



03086
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

7
24

UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONALES
Y DE POSGRADO DEL COLEGIO DE CIENCIAS
Y HUMANIDADES

CENTRO DE NEUROBIOLOGIA

ACTIVIDAD 5'DESYODASA HEPATICA EN DOS
ESPECIES DE TELEOSTEOS EURIHALINOS:
LA TRUCHA ARCOIRIS (*Oncorhynchus mykiss*)
Y EL FUNDULUS (*Fundulus heteroclitus*).
CARACTERIZACION CINETICA Y EFECTO DE
LA SALINIDAD.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS FISIOLÓGICAS
P R E S E N T A
BIOL. AUREA OROZCO RIVAS

ASESOR: DR. CARLOS VALVERDE-R

MEXICO, D. F.

1997

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Esta tesis se realizó en el Centro de Neurobiología bajo la asesoría del Dr. Carlos Valverde-R.

Parte del trabajo experimental se realizó en el laboratorio del Dr. Paul Linser en el Whitney Laboratory de la Universidad de Florida.

Este trabajo fue apoyado por los siguientes donativos: Beca de Maestría de Conacyt (No de Registro 85753); Beca de Doctorado de Conacyt (No de Registro 92265); Proyecto PAPIIT IN 203996 y Proyecto Conacyt 1981 PN

***A mis hijos, Javier y Aurea. Gracias por su paciencia,
apoyo y amor.***

A Gustavo y a Eva. Gracias por estar siempre cerca de mi.

AGRADECIMIENTOS

De manera muy especial, agradezco al Doctor Carlos Valverde. Gracias por contagiarme el entusiasmo por la fisiología; por ser paciente en mis tiempos de necesidad; por tener confianza en mi; por acompañarme en el largo camino de mi formación. Gracias por todos los años que ha sido mi maestro y mi amigo.

A los miembros de mi comité tutorial, Dr. Carlos Arámburu de la Hoz, Dra. Verónica Guarner Lans, Dra. Teresa Morales y Dr. José Luis Arredondo. Gracias por el interés que le brindaron tanto a mi formación como al desarrollo de esta tesis.

A los miembros del jurado, Dr. Edgar Heimer y Dr. Rogelio Arellano. Gracias por sus sugerencias y comentarios.

A Tana. Gracias por todas tus enseñanzas, dentro y fuera del laboratorio.

Al Dr. Paul Linser, quien me apoyó y me brindó todas las facilidades en su laboratorio en el Whitney Laboratory, Florida.

A todos mis amigas del laboratorio, Bertha, Brenda, Claudia, Luz y Maricela. Gracias por su ayuda, su compañía y por las largas "sesiones de terapia de grupo" que compartimos.

A Tita y a Carlos. Gracias por su apoyo y su amor.

A mis hermanos, Amanda, Arabela, Gustavo, Luis Alfonso y Rafael. Gracias por su apoyo incondicional.

A mis amigas, Lety, Maricarmen, Martha, Monica, Nora y Rosalinda. Gracias por toda la ayuda que siempre me brindaron.

