

EL CINCO INHIBE LA CONVERSION DE TIROXINA EN TRIIODOTIRONINA EN GRASA PARDA *IN VITRO*

MARIO PAVIA Jr.², BIRGIT PAIER¹, KARL HAGMÜLLER¹, ANGEL A. ZANINOVICH²

¹Departamento de Zoología, Universidad de Graz, Austria; ²Hospital de Clínicas José de San Martín, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires

Resumen Se estudió el efecto del cinc sobre la conversión de tiroxina (T₄) a triiodotironina (T₃) en homogenatos de grasa parda de ratas expuestas a temperaturas de 4°C o 22°C durante 24 h. Luego de sacrificar a los animales por dislocación cervical, se extrajo la grasa parda interescapular y se la homogeneizó en *buffer* sacarosa (320 mM) y HEPES (10 mM) pH 7.4. Se centrifugó el preparado a 4°C y se separó la capa que contiene la actividad 5'-deiodinasa. Se separaron alícuotas a las que se agregaron 50, 100 µM, 1 o 5 mM sulfato de cinc, más 0.5, 10 o 25 mM ditiotreitól (DTT) y 1 µCi ¹²⁵I-T₄. El preparado se incubó a 37°C durante 60 min luego de lo cual se hizo cromatografía en papel para separar los diferentes compuestos radioactivos del homogenato. En ratas mantenidas a 22°C, la deiodinación de T₄ produjo 13.3% de T₃, equivalente a 79 ± 30 pg/mg proteína/h. Las dosis de 1 y 5 mM cinc inhibieron significativamente la producción de T₃. En ratas expuestas a 4°C, la producción basal de T₃ se incrementó a 248 ± 37 pg/mg proteína/h. Al agregar cinc en dosis de 100 µM, 1 o 5 mM, se redujo significativamente la deiodinación de T₄. La acción inhibitoria del cinc sobre la producción de T₃ en la grasa parda tendría efectos deletéreos sobre la termogénesis en ese tejido.

Abstract *Zinc inhibits the in vitro conversion of thyroxine to triiodothyronine in brown adipose tissue.*

The effect of *in vitro* addition of zinc sulphate on T₄ deiodination in brown adipose tissue (BAT) of rats exposed to 4°C or 22°C temperature during 24 h, was studied. Animals were killed by cervical dislocation and BAT was immediately removed and homogenized in sucrose buffer (320 mM) containing HEPES (10 mM) pH 7.4. The preparation was centrifuged at 4°C during 10 min. Aliquots were separated adding 50, 100 µM, 1 or 5 mM zinc sulphate plus 0, 5, 10 or 25 mM dithiothreitol plus 1 µCi ¹²⁵I-T₄. The mixture was incubated at 37°C during 60 min. Aliquots were applied to Whatman paper and chromatographed. BAT from control rats kept at 22°C produced 79 ± 30 pg T₃/g protein/h. This value was significantly reduced in homogenates containing 1 or 5 mM zinc. In rats exposed to 4°C, T₃ production increased to 248 ± 37 pg/mg protein/h. The addition of 100 µM, 1 or 5 mM zinc significantly decreased T₃ production. The inhibitory action of zinc on BAT T₄ deiodination may have a deleterious effect on BAT thermogenesis.

Key words: triiodothyronine, thyroxine, brown adipose tissue

La producción de calor en el tejido adiposo pardo (BAT) es esencial para la sobrevivencia de los mamíferos inferiores en el frío. La activación de la termogénesis en el frío es muy rápida y es estimulada entre otros factores, por la acción conjunta de la noradrenalina (NA) y la triiodotironina (T₃). Ambas hormonas promueven la síntesis de varias proteínas esenciales para la producción y disipación del calor que se origina en la mitocondria del lipocito pardo^{1,2}. Una de esas enzimas es la 5'-deiodinasa, cuya actividad aumenta varias veces durante la exposición al frío³. El aumento de la producción de T₃ a partir de la deiodinación de tiroxina (T₄) en el BAT es un paso esencial para la termogénesis, al permitir que la NA active la expresión del gen de la proteína desacoplante (UCP). Esta proteína desacopla la fosforilación del ADP de las oxidaciones en la

cadena respiratoria mitocondrial, con lo cual la energía de las oxidaciones se disipa casi totalmente en forma de calor^{4,5}.

