

La Serie Universitaria de la Fundación Juan March presenta resúmenes, realizados por el propio autor, de algunos estudios e investigaciones llevados a cabo por los becarios de la Fundación y aprobados por los Asesores Secretarios de los distintos Departamentos.

El texto íntegro de las Memorias correspondientes se encuentra en la Biblioteca de la Fundación (Castelló, 77. Madrid-6).

La lista completa de los trabajos aprobados se presenta, en forma de fichas, en los Cuadernos Bibliográficos que publica la Fundación Juan March.

Los trabajos publicados en Serie Universitaria abarcan las siguientes especialidades: Arquitectura y Urbanismo; Artes Plásticas; Biología; Ciencias Agrarias; Ciencias Sociales; Comunicación Social; Derecho; Economía; Filosofía; Física; Geología; Historia; Ingeniería; Literatura y Filología; Matemáticas; Medicina, Farmacia y Veterinaria; Música; Química; Teología. A ellas corresponden los colores de la cubierta.

Edición no venal de 300 ejemplares que se reparte gratuitamente a investigadores, Bibliotecas y Centros especializados de toda España.

Fundación Juan March



FJM-Uni 115-Cac
Mecanismos moleculares de acción de
Cacicedo Egües, Lucinda.
1031775



Biblioteca FJM

Fundación Juan March (Madrid)

SERIE UNIVERSITARIA



Fundación Juan March

Lucinda Cacicedo Egües

Mecanismos moleculares de acción de hormonas tiroideas sobre la regulación de la síntesis de la hormona tirotrópica.

Mecanismos moleculares de acción de hormonas tiroideas / Lucinda Cacicedo Egües

FJM
Uni-
115
Cac
115

Fundación Juan March
Serie Universitaria



115

Lucinda Cacicedo Egües

Mecanismos moleculares de acción
de hormonas tiroideas sobre la
regulación de la síntesis de la
hormona tirotrópica.



Fundación Juan March
Castelló, 77. Telef. 225 44 55
Madrid - 6

Fundación Juan March (Madrid)

*Este trabajo fue realizado con una Beca de la
Convocatoria de España, 1977, individual
Departamento de MEDICINA, FARMACIA Y VETERINARIA
Centro de trabajo: Departamento de Endocrinología. Instituto G. Marañón del
C.S.I.C. Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma. Madrid.*

Depósito Legal: M - 6172 - 1980

I.S.B.N. 84 - 7075 - 157 - 3

Impresión: Gráficas Ibérica, Tarragona, 34 - Madrid - 7

I N D I C E

	<u>Página</u>
INTRODUCCION	5
METODOS	7
Desarrollo de tumores tirotrópos en ratones	7
Cultivo de células procedentes de tumores tirotrópos	8
Incubación de células tirotrópas con aminoácidos marcados	9
Determinación de radioactividad incorporada a proteínas	10
Preparación de antisueros anti - TSH	11
RESULTADOS	11
Control de las células en cultivo	11
Titulación de antisueros	12
Titulación de antigamma globulina de conejo	14
Incorporación de Prolina (H^3) a proteínas	14
Síntesis de TSH en las células tirotrópas en cultivo	16
Validación de la especificidad de la inmunoprecipitación	18
Efecto de T_3 y T_4 sobre la incorporación de Prolina H^3 a TSH y proteínas	22
Efecto de dosis variables de T_3 y T_4 sobre la síntesis de TSH y proteínas	27
Efecto del TRH sobre la incorporación de prolina a TSH y proteí- nas	29
DISCUSION	36
REFERENCES	39

El objeto de este trabajo es estudiar los mecanismos bioquímicos mediante los cuales las hormonas tiroideas (Triiodotironina (T_3) y Tiroxina (T_4), ejercen el control de la regulación de la secreción y síntesis de la hormona tirotrópica (TSH).

Para realizar este proyecto contamos con un sistema de cultivo primario de células tirotrópicas procedentes de tumor murino, desarrollado en ratones de estirpe LAF (1,2). Como hemos observado previamente estos tumores tirotrópicos procedentes de ratones LAF producen, aunque en pequeña cantidad, hormona luteinizante (LH) - (1,2,3). Este dato debe tenerse en consideración dado que los antisueros utilizados en este trabajo se desarrollarán frente a una preparación de TSH bovina contaminada con hormona luteotrópica (LH). Estos dos hechos, hacen que las condiciones de trabajo no sean óptimas, ya que de alguna manera al inmunoprecipitar el TSH sintetizado de novo con el anticuerpo anti-TSH podíamos

Fundación Juan March (Madrid)

precipitar también algo de LH.

En consecuencia una manera de obviar estos problemas sería trabajar con tumores que no produjeran LH, o bien, con anticuerpos anti-TSH que no tuvieran reacción de cruce con LH. Con este objeto hemos desarrollado un nuevo tipo de tumores tirotropos que no producen LH lo que evita las dificultades expuestas anteriormente.

Para poder llevar a cabo nuestro proyecto - usando este nuevo tipo de tumores es preciso seguir los pasos que expondremos a continuación:

1. Desarrollo en ratones de tumores productores de TSH (tumores tirotropos).
2. Desarrollo de un cultivo de células tirotropas procedentes de estos tumores.
3. Demostrar que las células mantenidas en cultivo sintetizan TSH y responden a las hormonas tiroideas y al TSH con las mismas características que las células tirotropas hipofisarias.

4. Probar que el material sintetizado por las células, tras incubación con aminoácidos marcados, es TSH mediante inmunoprecipitación con antisuero específico.
5. Caracterizar el TSH inmunoprecipitado mediante electroforesis en gel de poliacrilamida, usando SDS (sodium dodecyl sulfato).

METODOS

Desarrollo de tumores tirotropos en ratones.-

El tumor inicial fue obtenido por K.H. - Clifton, University de Wisconsin (USA). A partir de él hemos desarrollado nuestros propios tumores como describimos a continuación. Ratones machos C 57BL/6J (Charles River Laboratories), son mantenidos a dieta pobre en Iodo (Remington) durante dos semanas. Se les radioiodiniza mediante la administración por vía intraperitoneal de 100 μ Ci de Na I¹²⁵/ratón.

Se mantienen a dieta pobre en iodo durante otras tres semanas más. A partir de este momento los ratones están en condiciones de servir como receptores de tumores procedentes de otros animales de la misma especie. Para transplantar el tumor, una vez extirpado, se liberan las células por punción en una placa de Petri que contiene solución salina (EARLE'S BALANCED SALT SOLUTION). Se traspasan células y líquido de lavado a un tubo cónico de 15 ml centrifugándose 5 min. a 300 r.p.m. Finalmente se resuspende el pellet en Dulbeco's modified Eagle's medium (DMEM). Se inyectan a ratones tiroidectomizados 250 μ l. de esta suspensión de células

Cultivo de células procedentes de tumores tiro-
tropos.

Para obtener las células a partir del tumor se sigue el procedimiento descrito arriba, pero realizándolo en condiciones estériles. Una -

vez suspendidas las células en DMEM se cultivan en placas de 60x15 mm con una densidad de 5×10^6 células/placa, usando 4 ml de DMEM, 10% de suero fetal de ternera, 5% de suero de ternera con 10.000 U de penicilina y 10 mg de Streptomycin. El cultivo se realiza a 37°C con una atmósfera de 10 % de CO₂ y 90 % de aire saturado de agua. Los medios se recambian periódicamente cada tres días.

Incubación de células tirotropas con aminoácidos marcados.

Para estudiar la incorporación de aminoácidos por las proteínas celulares utilizamos células que han estado en cultivo entre una y tres semanas. Se añade a cada placa 4 ml de Earle's 2 % de plasma normal de rata, 10 μ Ci/ml de Prolina H³. Se incuba en las condiciones habituales. Al final de la incubación se decantan los medios y se guardan congelados. Las células se suspen-

den en PBS-Prolina y se centrifugan 20 min. a 3.000 r.p.m.; los pellets residuales se guardan congelados. Se determina tanto en los medios como en los extractos celulares: material radiactivo insoluble en ácido tricloroacético (TCA), TSH radiactivo inmunoprecipitable, proteínas totales según método de Lowry y TSH frío por radioinmunoensayo.