I N D I C E

RESUMEN

ABSTRACT

INTRODUCCIÓN

1

ANTECEDENTES

2

1. La Fisiología de la Glándula Tiroides

3

1.1 La Evolución de la Glándula Tiroides

3

1.1.1 Yodotirosinas y Yodotironinas

3

1.1.2 Antecedentes de la Función Tiroidea

4

1.1.3 El Endostilo

5

Generalidades

5

Aspectos Morfofuncionales

6

1.1.4 De Endostilo a Glándula Tiroides

7

Urochordata y Cefalochoadata

8

Agnata

8

1.1.5 Evolución de la Glándula y de la Función Tiroidea

9

Evolución de la Glándula

9

Evolución de la Función Tiroidea

10

1.2 La Glándula Tiroides

11

1.2.1 Aspectos Morfofuncionales

11

1.2.2 Variaciones Morfológicas

12

1.2.3 La glándula Tiroides en los Peces

13

2. Las Hormonas Tiroideas

15

2.1 Biosíntesis y Secreción

15

2.2 Transporte y Metabolismo

16

2.2.1 Las Proteínas Transportadoras de HT

16

Las Proteínas Transportadoras de HT en Peces

17

2.2.2 Metabolismo de HT

18

Conjugación

18

Modificación de la cadena Lateral

19

Rompimiento del enlace éter

19

Desyodación

19

Metabolismo de HT en Peces

20

2.3 Efectos Biológicos y Mecanismo de Acción	20
2.3.1 Efectos Biológicos de las HT en Peces	22
Las HT en Salmónidos: Esmoltificación, Migración y Reproducción	22
Hormonas Tiroideas en la Trucha arcoiris	25
Ritmos estacionales	25
Ritmos circadianos	25
Ayuno y HT	26
Temperatura y HT	26
Triyodotironina reversa	27
2.4 Control de la Función Tiroidea	27
3. Desyodación de Tironinas	29
3.1 Desyodasa Tipo I (DI)	30
3.1.1 Purificación de la Enzima	31
3.1.2 Clonación y Expresión de la Enzima	31
3.1.3 Características Cinéticas y Operacionales	33
3.1.4 El Gen	38
3.1.5 Probable Función	38
3.2 Desyodasa Tipo II (DII)	38
3.2.1 Purificación de la Enzima	40
3.2.2 Clonación y Expresión de la Enzima	41
3.2.3 Características Operacionales	42
3.2.4 Probable Función	45
3.3 Desyodasa Tipo III (DIII)	45
3.3.1 Purificación de la Enzima	45
3.3.2 Clonación y Expresión de la Enzima	46
3.3.3 Características Cinéticas y Operacionales	46
3.4 Actividad Desyodativa Hepática en Teleosteos	48
3.4.1 Actividad Enzimática 5'D	49
3.4.2 Actividad Enzimática 5D	50
4. Regulación y Significado Funcional de la Desyodación	51
4.1 Disponibilidad de Sustrato	51
4.1.1 Estudios en Peces	54
4.2 Aporte y Balance Energético	55
4.2.1 Estudios en Peces	59
4.3 Sistema Neuroendócrino	61
4.3.1 Sistema Nervioso Autónomo	61
4.3.2 Glucocorticoides	65
Estudios en Peces	67
4.3.3 Esteroides Sexuales	67
4.3.4 Prolactina y Peces	68

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	69
Hipótesis de trabajo	70
Objetivos	70
MATERIAL Y METODOS	71
Animales	71
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	71
<i>Fundulus heteroclitus</i>	71
Diseño experimental	71
1. Caracterización Cinética de la Actividad 5'D Hepática	71
Truchas	71
Fundulus	72
2. Perfil Ontogénico de la 5'D Hepática en la Trucha	72
3. Reto Osmótico y Actividad Desyodativa	73
Reto hiperosmótico	73
Reto hipoosmótico	73
Métodos	74
Cuantificación de la Actividad Desyodativa	74
RESULTADOS	76
1. Caracterización Cinética de la Actividad 5'D Hepática	76
Truchas	76
Tiempos y temperatura de incubación	76
Concentración de proteínas y cofactor	77
Cinéticas de sustrato	77
Efecto del cofactor (DTT) sobre la actividad 5'D	82
Efecto del PTU	82
Condiciones de ensayo	84
Fundulus	84
Concentración de proteínas	84
Temperatura de incubación	85
Cinéticas de sustrato	85
Condiciones óptimas de ensayo	88
2. Perfil Ontogénico de la 5'D Hepática en la Trucha	89
3. Reto Osmótico y Actividad Desyodativa	90
Reto hiperosmótico	90
Reto hipoosmótico	90

DISCUSIÓN	93
1. Caracterización Cinética de la Actividad 5'D Hepática	93
2. Perfil Ontogénico de la 5'D Hepática en la Trucha	96
3. Reto Osmótico y Actividad Desyodativa	99
CONCLUSIONES	103
BIBLIOGRAFIA	104

ANEXO 1

Balance Hidroosmótico en Peces
Regulación Hormonal
 Cortisol
 Prolactina
 Hormonas tiroideas