En estudios anteriores se comprobó que el cadmio, un metal tóxico, inhibe a la 5'-deiodinasa tipo II del BAT y disminuye significativamente la conversión de T₄ a T₃ en ese tejido⁶. El cinc, también un metal tóxico, produjo el mismo efecto sobre la 5'-deiodinasa tipo I del hígado de rata⁷, pero su efecto sobre la deiodinación de T₄ a T₃ en la grasa parda aún no se conoce. Dada la importancia que tiene la producción de T₃ para la termogénesis de la grasa parda y a través de ello para la sobrevivencia de los mamíferos inferiores, el presente trabajo estudió la acción del cinc sobre la conversión de T₄ a T₃ *in vitro* en grasa parda de ratas expuestas a 4°C o a 22°C.

Recibido: 17-IV-1998

Aceptado: 23-XII-1998

Dirección postal: Dr. Angel A. Zaninovich, Hospital de Clínicas José de San Martín, Avda. Córdoba 2351, 1120 Buenos Aires, Argentina
Fax: 54-11-4963-4107; E-mail: azaninovich@impsat1.com.ar

Material y métodos

Se estudiaron ratas Wistar de aproximadamente 250 g de peso con libre acceso al agua y comida (Purina chow). Un

Tabla 1.— Efectos del cinc sobre la conversión *in vitro* de tiroxina (T_4) a triiodotironina (T_3) en homogenatos de grasa parda, en presencia de 10 mM ditiotreitól

		$^{125}\text{I}-T_4$ deiodinada		$^{125}\text{I}-T_3$ generada	
		% (*)	pg/mg proteína/hora	% (**)	pg/mg proteína/hora
22°C					
Controles	(7)	32.6 ± 8.4	194 ± 49	13.3 ± 5.1	79 ± 30
Cinc					
50 µM	(6)	29.5 ± 6.8	176 ± 40	10.8 ± 4.8	64 ± 28
100 µM	(6)	20.2 ± 4.6 ^(a)	120 ± 27 ^(a)	8.3 ± 5.2	49 ± 30
1 mM	(7)	14.3 ± 3.8 ^(c)	85 ± 22 ^(c)	4.4 ± 1.5 ^(b)	26 ± 9 ^(b)
5 mM	(7)	9.3 ± 2.8 ^(c)	55 ± 16 ^(c)	1.3 ± 1.2 ^(c)	8 ± 7 ^(c)
4°C					
Controles	(7)	94.5 ± 6.2	516 ± 34	45.8 ± 6.7	248 ± 37
Cinc					
50 µM	(7)	88.2 ± 6.3	477 ± 33	39.2 ± 5.7	212 ± 30
100 µM	(7)	76.5 ± 8.6 ^(b)	413 ± 45 ^(b)	28.8 ± 6.2 ^(c)	156 ± 33 ^(c)
1 mM	(6)	28.6 ± 6.3 ^(c)	155 ± 34 ^(c)	12.5 ± 2.6 ^(c)	68 ± 14 ^(c)
5 mM	(6)	6.2 ± 2.8 ^(c)	33 ± 15 ^(c)	2.8 ± 1.5 ^(c)	15 ± 8 ^(c)

Los números entre paréntesis indican el número de experimentos. P versus el respectivo control: ^(a) < 0.05, ^(b) < 0.02; ^(c) < 0.01. (*) % de la dosis de $^{125}\text{I}-T_4$ agregada al homogenato, que se deiodinó. ** % de la dosis de $^{125}\text{I}-T_4$ que se convirtió en T_3 . Para el cálculo de la cantidad absoluta de T_3 , ver el texto.