Determinación de radioactividad incorporada a proteínas.

a) Radioactividad insoluble en TCA. A alicuotas de los medios y extractos celulares se añaden .3ml de PBS con 1% de albúmina sérica (PBS-BSA) y 1 ml de TCA al 10 % con 1% de Prolina. Se centrifuga 10 min. a 3.000 r.p.m. El precipitado se lava otras tres veces con 1 ml de TCA-Prolina. El pellet final se disuelve en 0.5 ml de NCS, añadiendo a continuación 10 ml de líquido de centelleo (15 gr. de omnifluor en 4 L de Tolueno).

b) Inmunoprecipitación de TSH. A alicuotas de

0.2ml de medios y extratos celulares se añaden 10 μ l de antisuero, 0.2 ml. de PBS, 5% de BSA. Se incuba durante 24 h. a 4°C . A continuación se añaden 50 μ l de antigamma globulina de conejo y se deja incubar otras 24 h. a 4°C. Se centrifuga y el precipitado final se disuelve y cuenta siguiendo el mismo procedimiento indicado arriba.

Preparación de antisueros anti-TSH.

Los antisueros se obtuvieron frente a las preparaciones de TSH bovino NIH-TSH. B₄ y B₅ , siguiendo el procedimiento descrito por VAITUKATIS. (4)

RESULTADOS.

Control de las células en cultivo.

Una vez que las células han estado en cultivo durante tres días pierden la apariencia redondeada inicial, transformándose poligonales y quedando pegadas a las placas de Petri.

Se produce un incremento progresivo del número de células llegando a cubrir totalmente el fondo de la placa. A partir de las tres o cuatro semanas se observa detención en la división celular junto con cambios degenerativos, aparición de granulaciones, fenómenos que se acompañan de falta de secreción de TSH al medio, pasando de niveles de 600-800 ng/ml a valores indetectables. Dado que los cambios morfológicos se acompañan de alteraciones en los parámetros bioquímicos la medida de TSH en los medios es la que nos indica la evolución del cultivo.

Titulación de antisueros.

En la figura nº1 se muestra en representación de Scatchard los resultados que se obtuvieron al incubar el pool de antisueros obtenidos frente a TSH de rata. El antisuero se utilizó a una dilución final de 1/22.500. A partir de los datos representados se calculó la capacidad del antisuero que resultó ser de 3,4 mg de TSH /ml

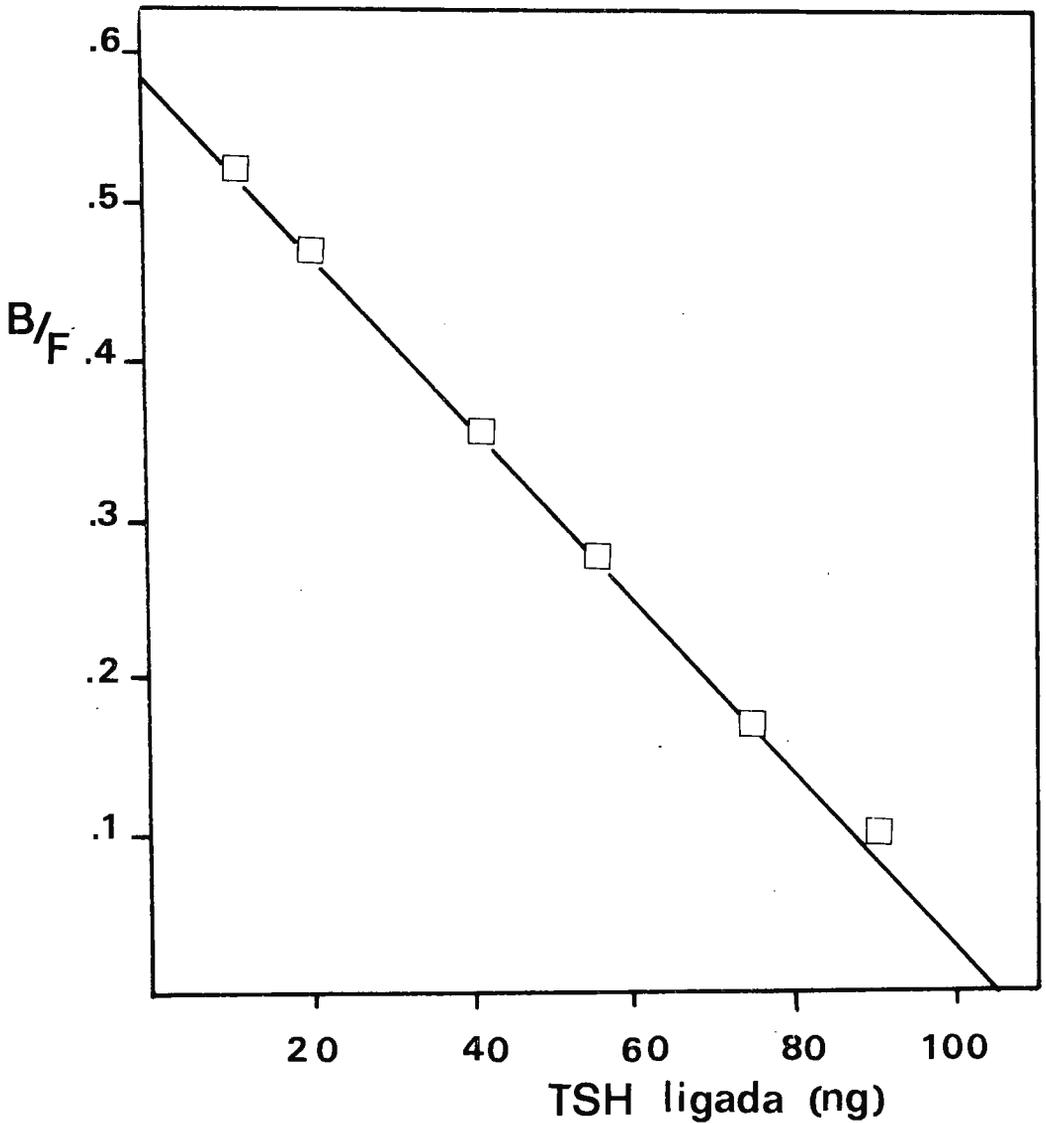


Figura 1.-Unión de r-TSH al anticuerpo anti b-TSH en representación de Scatchard.

de antisuero. Este antisuero es capaz de unirse al TSH de rata I^{125} , y esta unión es desplazada por el TSH de rata no marcado.

Titulación de antigamma globulina de conejo.

La separación del complejo antígeno-anticuerpo del antígeno libre, en la inmunoprecipitación, se realiza precipitando el complejo con antigamma globulina de conejo. En la Figura n°2 mostramos una curva de titulación de antigamma globulina de conejo. Se incubaron durante 24 h. 0,1 ml de extracto de células, que habían sido incubadas con prolina titriada, 0,2 ml de PBS, 5 % de BSA y diferentes cantidades de antisuero y antigamma globulina. La máxima precipitación se obtuvo con 10 μ l de antisuero y 200 μ l de antigamma globulina, siendo estas las condiciones que se usan habitualmente.

Incorporación de Prolina (H^3) a proteínas.

