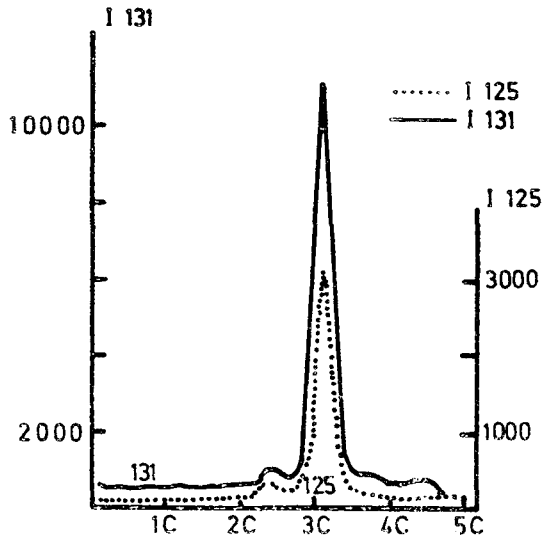


Fig. 4

Ultracentrifugación, en gradiente de sacarosa, de tiroglobulina

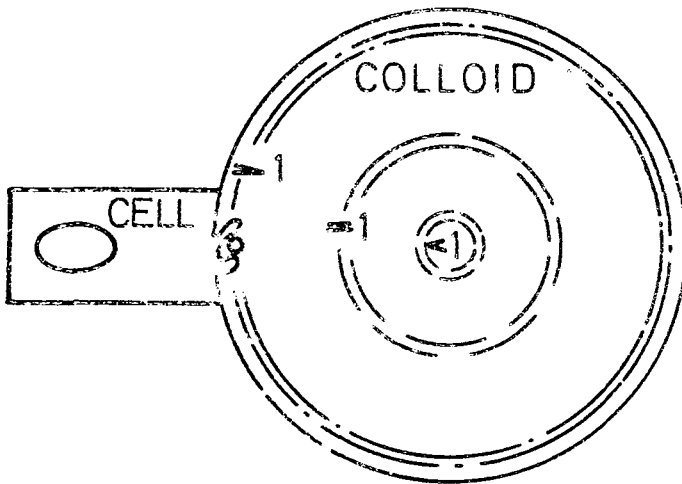


Fig. 5

Representación esquemática de los "pools" de tiroglobulina postulados.

METABOLISMO PERIFERICO DE LAS HORMONAS TIROIDEAS

A. Zaninovich

Estudios previos han mostrado que el aumento de la TBG plasmática va seguido de aceleración de la salida de triiodotironina de la circulación, mientras que sucede lo inverso al disminuir la TBG. Estos resultados, un tanto paradójales, fueron interpretados como el resultado de una competición entre la T4 y la T3 por sus sitios de fijación celular. En esa supuesta competición habría preferencia por la T4, como sucede en el plasma. En la actualidad tratamos de determinar si tal proceso competitivo existe. Para ello estudiamos la deiodinización de T4 por el músculo de rata, in vitro. Es sabido que el desprendimiento de iodo de ambas hormonas tiroideas refleja su grado de utilización por los tejidos, y es un proceso relativamente fácil de estudiar usando hormonas marcadas. Utilizamos ratas Wistar de aproximadamente 200 g de peso. Luego de muerto el animal se prepararon homogeneizados de músculo esquelético en buffer Krebs-Ringer fosfato pH 7.4, en proporción de 1 g de tejido en 5 ml de buffer. Luego se separaron alícuotas de 2 ml, dos series semejantes, una conteniendo T4 y otra T3 estables, en concentraciones de 20, 40, 60, 80, 100, 400 y 800 μg de hormona por 100 ml de homogeneizado, respectivamente. Se agregó a cada muestra una dosis trazadora de T4 marcada con Iodo 125. Esta dosis contenía aproximadamente 2 μCi de radioactividad y 3 μg de T4 por 100 ml. Se incubó luego durante 90 minutos a 37 grados centígrados. Terminada la incubación se sembraron 20 μl de cada muestra en papel Whatman 1 y se cromatografió en el sistema butanol-dioxano-amonio durante aproximadamente 18 horas. Las áreas de radioactividad de las tiras cromatográficas se determinaron en un contador a gas. Se hicieron 18 estudios por cada concentración. Este tipo de cromatografía produce tres picos principales, a saber: el de la T4 marcada que no fue deiodinizada, el iodo libre desprendido de la T4, y el iodo desprendido de la T4 que permanece en el lugar de siembra y se lo conoce como material de origen. El porcentaje de deiodinización de la hormona incluye el iodo libre más el que aparece como material de origen.

La tabla I resume los resultados obtenidos.

En la parte superior figuran las concentraciones de T4 ó T3 estables agregadas al homogeneizado, incluyendo la muestra "0", que significa que a ese homogeneizado no se agregó hormona estable y sólo contiene la T4 radioactiva en una concentración aproximada de 2 a 4 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$, que es fisiológica. En la parte inferior figuran el porcentaje de T4 radioactiva no deiodinizada y el iodo desprendido. Puede verse que el homogeneizado "0", es decir, sin hormona estable