grupo de animales fue colocado en jaulas individuales en una cámara fría a 4°C de temperatura durante 24 h previas al experimento. Otro grupo permaneció a temperatura ambiente (aproximadamente 22°C). Se utilizó $^{125}\text{I}-T_4$ marcada en posición 3' y 5' (Amersham, Inglaterra, actividad específica 1280 µCi/ug). Se determinó la pureza de este compuesto mediante cromatografía descendente de la solución estandar recibida del proveedor. Ditiotreitól (DTT) y sulfato de cinc fueron adquiridos en Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri. El sulfato de cinc tiene un peso molecular de 287.5, de los cuales 65.6 corresponden a cinc. Luego de sacrificar a los animales por dislocación cervical, se removió la grasa parda interescapular y se homogeneizó individualmente en *buffer* sacarosa (320 mM) y N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-4-butanesisulfonic acid (HEPES) 10 mM pH 7.4, en proporción de 1 g de tejido en 4 ml de *buffer*. Se centrifugó el preparado a 500 g a 4°C durante 10 min. Con este procedimiento se obtiene una capa sobrenadante y una infranadante. La capa infranadante contiene la actividad 5'-deiodinasa y fue utilizada para el experimento. A 200 µl de infranadante de cada homogenato se agregaron 20 µl conteniendo 0, 100 µM, 1 o 5 mM sulfato de cinc, más 5 µl de la solución de DTT (0, 5, 10 o 25 mM, concentración final) y 1 µCi $^{125}\text{I}-T_4$ (20 µl) conteniendo 0.8 ng de T_4 . El volumen total del incubado fue de 245 µl. Se usaron como testigos tubos libres de tejido, conteniendo T_4 radioactiva, *buffer* y reactivos similares a los agregados a tubos con homogenatos. Las muestras se incubaron durante 60 min en un baño a 37°C. La deiodinación se detuvo con un volumen igual de metanol: amonio (2 mM) (99:1).

Se tomaron 20 µl de cada tubo y de los tubos testigo y se sembraron en tiras de papel Whatman. Se hizo cromatografía descendente en el solvente alcohol amílico terciario: hexano: amonio (10:1:12) junto con los portadores (T_4 , T_3 , iodo) no radioactivos, por aproximadamente 18 h. Los cromatogramas se cortaron en segmentos de 0.5 cm cuya radioactividad se contó en un contador gama Picker. Los histogramas resultan-

tes permitieron la identificación clara de los compuestos radioactivos, que se correlacionaron con las áreas teñidas de tiras cromatográficas paralelas⁸. La radioactividad de los cromatogramas se corrigió de la actividad contaminante (no debida a $^{125}\text{I}-T_4$) presente en la cromatografía de la solución estandar recibida de fuente comercial y de la radioactividad contenida en los tubos testigo.

La cantidad absoluta de T_3 producida por deiodinación de $^{125}\text{I}-T_4$ se calculó en base a la actividad específica de la solución de $^{125}\text{I}-T_4$ y el porcentaje de $^{125}\text{I}-T_3$ en los homogenatos de BAT luego de la incubación, que se describen en la Tabla 1. El valor obtenido fue corregido por mg/proteína del homogenato y por hora. Estos valores indican la T_3 producida por la deiodinación de T_4 agregada al medio y no representan el pool total de T_3 del BAT. El mismo procedimiento se utilizó para calcular la cantidad absoluta de T_4 que fue deiodinada.

La concentración de proteínas del infranadante se midió por el método de Lowry et al.⁹ El estudio estadístico se hizo con el análisis de varianza y el test de Dunnett.

Resultados

El peso de la grasa parda por animal varió de 1180 a 1333 mg/kg de peso (aproximadamente 230-300 mg/rata). En ratas expuestas al frío no hubo variaciones significativas, aunque la grasa parda adquirió un color oscuro debido al aumento del flujo sanguíneo inducido por el frío. Se observan aumentos muy marcados de la masa de grasa parda después de varias semanas a baja temperatura¹⁰. La concentración proteica en el infranadante de ratas mantenidas a 22°C promedió 6.7 ± 1.5 (DS) mg/ml, mientras que en las ratas expuestas al frío su valor

Tabla 2.— Efectos del cinc sobre la deiodinación de $^{125}\text{I}-\text{T}_4$ en grasa parda (BAT) en presencia de diferentes concentraciones de DTT, a temperatura ambiente