Se incubaron las células en presencia de

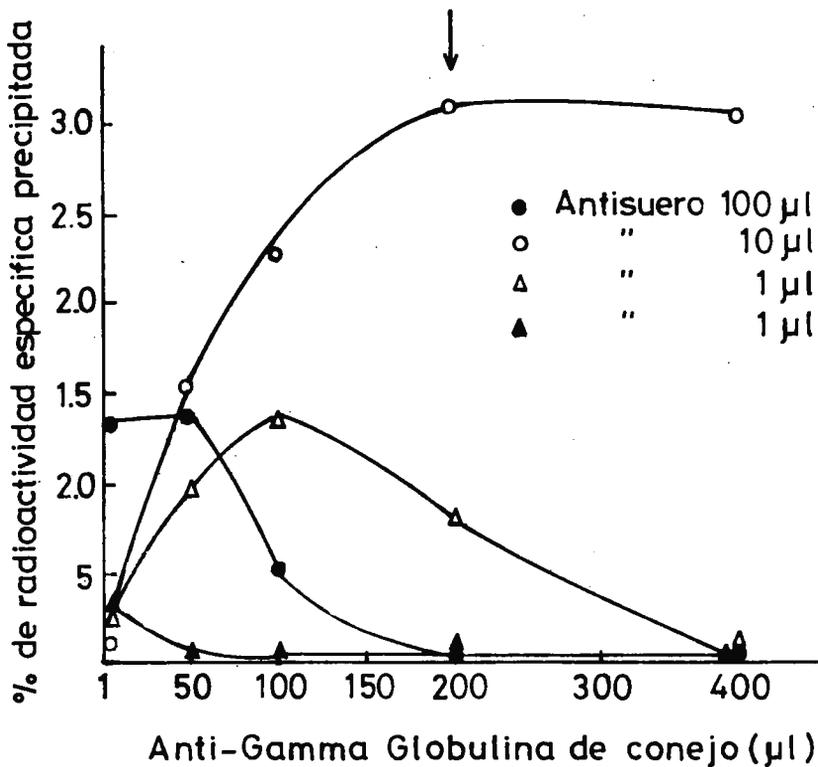


Figura 2.-Curva de titulación del antisuero anti b-TSH y de antigamma globulina de conejo. Las condiciones indicadas por la flecha son las utilizadas en este trabajo.

Prolina (H^3) durante períodos de tiempo de 10, 20, 40 y 180 min. y 24 h. A los 10 min. era ya detectable la síntesis de proteínas intracelulares que siguió creciendo hasta 24 h. último tiempo detectado. A las tres horas fue también patente la presencia en el medio de radioactividad unida a proteínas indicando que el material sintetizado por las células estaba siendo segregado al medio. A las 24 h de incubación, la radioactividad incorporada a proteínas segregadas a los medios, era ya superior a la que existía en las células, indicando cómo las células segregaban al medio proteínas que se estaban sintetizando.

(Fig. 3)

Síntesis de TSH en las células tirotropas en cultivo.

Células tirotropas mantenidas en cultivo durante varios días (2 semanas) fueron incubadas en presencia de Prolina (H^3) tal y como se describió en material y métodos. Un claro aumento de la síntesis de TSH fue ya puesto de manifies-

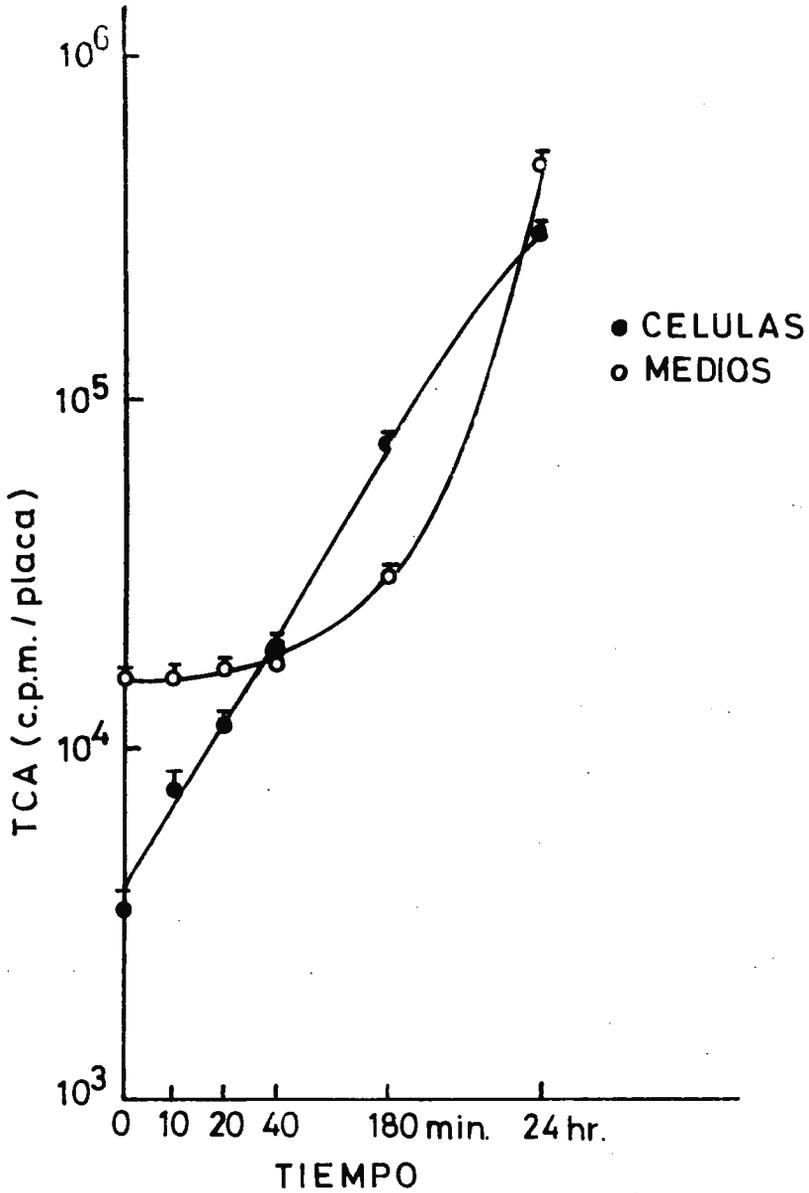


Figura 3.-Tiempo de incorporación de prolina tritizada a proteínas en células tirotropas murinas en cultivo primario.

to a los 10', siendo a los 20 min, la cantidad de TSH en el medio, significativamente diferente de la presente a tiempo 0 (figura 4).

Validación de la especificidad de la inmunoprecipitación.

Como hemos señalado anteriormente, los tumores desarrollados en los ratones C 57 carecen de LH. A pesar de ello quisimos comprobar la posible interferencia del LH en la inmunoprecipitación. Con este objeto, se añadió LH ó TSH a extractos celulares que habían sido incubados en presencia de Prolina tritiada durante 24 horas. La tabla n°1 muestra como incluso una concentración de LH bovina de 800 $\mu\text{g/ml}$ no interfirió con la precipitación de TSH tritiado mientras que 33 μg de TSH de una preparación muy poco purificada bloquearon completamente la inmunoprecipitación. Este hallazgo indica que aunque al antisuero utilizado fuera capaz de reconocer a la molécula de LH, sin embargo este antisuero no es bloqueado por el LH.