ANEXO 2

1. Orozco Aurea, Silva J.E. and Valverde-R C. (1997). Rainbow trout liver expresses two iodothyronine phenolic ring deiodinase pathways with the characteristics of mammalian types I and II 5'deiodinases. *Endocrinology*: 138 254-258
2. Valverde-R C., Croteau W., LaFleur Jr G.J., Orozco A. and St. Germain D. (1997). Cloning and Expression of a 5'-iodothyronine deiodinase from the liver of *Fundulus heteroclitus*. *Endocrinology* 138: 642-648
3. Orozco A., Linser P.J. and Valverde-R C. (1997). Salinity modifies outer-ring deiodinating (ORD) activity in *Fundulus heteroclitus*. *Proceedings of the 18th Congress of European Comparative Endocrinologists*. En prensa.

RESUMEN

Las hormonas tiroideas (HT) son esenciales para un gran número de procesos biológicos y prácticamente todos sus efectos son disparados por triyodotironina (T_3). La conversión de tiroxina (T_4) a su metabolito activo T_3 o a su metabolito inactivo triyodotironina reversa (rT_3) es extratiroidea, órgano-específica y está catalizada por una familia de enzimas denominadas desyodasas, las cuales son las principales determinantes de la disponibilidad y desecho de HT a nivel tisular. Así, las desyodasas tipos I (DI) y II (DII), actúan en la vía de activación catalizando la conversión de T_4 a su metabolito de mayor actividad, T_3 . La vía de inactivación está catalizada primordialmente por la desyodasa tipo III (DIII), la cual convierte a la T_4 y a la T_3 en metabolitos inactivos. Aunque su estudio apenas inicia y se ha circunscrito principalmente a especies homeotermas, se sabe que la regulación de las vías desyodativas es también un proceso órgano-específico y compartimentalizado, el cual, en términos generales, es dependientes de tres diferentes factores: el aporte y disponibilidad de sustrato; el aporte y balance energético y por algunos mensajeros neuroendócrinos. En esta tesis se estudiaron diferentes aspectos de la vía de activación de HT en el hígado de dos especies de teleosteos, la trucha y el fundulus: **1. Se caracterizó la cinética de la vía 5'D hepática en la trucha y el fundulus:** Nuestros resultados muestran que, en contraste con el resto de vertebrados adultos, el hígado de ambos teleosteos expresa además de la actividad DI, actividad DII. Las características cinéticas de ambas enzimas son, en términos generales, similares a las descritas para sus respectivas contrapartes en mamíferos. Sin embargo, la DI es menos eficiente para desyodar al sustrato secundario (T_4), y menos sensible para ser inhibida por PTU. Por otra parte, la DII presenta valores de V_{max} 6 (trucha) y 10 (fundulus) veces mayores que los reportados para el cerebro de rata. Este hallazgo es sorprendente ya que la actividad DII en el resto de los vertebrados es baja en condiciones fisiológicas normales y se expresa primordialmente en el sistema nervioso central, hipófisis y BAT. Así, el hígado de teleosteos resulta ser una fuente importante de DII. **2) Se cuantificó la actividad 5'D hepática durante un periodo de 70 semanas de la ontogenia de la trucha:** Las dos enzimas muestran un comportamiento bifásico, y su perfil temporal puede asociarse a procesos de crecimiento, diferenciación y maduración de los organismos. **3) Se analizó el efecto del reto osmótico sobre la actividad 5'D hepática en la trucha y el fundulus:** La DI y DII hepáticas muestran cambios diferenciales y opuestos cuando los peces son sometidos a un reto hiper- o hipoosmótico con un curso temporal semejante en ambos casos. El reto hiperosmótico reduce significativamente (~3 veces) la actividad DII hepática, mientras que el reto hipoosmótico la aumenta significativamente (~2 veces). Nosotros proponemos que el decremento significativo en la actividad DII hepática que ocurre durante el reto hiperosmótico puede estar asociado al bien documentado decremento de PRL circulante que ocurre durante esta respuesta adaptativa. De la misma manera, el aumento en la actividad DII hepática que resulta del reto hipoosmótico podría asociarse al también descrito aumento en la síntesis y secreción de PRL disparado por la disminución en la salinidad del medio.