		Concentración de DTT			
		0 mM	5 mM	10 mM	25 mM
		% de $^{125}\text{I}-\text{T}_4$ deiodinada			
Controles	(7)	13.6 ± 7.9	29.2 ± 11.1	32.6 ± 8.4	36.5 ± 11.4
Cinc					
1 mM	(7)	11.2 ± 4.1	13.0 ± 6.3 ^(b)	14.3 ± 3.8 ^(a)	12.7 ± 2.8 ^(a)
5 mM	(8)	10.0 ± 3.0	5.5 ± 2.2 ^(a)	9.3 ± 2.8 ^(a)	10.7 ± 2.5 ^(a)

DTT: ditiotreitól. Los números entre paréntesis indican el número de experimentos. Probability value versus el respectivo grupo control: ^(a) < 0.01; ^(b) < 0.02.

fue de 7.4 ± 1.1 mg/ml. La diferencia no fue significativa. La Tabla 1 muestra los resultados obtenidos luego de agregar a homogenatos de grasa parda sulfato de cinc en diversas concentraciones y 10 mM DTT. Las ratas normales mantenidas a temperatura ambiente deiodinaron $32.6 \pm 8.4\%$ de $^{125}\text{I}-\text{T}_4$, que representan 194 ± 48 pg de T_4 deiodinada/mg de proteína/hora. La T_3 generada por la deiodinación de T_4 fue de 79 ± 30 pg/mg proteína/hora. El agregado de sulfato de cinc en concentración de 50 μM no produjo cambios significativos en la deiodinación de T_4 . Al agregar 100 μM la deiodinación se redujo moderadamente ($P < 0.05$). La T_3 producida también disminuyó, pero la diferencia con el grupo control no fue significativa debido a la gran dispersión de los valores. El agregado de 1 a 5 mM de sulfato de cinc inhibió significativamente la conversión de T_4 a T_3 ($p < 0.02$ y < 0.01 respectivamente).

En ratas expuestas al frío, la deiodinación de T_4 en grasa parda de ratas controles fue muy marcada, alcanzando al 94.5% de la dosis agregada al homogenato, que representan 516 pg de T_4 /mg proteína/hora. Casi la mitad de esa cantidad (248 pg) se convirtieron en T_3 y el resto (no descrito en la Tabla) fue yodo libre. Al agregar sulfato de cinc 50 μM no hubo cambios, pero dosis de 100 μM , 1 o 5 mM inhibieron significativamente la conversión de T_4 a T_3 (< 0.05 , < 0.02 y < 0.01 , respectivamente).

La Tabla 2 muestra la deiodinación de $^{125}\text{I}-\text{T}_4$ por acción del cinc en presencia de concentraciones crecientes de DTT. Al agregar DTT al medio, se produjo un aumento significativo de la deiodinación de T_4 , que alcanzó un *plateau* con dosis de 5 y 10 mM DTT. No obstante, dosis crecientes de DTT no impidieron la acción inhibitoria del cinc sobre la 5'-deiodinasa.

Discusión

Numerosas enzimas y proteínas utilizan cinc para llevar a cabo sus procesos biológicos. Este metal es un com-

ponente esencial de más de 70 enzimas y participa en importantes procesos metabólicos de división celular, diferenciación celular, crecimiento, regeneración de tejidos, inmunidad celular, transmisión de información genética y funciones endocrinas^{11, 14}. Cumple también una función esencial para la función de enzimas relacionadas con la síntesis de ADN y ARN¹⁴ y sería necesario como co-factor de la enzima 5'-deiodinasa^{15, 16}. Los efectos de la deficiencia de cinc en la dieta han sido reconocidos desde hace tiempo, habiéndose observado que conduce a una mayor susceptibilidad a las infecciones, retardo del crecimiento y de la función reproductiva, disminución de la tiroxina en el plasma del hombre y animales de experimentación y bocio^{15, 17}. En el síndrome de Down el cinc plasmático está marcadamente disminuido¹⁵.