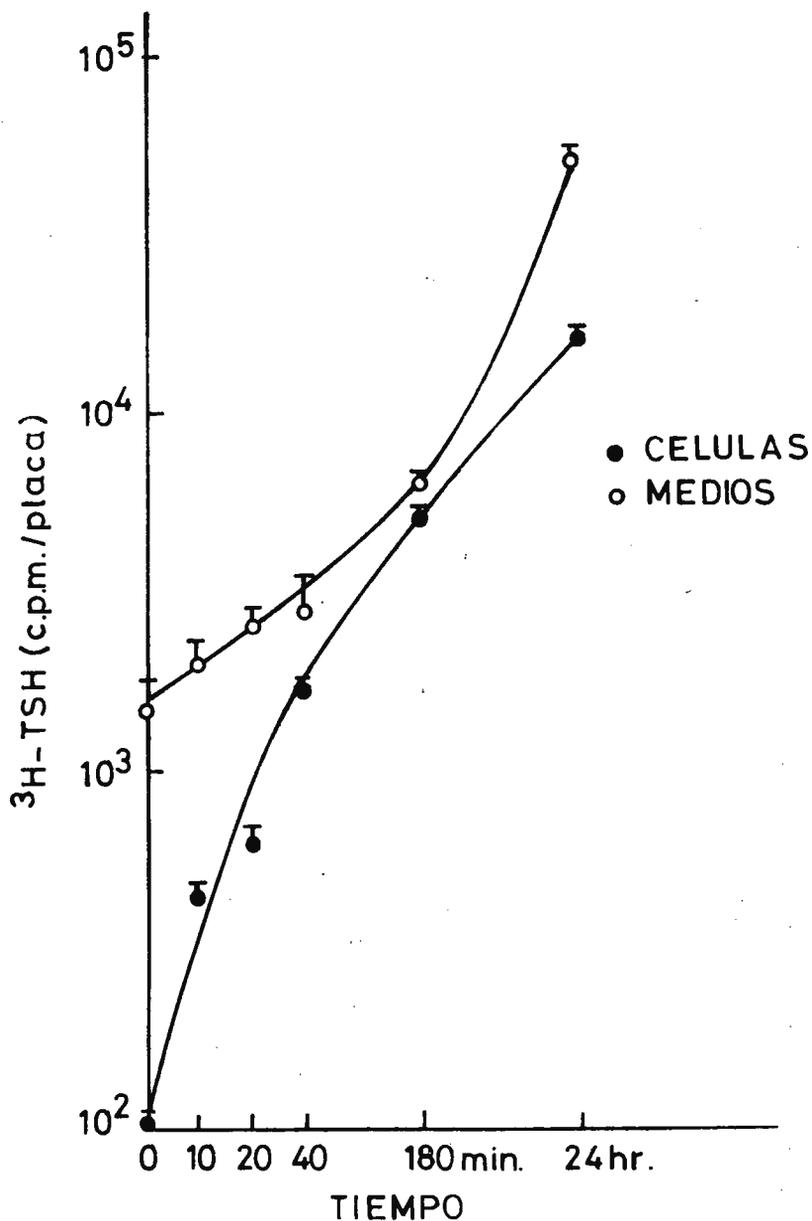


Figura 4.-Tiempo de incorporación de prolina triada a TSH en células tirotrópicas murinas en cultivo primario.

Tabla 1. Inmunoprecipitación de ^3H -TSH sintetizado por células las tirotropas murinas en cultivo primario.

	<u>cpm (medida \pm DS)</u>
Antisuero	1344 \pm 65
Suero normal de conejo	937 \pm 12,7
Antisuero absorbido (con 33 μg de b-TSH)	991 \pm 24
Antisuero absorbido (con 800 μg de NIH-LH-B5)	1326 \pm 29,7

Por lo tanto las cuentas precipitadas en la inmunoprecipitación sólo pueden corresponder al $^3\text{H-TSH}$.

Otro punto que necesitamos comprobar era que la cantidad de antisuero que se usaba en la inmunoprecipitación era suficiente para precipitar todo el $^3\text{H-TSH}$ presente en los extractos celulares o en los medios. Para ello se añadió una cantidad traza de rTSH-I¹²⁵ a tubos que contenían extractos celulares o buffer fosfato 0,1 % de albúmina sérica bovina (PBS-BSA). En presencia de los extractos celulares precipitó un 81 % de la radioactividad traza (media de cuatro determinaciones) y en su ausencia un 84 % de las cuentas fueron precipitadas, indicando que la presencia de TSH fría en las muestras tenía poco o ningún efecto sobre la cantidad precipitada.

Con objeto de determinar la reproducibilidad del método, cantidades variables de un pool de medios, obtenidos de uno de los experimentos,

que oscilaron entre 0.1 y 0.4 ml fueron inmuno-precipitadas. La cantidad de radioactividad en los precipitados fue proporcional a la cantidad de medio marcado presente; este hecho se produjo indistintamente cuando se usaron para la reacción del segundo anticuerpo 100 ó 200 μ l de anti gammaglobulina de conejo (Figura 5).

Efecto de T_3 y T_4 sobre la incorporación de Prolina H^3 a TSH y proteínas.

Dependiendo de los experimentos las células se incubaron con T_3 ó T_4 durante diferentes periodos de tiempo que oscilaron entre 24 y 48 horas. A continuación se añadió prolina tritiada 150 μ Ci/placa y se incubó por un período adicional de otras cuatro horas. Terminada la incubación se colectaron células y medios de la manera habitual ya descrita anteriormente. Las hormonas tiroideas (T_3) y (T_4) fueron obtenidos de Sigma. Para la preparación de la solución éstas fueron disueltas en un volumen mínimo de NaOH 0,1 N que

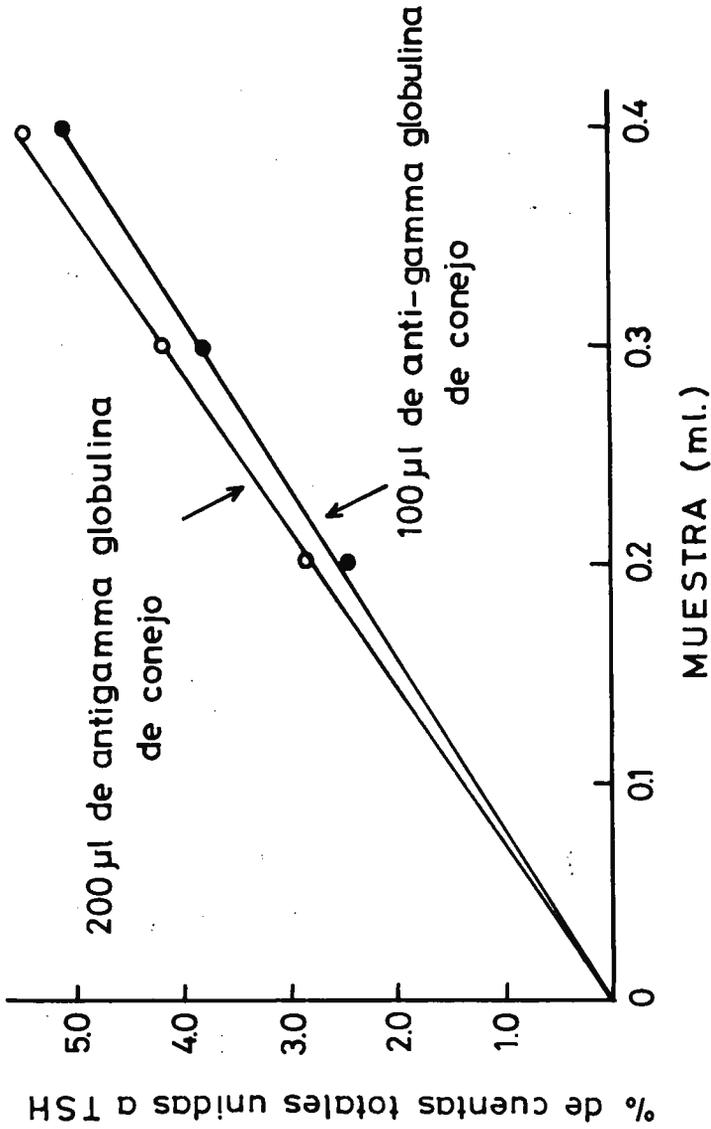


Figura 5.-Incubación de volúmenes crecientes de medio en presencia de diferentes cantidades de anti-gamma globulina. La cantidad de ^3H -TSH precipitada es proporcional a la inicialmente presente en el suero.

se neutralizó con ClH 0,1 N. Esta solución stock se diluía posteriormente con DMEM hasta alcanzar las concentraciones finales deseadas.

Para ver la influencia que el tiempo de exposición a las células de las hormonas tiroideas pudiera tener sobre la síntesis de TSH, se incubaron células en presencia de concentraciones de T_3 (10^{-5} M) ó T_4 (10^{-6} M) durante 24 y 48 horas.

A las 24 horas (Figura nº6) no hubo cambios en la incorporación de prolina titriada en la molécula de TSH. Sin embargo después de 48 horas de incubación tanto en el grupo de células incubadas con T_3 como en de T_4 se produjo una significativa disminución en la incorporación de prolina a TSH. Los cambios encontrados fueron atribuibles a modificaciones en la cantidad existente en los medios pero no en los extractos celulares.