ABSTRACT

Thyroid hormones (TH) are essential for many biological processes, including normal development, growth, and metabolism. Virtually all effects of TH are mediated by specific genomic effects triggered by triiodothyronine (T_3), which is produced from thyroxine (T_4) by extrathyroidal deiodination. Thus, conversion of T_4 to T_3 is the first step in TH action. Extrathyroidal T_4 deiodination regulates tightly and in an organ-specific manner both circulating levels and the local intracellular concentration of active and inactive iodothyronines. This peripheral biotransformation of thyronines is catalyzed by an enzyme family of membrane associated selenoproteins that have differing catalytic properties and are expressed in a tissue- and developmentally-specific fashion. Two deiodinases, the types I (DI) and II (DII), serve the activating or outer-ring deiodinative pathway (ORD) by converting T_4 to its metabolically more active derivative T_3 . The inactivating or inner-ring deiodinative pathway (IRD) is catalyzed primarily by the type III deiodinase (DIII), which converts T_4 and T_3 to inactive. Even when the study of the regulation of deiodinases is recent, it is known that it is also an organ-specific process which, in general terms, depends on three different factors: substrate supply, metabolic balance and on the effect of some messengers of the neuroendocrine system. We here studied different aspects of the ORD pathway in two teleostean species: trout and fundulus. **1) Kinetic characterization of the hepatic ORD pathway in trout and fundulus:** Our results showed the presence of both DI and DII activities in the liver of the two teleosts, constituting a unique example of DII-like activity expression in the liver of an adult vertebrate. Thus, and in contrast with current knowledge of other adult vertebrates, fish liver seems to play a dual role contributing to the generation of circulating as well as local hepatic T_3 . Furthermore, the liver of fundulus contains high levels of DII with V_{max} values even higher than those found in trout liver or the brain of hypothyroid mammals. This finding is most interesting as DII activity is low under normal physiological conditions and is expressed mainly in tissues with a low thyronine turnover rate in the rest of vertebrates. Thus, teleostean liver is an important source of DII. **2. Determination of hepatic ORD activity during a 70 week period of the trout ontogeny:** Both enzymes showed a biphasic pattern of activity and its temporal profile can be associated to growth, differentiation and maturation processes. **3) Effect of the osmotic challenge on hepatic ORD activity in the trout and fundulus:** DI and DII showed opposite and differential changes when exposed to a hypo- or hyperosmotic challenge. Hyperosmotic challenge significantly reduced (~3 times) hepatic DII activity while hypoosmotic challenge significantly increased (~2 times) it. We here propose that the significant decrease in hepatic DII activity elicited by hyperosmotic challenge could be associated to the well documented decrease in circulating PRL which occurs as an adaptative response. In the same manner, the increment on hepatic DII activity which resulted from hypoosmotic challenge could be associated to the also well documented increment in PRL synthesis and secretion triggered by the decreased environmental salinity.

INTRODUCCION

Con mi trabajo de tesis de licenciatura (Orozco, 1989) nuestro laboratorio inició el estudio de la fisiología tiroidea en los peces, específicamente en los salmónidos. Estas especies son explotadas comercialmente y por lo tanto cultivadas, lo cual permite obtener con relativa facilidad especímenes y muestras biológicas. Sin embargo, durante la búsqueda de información sobre la fisiología tiroidea en esta especie, encontré que además de escasa y fragmentada, existían contradicciones en cuanto a los niveles circulantes de las hormonas tiroideas de estas especies. Esta situación nos llevó a publicar la estandarización de los radioinmunoanálisis homólogos para cuantificar hormonas tiroideas en la trucha arcoiris, enfatizando la importancia de no perder de vista el contexto biológico del pez en la interpretación de la información generada (Orozco y col, 1992).

Actualmente se reconoce que los niveles circulantes de las tironinas explican parcialmente el *status* tiroideo del organismo, y que es su desyodación periférica la que determina en gran medida su concentración intracelular y la magnitud de su efecto biológico. Esta biotransformación es órgano específica y constituye el mecanismo por el cual se genera, a nivel local, la forma activa o inactiva de la triyodotironina (T_3). La desyodación está catalizada por tres isoenzimas que operan dos vías desyodativas independientes, la de activación y la de inactivación. Al igual que en el caso de los niveles circulantes, la información acerca de la desyodación periférica de hormonas tiroideas en peces es confusa y contradictoria. En efecto, como se revisa con detalle más adelante, en este grupo de vertebrados la caracterización de este sistema enzimático adolece de serios errores metodológicos.