Los efectos del exceso de cinc sólo recientemente comenzaron a explorarse. Un ingesta mayor de la fisiológica (9-15 mg/día) ha producido manifestaciones tóxicas como fatiga, náusea y vómitos¹⁸. En un caso de un paciente esquizofrénico que ingirió 461 monedas hechas predominantemente con cinc (pennies post-1981), se produjeron necrosis masivas de hígado, páncreas y túbulo renales debido a la gran concentración de cinc en esos tejidos, que provocó la muerte luego de un mes¹⁹. También se observaron casos de anemia, debido a que el exceso de cinc inhibe la absorción de cobre en el intestino¹⁹. En animales de experimentación o en homogenatos de tejidos in vitro, el exceso de cinc provocó diversos cambios, entre ellos disminución sérica de la lipoproteína de alta densidad (HDL) y de las hormonas tiroideas^{20, 21}.

En el presente trabajo, el cinc bloqueó la conversión de T_4 a T_3 en homogenatos de BAT. El efecto fue muy similar al producido por otro metal tóxico, el cadmio, que inhibe a las 5'-deiodinasa del hígado²², grasa parda⁶ e hipófisis²³. La acción inhibitoria del cinc fue dosis-dependiente, ya que no tuvo efecto con dosis de 50 μM y alcanzó su máxima acción con la dosis de 5 mM.

El mecanismo por el cual el cinc inhibió la actividad de la 5'-deiodinasa no es conocido. El cinc, al igual que el cadmio, se une a los grupos sulfhidrilo de algunas enzimas y también a aminoácidos como la cisteína y a otras proteínas como la metalotioneína. Los grupos sulfhidrilo son esenciales para la actividad de la 5'-deiodinasa^{24, 25} y podría especularse que un exceso de cinc, como sucede con un exceso de cadmio^{6, 22}, al unirse a los grupos sulfhidrilo interfiere con la actividad de la enzima. Este posible mecanismo se correlaciona con observaciones previas donde un exceso de cinc redujo la concentración sérica de T₄²⁰. Los resultados que se muestran en la Tabla 2 indican que aunque los grupos sulfhidrilo promovieron la actividad de la 5'-deiodinasa, existirían otros factores que participan en la regulación de la actividad de esta enzima, ya que dosis crecientes de DTT no neutralizaron la acción inhibitoria del cinc. Observaciones similares fueron hechas por Harris et al.²⁶ y Chopra²⁷ al estudiar los grupos sulfhidrilos hepáticos.

Es interesante señalar que al inhibir la producción de T₃ en la grasa parda, el cinc puede interferir con la termogénesis de este tejido. Al respecto, estudios recientes demostraron que la termogénesis de la grasa parda en ratones obesos es afectada por la administración de cinc²⁸, por un mecanismo de inhibición de la síntesis de UCP, similar al que nosotros sugerimos para explicar la reducción en las oxidaciones mitocondriales en grasa parda de ratas tratadas con cadmio²⁹.