En cuanto a la síntesis de proteínas, considerando ésta como incorporación de prolina H^3 a material precipitable con ácido tricloroacético,

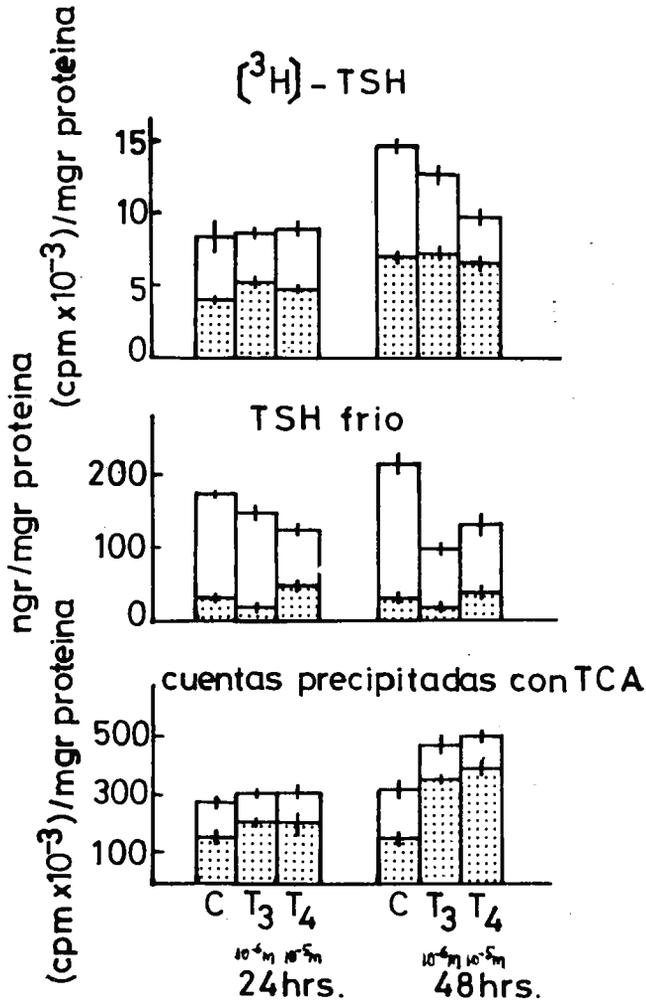


Figura 6.-Efecto de T₃ (10⁻⁶M) o T₄ (10⁻⁵M) sobre la síntesis de TSH y proteínas en cultivo primario de células tirotopas. Los valores correspondientes a extractos celulares se representan en sombreado y los de los medios en blanco.

se apreció un claro y significativo aumento después de 24 horas de incubación con T_4 . Este efecto no fue apreciado en las células tratadas con T_3 . Después de 48 horas tanto en las células tratadas con T_3 como con T_4 se puso de manifiesto un significativo aumento del material precipitable con TCA. Cualquiera fuera el tiempo de exposición a hormonas tiroideas el efecto estimulador fue tan sólo patente en las células, pero no en los medios, sugiriendo cambios en los constituyentes celulares no transportables.

El efecto de las hormonas tiroideas sobre el TSH inmunoensayable fue patente después de 48 horas de tratamiento, apareciendo una significativa reducción del TSH total (células más medio) sin apreciarse modificaciones en el TSH celular. A las 24 horas tan solo en el grupo de células tratadas con T_4 se produjo una disminución de los niveles de TSH. En el grupo T_3 no hubo ninguna modificación.

Efecto de dosis variables de T_3 y T_4 sobre la síntesis de TSH y proteínas.

Hemos visto cómo en los experimentos comentados en el anterior apartado se usaron concentraciones muy elevadas de T_3 y T_4 . Con el fin de determinar la sensibilidad de las células tirotropas a las hormonas tiroideas y también descartar la posibilidad de que los efectos descritos pudieran ser debidos a la toxicidad secundaria a las grandes dosis utilizadas, se utilizaron células tirotropas en presencia de concentraciones variables de hormonas tiroideas durante un período de 48 horas (Figura 7).

Con las dosis más bajas usadas (10^{-13} M de T_4 y 10^{-11} M de T_3 , hubo una significativa disminución de la incorporación de prolina tritiada a TSH. Este efecto se observó a todas las concentraciones que se usaron, si bien de tal forma que se apreció la aparición de un efecto bifásico. En contraste con estos efectos observados en la sín-

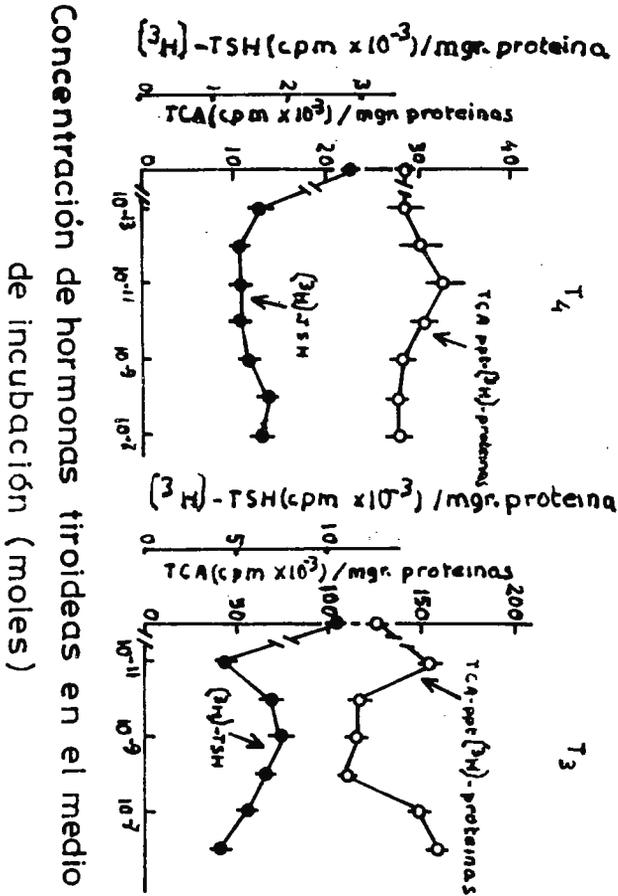


Figura 7.-Efecto de diferentes dosis de hormonas tiroideas en la incorporación de prolina tritiada a TSH y proteínas.

tesis de TSH, estas dosis estimularon la síntesis de proteínas. A medida que la concentración de hormonas tiroideas aumentaba, tanto los efectos observados en la síntesis de TSH como de proteínas se invertían en el rango de concentraciones entre 10^{-10} M y 10^{-7} M dando lugar a la curva bifásica ya mencionada.

Efecto del TRH sobre la incorporación de prolina a TSH y proteínas.

Se cultivaron células durante 1 a 2 semanas. En el día del experimento se decantaron los medios y se añadió medio nuevo conteniendo ^3H prolina ($50 \mu\text{Ci/ml}$) más las sustancias a ensayar. Después de la incubación células y medios se procesaron de la manera habitual.

Como se aprecia en la Tabla nº 2 el tratamiento con TRH indujo a un significativo incremento en la incorporación de prolina titulada a TSH inmunoprecipitable, así como de TSH radioinmu-

Tabla 2. Efecto del TRH 10^{-7} M, sobre proteínas totales, TSH radioinmunoensayable, sobre la incorporación de H³-Prolina a TSH inmunoprecipitable y proteínas precipitadas por Tricloroacético, en células tirotropas murinas en cultivo primario.

EXTRACTOS CELULARES

	Proteínas totales (μ g/placa*)	TCA ppt (cpm/mg proteína na $\times 10^4$ *)	(³ H)-TSH (cpm/mg proteína na $\times 10^3$ *)	r-TSH (ng/mg proteína *)
	media \pm ES	media \pm ES	media \pm ES	Media \pm ES
A. 3h (³H)- Prolina pulse				
Control	300 \pm 10	10,46 \pm 0,96	10,34 \pm 0,10	538 \pm 16
TRH 10^{-7} M	341 \pm 16	12,94 \pm 0,45	13,06 \pm 0,84	577 \pm 12
P	<0,025	<0,05	<0,025	<0,05
B. 24h. (³H)-Prolina pulse				
Control	132 \pm 8,7	45,67 \pm 1,85	52,51 \pm 1,25	---
TRH 10^{-7} M	182 \pm 12	61,57 \pm 5,91	59,71 \pm 3,74	---
P	<0,01	<0,05	<0,05	<0,05

*/ 4-5 Placas por cada observación

noensayable, proteínas totales y proteínas precipitables con ácido tricloroacético. En cuanto a los medios no se detectaron variaciones después de 3 horas de incubación con prolina titriada, pero sí al cabo de 24 horas.