Esta tesis es la continuación de mis trabajos iniciales y se diseñó para alcanzar los siguientes objetivos: a) caracterizar desde el punto de vista bioquímico y funcional a las enzimas que catalizan la vía de activación de las TH en el hígado de la trucha arcoiris y del *Fundulus heteroclitus*; b) analizar los cambios que dicha actividad enzimática exhibe durante la ontogenia, c) evaluar el efecto que tienen los cambios en salinidad sobre esa actividad enzimática.

ANTECEDENTES

La organización y procesos que caracterizan a los sistemas biológicos no existen ni transcurren de manera aislada. Por el contrario, los sistemas vivos son organizaciones fisicoquímicas complejas y abiertas que tienden a mantenerse en un estado estacionario, alejados del equilibrio termodinámico, mediante el intercambio de energía y materia con el medio ambiente. Consecuentemente y desde el punto de vista operacional, las estrategias y mecanismos de comunicación intercelular son uno de los atributos más conspicuos de los sistemas biológicos. En efecto, mediante estos mecanismos informáticos, los sistemas vivos controlan y regulan de manera ininterrumpida todas las funciones del individuo incluyendo las diferentes respuestas adaptativas que el organismo despliega frente a las fluctuaciones y demandas de su medio ambiente (Valverde, 1993).

El sistema neuroendócrino constituye el medio principal de comunicación del organismo, siendo las hormonas y los neurotransmisores los mensajeros que regulan la función celular. Es este sistema el que exhibe y coordina la mayor parte de las respuestas adaptativas del organismo ante los estímulos y/o demandas medioambientales

El eje hipotálamo-hipófisis-tiroides no es la excepción. Se sabe que la función tiroidea se modifica ante cambios en las condiciones del medioambiente, tales como alteraciones en la temperatura, fotoperiodo, cambios estacionales, cambios en el aporte alimenticio y otros. En el caso de los teleosteos, la función tiroidea también se modifica en respuesta a cambios en la osmolaridad del medio acuático. En esta respuesta como en otras, las HT actúan de una manera sinérgica o coactiva con otras hormonas y mensajeros del sistema

Por razones obvias, el mejor modelo estudiado en este respecto es el mamífero. Por esta razón, a continuación se describirán brevemente los procesos y mecanismos involucrados en la fisiología tiroidea en este bien estudiado grupo de vertebrados, así como en los peces.

1. La Fisiología de la Glándula Tiroides

1.1 La Evolución de la Glándula Tiroides

1.1.1 Yodotirosinas y Yodotironinas

El yodo es el elemento más pesado que se metaboliza en materiales biológicos. Su peso probablemente determina su escasez en la tierra, ya que únicamente constituye aproximadamente el 3×10^{-5} % de suelos y del 1 al 7×10^{-6} % del agua de mar (Wolff, 1964).

Se sabe que en todos los vertebrados la glándula tiroides está constituida por células especializadas que han desarrollado un mecanismo muy eficiente y específico denominado genéricamente bomba de yodo, el cual les permite concentrar activamente a este elemento y unirlo al aminoácido tirosina. Estos residuos de tirosina se encuentran formando parte de una glicoproteína específica de la glándula: la tiroglobulina (TgB) y su yodación da lugar a la síntesis de las moléculas de monoyodotirosina (MIT) y diyodotirosina (DIT). Además, la glándula posee la maquinaria enzimática necesaria para combinar estos aminoácidos yodados y sintetizar yodotironinas con actividad hormonal: las hormonas triyodotironina (T_3) y tetrayodotironina o tiroxina (T_4). Estas yodotironinas son, hasta el momento, las únicas moléculas tiroideas a las que se les conoce actividad biológica. La glándula sintetiza también pequeñas cantidades de un isómero de la T_3 llamado triyodotironina reversa (rT_3) y para la cual hasta el momento no se conoce actividad biológica (Valverde y col, 1994)

Aunque únicamente los vertebrados poseen glándula tiroidea, también se sabe que otros organismos son capaces de fijar yodo y unirlo a proteínas. Esta información es de gran interés, ya que a partir de ella se han realizado estudios filogenéticos encaminados a entender la aparición de mecanismos específicos para atrapar el yodo (bomba de yodo) y la relación con la especialización de los tejidos que capturan ese yodo en un órgano con características funcionales de una glándula endocrina o de secreción interna.