Bibliografía

- Nichols DG, Locke RM. Thermogenic mechanism in brown fat. *Physiol Rev* 1984; 64: 1-64.
- Himms-Hagen J. Brown adipose tissue thermogenesis: Interdisciplinary studies. *FASEB J* 1990; 4: 2890-98.
- Silva JE, Larsen PR. Potential brown adipose tissue type II thyroxine 5'-deiodinase as a local and systemic source of triiodo-thyronine in rats. *J Clin Invest* 1985; 76: 2296-305.
- Bianco A, Silva JE. Intracellular conversion of thyroxine to triiodothyronine is required for the optimal thermogenic function of brown adipose tissue. *J Clin Invest* 1987; 79: 295-300.
- Cageao LF, Noli MI, Mignone IR, et al. Relative roles of thyroid hormones and noradrenaline on the thermogenic activity of brown adipose tissue in the rat. *J Endocrinol* 1995; 145: 579-84.
- Paier B, Pavia MA Jr, Hansi C, Noli MI, Hagemüller K, Zaninovich AA. Cadmium inhibits the in vitro conversion of thyroxine to triiodothyronine in rat brown adipose tissue. *Environ Contam Toxicol* 1997; 59: 164-70.
- González Pondal M, Paier B, Noli MI, Tudino NB, Stripeikis JD, Hagemüller K, Zaninovich AA. Changes induced by zinc on thyroxine deiodination by rat liver in vivo and in vitro. *Acta Physiol Pharmacol et Ther Latinoam* 1995; 45: 34-41.
- Ceppi JA, Zaninovich AA. Effects of amiodarone on 5'-deiodination of thyroxine to tri-iodothyronine in rat myocardium. *J Endocrinol* 1989; 121: 431-4.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randal RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-75.
- Rothwell NJ, Stock MJ. Effects of denervating brown adipose tissue on the response to cold, hyperphagia and noradrenaline treatment in the rat. *J Physiol* 1984; 355: 457-63.
- Prasad AS. Discovery and importance of zinc in human nutrition. *Fed Proc* 1984; 43: 2829-34.
- Vallee B, Falchuk KH. The biochemical basis of zinc physiology. *Physiol Rev* 1993; 73: 79-119.
- Aggett PJ, Comerford JG. Zinc and human health. *Nutr Rev* 1995; 53: 16-22.
- Vallee BL, Coleman JE, Auld DS. Zinc fingers, zinc clusters, and zinc twists in DNA-binding protein domains. *Proc Natl Acad Sci* 1991; 88: 999-1003.
- Licastro F, Mocchenegiani E, Zannotti M, Arena G, Masi M, Fabris N. Zinc affects the metabolism of thyroid hormones in children with Down's syndrome: normalisation of thyroid stimulating and of reverse triiodothyronine plasmic levels by dietary zinc supplementation. *Int J Neurosci* 1992; 5: 259-68.
- Anonymous: Essential trace elements and thyroid hormones. *Lancet* 1992; 39: 1575-6.
- Wada I, King C. Effect of low zinc intakes on basal metabolic rate, thyroid hormones and protein utilization in adult men. *J Nutr* 1986; 116: 1045-53.
- Fosmire GJ. Zinc toxicity. *Am J Clin Nutr* 1990; 51: 225-7.
- Bennett DR, Baird CJ, Chan KM, Crookes PF, Bremmer CG, Gottlieb MM, Naritoku WY. Zinc toxicity following massive coin ingestion. *Am J Forensic Med Pathol* 1997; 18: 148-53.
- Dean CE, Hargis BM, Hargis PS. Effects of zinc toxicity on thyroid function and histology in broiler chicks. *Toxicol Lett* 1991; 57: 309-18.
- Sandstead HH. Requirements and toxicity of essential trace elements illustrated by zinc and copper. *Am J Clin Nutr* 1995; 1 (3 suppl): 621S-624S.
- Paier B, Hagemüller K, Noli MI, Stiegler C, Zaninovich AA. Changes induced by cadmium administration on thyroxine deiodination and sulfhydryl groups in rat liver. *J Endocrinol* 1993; 138: 219-24.
- Pavia MA, Paier B, Noli MI, Hagemüller K, Zaninovich AA. Evidence suggesting that cadmium induces a nonthyroidal illness syndrome in the rat. *J Endocrinol* 1997; 154: 113-7.
- Visser TJ, Does-Tobé I, van der Docter R, Hennemann G. Subcellular localization of a rat liver enzyme converting thyroxine to tri-iodothyronine and possible involvement of essential thiol groups. *Biochem J* 1976; 157: 479-82.
- Chopra IJ. Sulfhydryl groups and the monodeiodination of thyroxine to triiodothyronine. *Science*; 199: 904-6.
- Harris AEC, Fang SL, Hinerfeld L, Braverman LE, Vagenakis AG. The role of sulfhydryl groups on the impaired 3', 3,5-triiodothyronine generation from thyroxine in the hypothyroid, starved, fetal and neonatal rodent. *J Clin Invest* 1979; 63: 516-24.
- Chopra IJ. Alterations in monodeiodination of iodothyronines in the fasting rat: Effects of nonprotein sulfhydryl groups and hypothyroidism. *Metabolism* 1980; 29: 161-7.
- Chen MD, Lin PY, Chen PS, Cheg V, Lin WH. Zinc attenuation of GDP binding to brown adipocytes mitochondria in genetically obese (ob/ob) mice. *Biol Trace Elem Res* 1997; 57: 139-45.
- Noli MI, Pavia MA Jr., Mignone IR, Brignone JA, Hagemüller K, Zaninovich A. Cadmium chloride prevents the rise in rat brown adipose tissue mitochondrial respiration in response to acute cold stress. *Environ Contam Toxicol* 1998; 61: 31-7.