Cuando se expusieron las células a concentraciones crecientes de TRH del rango de 10^{-11} a 10^{-7} M se apreció cómo el número de cuentas incorporadas a TSH aumentaba en función de la concentración de TRH (Figura 8).

Con el objeto de clarificar si el TRH tenía un efecto hiperplásico se estudió el efecto del TRH sobre la concentración de DNA, considerando éste como un índice de proliferación celular. Tras un período de exposición de 24 horas se produjo un claro y significativo aumento tanto de DNA como de proteínas totales (Tabla nº3).

Otro aspecto que se consideró en este trabajo fue la interacción entre el TRH y la T_3 sobre la síntesis de TSH. Como se había observado en anteriores estudios la adición de T_3 (10^{-6} M)

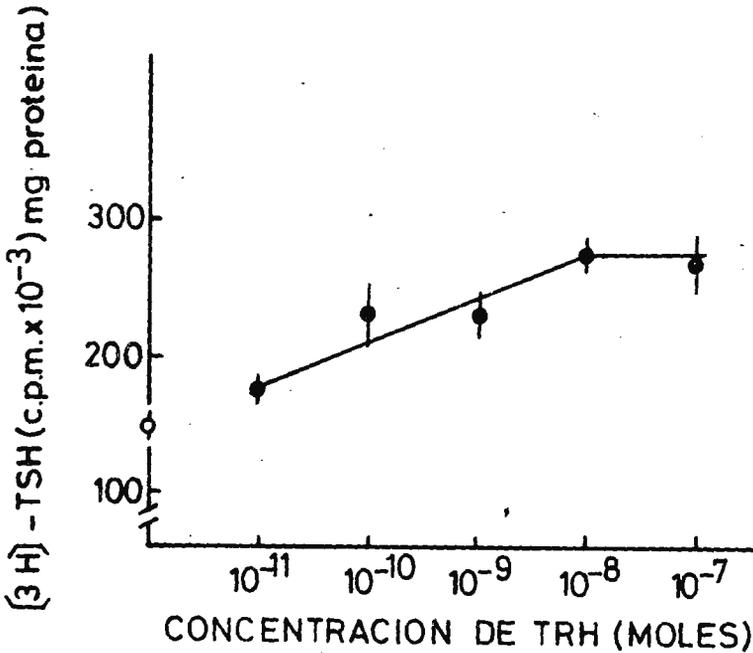


Figura 8.-Efecto del TRH sobre la síntesis de TSH. Las células fueron incubadas con diferentes concentraciones de TRH en presencia de prolina H³. Cada punto representa la media[±] ES de cuatro determinaciones.

Tabla 3. Efecto del TRH, 10^{-8} M, sobre el DNA y las proteíñas totales de células tirotropas murinas en cultivo.

Tratamiento	DNA	Proteínas
	$\mu\text{g}/\text{Placa}$ Media \pm ES	($\mu\text{g}/\text{Placa}$) Media \pm ES
Controles	$2,75 \pm 0,25$	142 ± 16
TRH 10^{-8} M	$4,00 \pm 0$	180 ± 0
P	$< 0,005$	$< 0,05$

* / Determinación por cuadruplicado de pools de 12 placas tratadas con TRH y de 12 controles.

durante 24 horas reducía marcadamente la incorporación de ^3H -Prolina al TSH. Este efecto inhibitorio fue anulado por la adición de TRH en concentraciones de 10^{-11} a 10^{-7} M (Figura 9).

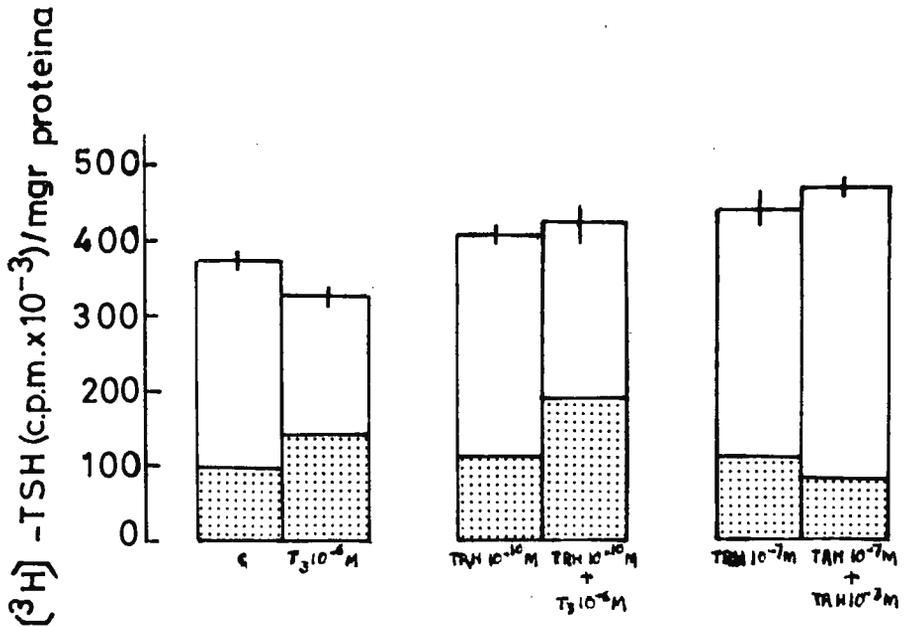


Figura 9.-Estimulación de la incorporación de prolina H³ a TSH por el TRH e inversión del efecto por la T₃. Los datos representan la media[±]ES de tres determinaciones.

D I S C U S I O N

En este estudio hemos demostrado que las células tirotropas procedentes de tumores murinos sintetizan TSH en cultivo primario. Este hecho se ha puesto de manifiesto tanto en la incorporación de prolina tiritada a TSH como por la medida de TSH radioinmunoensayable (TSH frío). La radioactividad asociada con TSH aumenta en función del tiempo y es detectable a los 10 minutos. El TSH frío de los medios era a las 24 horas de incubación de la misma magnitud que el existente en las células indicando que la célula tirotrópa en cultivo sintetiza y segrega activamente TSH. Estos hallazgos confirman los nuestros y de otros autores utilizando cultivo primario de células tirotropas procedentes de tumores desarrollados en ratones de cepa LAF (1, 2, 3, 5, 6, 7).

La reproducibilidad y especificidad de la inmunoprecipitación confirman suficientemente que el material inmunoprecipitado es TSH.

Los efectos de las hormonas tiroideas se
Fundación Juan March (Madrid)

pusieron de manifiesto a concentraciones tan bajas como 10^{-11} M y 10^{-13} M; niveles que son los mismos que los encontrados bajo condiciones fisiológicas y que se han visto que son capaces de estimular "in vitro" la síntesis de hormona de crecimiento en células tumorales de rata tipo GH₃ (8).

Efectos inhibidores de las hormonas tiroideas sobre hipófisis incubada in vitro (9,10) o células tirotropas procedentes de ratones han sido demostradas por otros autores, quienes han utilizado medidas de TSH por radioinmunoensayo o bioensayo.

Hemos demostrado también en este trabajo que las hormonas tiroideas estimulan la síntesis de proteína. La disociación de efectos sobre TSH de aquellos encontrados sobre síntesis de proteínas, apoya fuertemente la especificidad del efecto de las hormonas tiroideas en esta línea de células.

Así hemos evidenciado que el TRH aumenta la

tasa de síntesis de TSH. Este efecto del TRH, es proporcional al logaritmo de la dosis en el rango de 10^{-11} a 10^{-7} M. El efecto inhibitor de la T_3 puede ser invertido por la presencia de TRH a determinadas concentraciones, como ha sido demostrado por otros autores in vivo (11,12) o in vitro utilizando como parámetro el TSH medido por radioinmunoensayo. (9,10).

Después del tratamiento con TRH aumenta la incorporación de prolina titriada a proteínas celulares, así como el contenido de DNA de las células. Estos hechos ya comentados por nosotros con anterioridad (1,2), indican que el TRH además de ser una hormona liberadora, es también una hormona trófica con efectos sobre el crecimiento celular.

REFERENCES

1. CACICEDO, L., S.L. PHOL, and S. REICHLIN ,
Biosynthesis of thyrotropin (TSH) by mouse
thyrotropic tumor cells in primary culture:
Stimulatory effect of thyrotropin releasing
factor (TRF) on TSH and protein synthesis,
American Thyroid Association Meeting, September,
1976 (abstract).
2. CACICEDO, L., S.L. POHL, and S.REICHLIN,
Biosynthesis of thyrotropin (TSH) by mouse
thyrotropic tumor cells in primary culture:
inhibitory effect of tridothyroinine (T_3) and
thyroxine (T_4), 58 th Endocrine Society Meeting
June, 1976 (abstract).
3. FURTH, J. Experimental pituitary tumors, Recent
Prog. Horm. Res. 11 : 221,1955.
4. VAITUKATIS, J., J.B.Robbins, E. Nieschlag, and
G.T. Ross,A method for producing specific
antisera with small doses of inmunogen, J. Clin
Endocrinol. 33: 988. 1971.
5. ETO, S. and N. FLEISCHER, Regulation of
thyrotropin (TSH) release and production in
monolayer cultures of transplantable TSH mouse
tumors, Endocrinology 98: 144, 1976.

6. VALE, W., GRANT, M. AMOSS, R. BLACKWELL and R. GUILLEMIN. Culture of enzymatically dispersed anterior pituitary cells: functional validation of a method, *Endocrinology* 91: 562, 1.972.
7. MARSHALL. M.C., B.D. Weintraub, Regulation of the *de novo* TSH biosynthesis in normal, hyperplastic and neoplastic thyrotrophs, 61st Endocrine Society Meeting, June 1979 (Abstract)
8. SAMUELS H.H, J.S. Tsai, J. CASANOVA, and F. Stanley, In vitro characterization of solubilized nuclear receptors from rat liver and cultured GH₁ cells, *J. Clin. Invest* 54: 853, 1974.
9. WILBER, J.F. and R.D. UTIGER, Thyrotropin incorporation of ¹⁴C-Glucosamine by the isolated adenohypophysis *Endocrinology* 84: 1361, 1969.
10. WILBER, J.F., Stimulation of ¹⁴C-Glucosamine incorporation into thyrotropin by synthetic Thyrotropin releasing hormone, *Endocrinology* 89 873, 1.971.
11. BOWERS, C.Y., A.V. SCHALLY, Q.A. REYNOLDS, and W.D. HAWLEY, A study on the interaction of the thyrotropin releasing factor on the release and synthesis of thyrotropin from the anterior pituitary gland of mice, *Endocrinology*, 81: 741, 1967.

12. GARCIA, M.D., F. ESCOBAR DEL REY, and G.MORREALE DE ESCOBAR, Thyrotropin releasing hormone and thyroid hormone interaction on the thyrotropin secretion in the rat: lack of inhibiting effects of small doses of triiodo-1-thyronine in the hypothyroid rat, Endocrinology 98: 203,1.976



FUNDACION JUAN MARCH

SERIE UNIVERSITARIA

TITULOS PUBLICADOS

Serie Marrón

(Filosofía, Teología, Historia, Artes Plásticas, Música, Literatura y Filología)

- | | | | |
|-----|--|-----|--|
| 1 | Fierro, A.:
Semántica del lenguaje religioso. | 60. | Alcalá Galvé, A.:
El sistema de Servet. |
| 10 | Torres Monreal, F.:
El teatro español en Francia (1935-1973). | 61 | Mourão-Ferreira, D., y Ferreira, V.:
Dos estudios sobre literatura portuguesa contemporánea. |
| 12 | Curto Herrero, F. Fco.:
Los libros españoles de caballerías en el siglo XVI. | 62 | Manzano Arjona, M.ª:
Sistemas intermedios. |
| 14 | Valle Rodríguez, C. del:
La obra gramatical de Abraham Ibn Ezra. | 67 | Acero Fernández, J. J.:
La teoría de los juegos semánticos. Una presentación. |
| 16 | Solís Santos, C.:
El significado teórico de los términos descriptivos. | 68 | Ortega López, M.:
El problema de la tierra en el expediente de Ley Agraria. |
| 18 | García Montalvo, P.:
La imaginación natural (estudios sobre la literatura fantástica norteamericana). | 70 | Martín Zorraquino, M.ª A.:
Construcciones pronominales anómalas. |
| 21 | Durán-Lóriga, M.:
El hombre y el diseño industrial. | 71 | Fernández Basterreche, F.:
Sociología del ejército español en el siglo XIX. |
| 32 | Acosta Méndez, E.:
Estudios sobre la moral de Epicuro y el Aristóteles esotérico. | 72 | García Casanova, J. F.:
La filosofía hegeliana en la España del siglo XIX. |
| 40. | Estefanía Alvarez, M.ª del D. N.:
Estructuras de la épica latina. | 73 | Meya Llobart, M.:
Procesamiento de datos lingüísticos. Modelo de traducción automática del español al alemán. |
| 53 | Herrera Hernández, M.ª T.:
Compendio de la salud humana de Johannes de Ketham. | 75 | Artola Gallego, M.:
El modelo constitucional español del siglo XIX. |
| 54 | Flaquer Montequi, R.:
Breve Introducción a la historia del Señorío de Bultrago. | 77 | Almagro-Gorbea, M., y otros:
C-14 y Prehistoria de la Península Ibérica. |

- 94 Falcón Márquez, T.:
La Catedral de Sevilla.
- 98 Vega Cernuda, S. D.:
J. S. Bach y los sistemas contrapuntísticos.
- 100 Alonso Tapia, J.:
El desorden formal de pensamiento en la esquizofrenia.
- 102 Puentes Florido, F.:
Rafael Cansinos Assens (novelista, poeta, crítico, ensayista y traductor).
- 110 Pitarch, A. J., y Dalmases Balañá, Nuria:
El diseño artístico y su influencia en la industria (arte e industria en España desde finales del siglo XVII hasta los inicios del XX).
- 113 Contreras Gay, J.:
Problemática militar en el interior de la península durante el siglo XVII. El modelo de Granada como organización militar de un municipio.

Serie Verde

(Matemáticas, Física, Química, Biología, Medicina)

- 2 Mulet, A.:
Calculador en una operación de rectificación discontinua.
- 4 Santiuste, J. M.:
Combustión de compuestos oxigenados.
- 5 Vicent López, J. L.:
Películas ferromagnéticas a baja temperatura.
- 7 Salvá Lacombe, J. A.:
Mantenimiento del hígado dador in vitro en cirugía experimental.
- 8 Plá Carrera, J.:
Estructuras algebraicas de los sistemas lógicos deductivos.
- 11 Drake Moyano, J. M.:
Simulación electrónica del aparato vestibular.
- 19 Purroy Unanua, A.:
Estudios sobre la hormona Natriurética.
- 20 Serrano Molina, J. S.:
Análisis de acciones miocárdicas de bloqueantes Beta-adrenérgicos.
- 22 Pascual Acosta, A.:
Algunos tópicos sobre teoría de la información.
- 25 I Semana de Biología:
Neurobiología.
- 26 I Semana de Biología:
Genética.
- 27 I Semana de Biología:
Genética.
- 28 Zugasti Arbizu, V.:
Analizador diferencial digital para control en tiempo real.
- 29 Alonso, J. A.:
Transferencia de carga en aleaciones binarias.
- 30 Sebastián Franco, J. L.:
Estabilidad de osciladores no sinusoidales en el rango de microondas.
- 39 Blasco Olcina, J. L.:
Compacidad numerable y pseudocompacidad del producto de dos espacios topológicos.
- 44 Sánchez Rodríguez, L.:
Estudio de mutantes de *saccharomyces cerevisiae*.
- 45 Acha Catalina, J. I.:
Sistema automático para la exploración del campo visual.
- 47 García-Sancho Martín, F. J.:
Uso del ácido salicílico para la medida del pH intracelular.

- 48 **García García, A.:**
Relación entre iones calcio, fármacos ionóforos y liberación de noradrenalina.
- 49 **Trillas, E., y Alsina, C.:**
Introducción a los espacios métricos generalizados.
- 50 **Pando Ramos, E.:**
Síntesis de antibióticos aminoglicosídicos modificados.
- 51 **Orozco, F., y López-Fanjul, C.:**
Utilización óptima de las diferencias genéticas entre razas en la mejora.
- 52 **Gallego Fernández, A.:**
Adaptación visual.
- 55 **Castellet Solanas, M.:**
Una contribución al estudio de las teorías de cohomología generalizadas.
- 56 **Sánchez Lazo, P.:**
Fructosa 1,6 Bisfosfatasa de hígado de conejo: modificación por proteasas lisosomales.
- 57 **Carrasco Llamas, L.:**
Estudios sobre la expresión genética de virus animales.
- 59 **Afonso Rodríguez, C. N.:**
Efectos magneto-ópticos de simetría par en metales ferromagnéticos.
- 63 **Vidal Costa, F.:**
A la escucha de los sonidos cerca de T_L en el 4_{IV} líquido.
- 65 **Andréu Morales, J. M.:**
Una proteína asociada a membrana y sus subunidades.
- 66 **Blázquez Fernández, E.:**
Desarrollo ontogénico de los receptores de membrana para Insulina y glucagón.
- 69 **Vallejo Vicente, M.:**
Razas vacunas autóctonas en vías de extinción.
- 76 **Martín Pérez, R. C.:**
Estudio de la susceptibilidad magnetoelectrónica en el Cr_2O_3 policristalino.
- 80 **Guerra Suárez, M.ª D.:**
Reacción de Amidas con compuestos organoaluminicos.
- 82 **Lamas de León, L.:**
Mecanismo de las reacciones de iodación y acoplamiento en el tiroides.
- 84 **Repollés Moliner, J.:**
Nitrosación de aminas secundarias como factor de carcinogénesis ambiental.
- 86 **II Semana de Biología:**
Flora y fauna acuáticas.
- 87 **II Semana de Biología:**
Botánica.
- 88 **II Semana de Biología:**
Zoología.
- 89 **II Semana de Biología:**
Zoología.
- 91 **Viéitez Martín, J. M.:**
Ecología comparada de dos playas de las Rías de Pontevedra y Vigo.
- 92 **Cortijo Mérida, M., y García Blanco, F.:**
Estudios estructurales de la glucógeno fosforilasa b.
- 93 **Aguilar Benítez de Lugo, E.:**
Regulación de la secreción de LH y prolactina en cuadros anovulatorios experimentales.
- 95 **Bueno de las Heras, J. L.:**
Empleo de polielectrolitos para la floculación de suspensiones de partículas de carbón.
- 96 **Núñez Álvarez, C., y Ballester Pérez, A.:**
Lixiviación del cinabrio mediante el empleo de agentes complejantes.
- 101 **Fernández de Heredia, C.:**
Regulación de la expresión genética a nivel de transcripción durante la diferenciación de Artemia salina.
- 103 **Guix Pericas, M.:**
Estudio morfométrico, óptico y ultraestructural de los linfocitos en la enfermedad celíaca.
- 105 **Llobera I Sande, M.:**
Gluconeogénesis «in vivo» en ratas sometidas a distintos estados tiroideos.

106 Usón Finkenzeller, J. M.:
Estudio clásico de las correcciones radiactivas en el átomo de hidrógeno.

107 Galián Jiménez, R.:
Teoría de la dimensión.

111 Obregón Perea, J. M.:
Detección precoz del hipotiroidismo congénito.

Serie Roja

(Geología, Ciencias Agrarias, Ingeniería, Arquitectura y Urbanismo)

3 Velasco, F.:
Skarns en el batolito de Santa Olalla

6 Alemán Vega, J.:
Flujo inestable de los polímeros fundidos.

9 Fernández-Longoria Pinazo, F.:
El fenómeno de inercia en la renovación de la estructura urbana.

13 Fernández García, M.^a P.:
Estudio geomorfológico del Macizo Central de Gredos.

15 Ruiz López, F.:
Proyecto de inversión en una empresa de energía eléctrica.

23 Bastarache Alfaro, M.:
Un modelo simple estático.

24 Martín Sánchez, J. M.:
Moderna teoría de control: método adaptativo-predictivo.

31 Zapata Ferrer, J.:
Estudio de los transistores FET de microondas en puerta común.

33 Ordóñez Delgado, S.:
Las Bauxitas españolas como mena de aluminio.

35 Juvé de la Barreda, N.:
Obtención de series aneuploides en variedades españolas de trigo común.

36 Alarcón Alvarez, E.:
Efectos dinámicos aleatorios en túneles y obras subterráneas.

38 Lasa Dolhagaray, J. M., y Silván López, A.:
Factores que influyen en el espigado de la remolacha azucarera.

41 Sandoval Hernández, F.:
Comunicación por fibras ópticas.

42 Pero-Sanz Elorz, J. A.:
Representación tridimensional de texturas en chapas metálicas del sistema cúbico.

43 Santiago-Alvarez, C.:
Virus de insectos: multiplicación, aislamiento y bioensayo de Baculovirus.

46 Ruiz Altisent, M.:
Propiedades físicas de las variedades de tomate para recolección mecánica.

58 Serradilla Manrique, J. M.:
Crecimiento, eficacia biológica y variabilidad genética en poblaciones de dípteros.

64 Farré Muntaner, J. R.:
Simulación cardiovascular mediante un computador híbrido.

79 Fraça González, B. M.:
Las Giberelinas. Aportaciones al estudio de su ruta biosintética.

81 Yáñez Parareda, G.:
Sobre arquitectura solar.

83 Díez Viejobueno, C.:
La Economía v la Geomatemática en prospección geoquímica.

90 Pernas Galf, F.:
Master en Planificación y Diseño de Servicios Sanitarios.

97 Joyanes Pérez, M.^a G.:
Estudios sobre el valor nutritivo de la proteína del mejillón y de su concentrado proteico.

99 Fernández Escobar, R.:
Factores que afectan a la polinización y cuajado de frutos en olivo (Olea europaea L.).

104 Oriol Marfá i Pagés, J.:
Economía de la producción de flor cortada en la Comarca de el Mesesme.

- 109 García del Cura, M.* A.:
Las sales sódicas, calcosódicas y magnésicas de la cuenca del Tajo.
- 112 García-Arenal Rodríguez, F.:
Mecanismos de defensa activa en las plantas ante los patógenos. Las Fitoalexinas en la interacción Phaseolus vulgaris-Botrytis cinerea.
- 114 Santos Guerra, A.:
Contribución al conocimiento de la flora y vegetación de la isla de Hierro (Islas Canarias).

Serie Azul

(Derecho, Economía, Ciencias Sociales, Comunicación Social)

- 17 Ruiz Bravo, G.:
Modelos econométricos en el enfoque objetivos-instrumentos.
- 34 Durán López, F.:
Los grupos profesionales en la prestación de trabajo: obreros y empleados.
- 37 Lázaro Carreter, F., y otros:
Lenguaje en periodismo escrito.
- 74 Hernández Lafuente, A.:
La Constitución de 1931 y la autonomía regional.
- 78 Martín Serrano, M., y otros:
Seminario sobre Cultura en Periodismo.
- 85 Sirera Oliag, M.^a J.:
Las enseñanzas secundarias en el País Valenciano.
- 108 Orizo, F. A.:
Factores socio-culturales y comportamientos económicos.