Para hacer más claro lo anterior, a continuación se revisarán los conocimientos actuales acerca de la filogenia de la glándula tiroidea.

1.1.2 Antecedentes de la Función Tiroidea

La organificación o biosíntesis de moléculas yodadas no es un proceso que se limite a especies vertebradas. En un principio se pensaba que únicamente los organismos que contaban con una glándula tiroidea eran capaces de fijar el yodo y unirlo a proteínas para formar hormonas tiroideas. Sin embargo, en la década de los años cincuenta, una serie de estudios bioquímicos y fisiológicos mostraron que el yodo se fija a tejidos y estructuras de algunos invertebrados e inclusive también de algunas plantas. Es importante hacer notar que la confiabilidad de esta información no es muy alta, ya que para su obtención se realizaron análisis cromatográficos menos desarrollados que los actuales (Clements-Merlini, 1962 a, b; Hoar, 1979; Young, 1981).

Como ya se mencionó, actualmente se sabe que el primer paso en la síntesis de yodotirosinas consiste en la unión del yodo al aminoácido tirosina para formar MIT y DIT. Ambas biomoléculas se encuentran presentes en algunas algas (c.ref. Roche & Yagi, 1952), corales (c.ref. Vinogradov, 1935), anélidos y moluscos (c.ref. Gorbman et al, 1954), insectos (Limpel & Casida, 1957), así como en todos los vertebrados (Young, 1981). También se ha documentado la presencia de yodotironinas en la mayoría de los organismos antes citados (Gorbman, 1954; Limpel & Casida, 1957).

Cabe mencionar que en los invertebrados, un alto porcentaje del yodo unido a proteínas se encuentra formando parte de estructuras corneas o fibrosas, y que una cantidad menor se encuentra unida a órganos blandos, generalmente epitelios (Gorbman et al, 1954; Limpel y Casida, 1957).

La función que desempeña el yodo y/o las biomoléculas yodadas en estos organismos no se conoce, pero uno no puede dejar de preguntarse acerca de la relación que existe entre las moléculas yodadas en organismos inferiores en la escala filogenética, sin función aparente, y la gran importancia biológica que tienen estas mismas biomoléculas en los vertebrados. Esto ha llevado a la elaboración de algunas hipótesis, las cuales se discuten más adelante.

1.1.3 El Endostilo

Generalidades. La primera evidencia morfológica y funcional de la existencia de un órgano fijador de yodo se ha documentado en los protocordados. Estos organismos filtradores presentan en el piso de la faringe una estructura hendida que ha recibido el nombre de endostilo. Este órgano posee tractos longitudinales de células secretoras de una sustancia mucosa. El moco secretado por estas células a la luz del endostilo forma una capa que se extiende por la faringe, atrapando las partículas de alimento. La secreción mucosa junto con el alimento son conducidas hacia el esófago para después ser digeridas (Young, 1981).

Aunque el endostilo es un órgano digestivo, se sabe que algunas de sus células fijan yodo de manera selectiva, permitiendo la formación de MIT y DIT e inclusive de T_3 y T_4 . Este hallazgo aunado a otros hechos como su localización anatómica y origen embrionario, han dado lugar a que se le considere como "precursor" de la glándula tiroidea (Barrington, 1959). A continuación se revisa la morfofisiología del endostilo y su evolución en los protocordados.

Aspectos Morfofuncionales. La organización morfológica general del endostilo es bien conocida (Barrington, 1965). Como ya mencionamos, el endostilo secreta un material mucoso que recubre la faringe y le confiere a ésta, la función de un filtro o "coladera" con movimiento, filtrando la corriente de agua que pasa a través de las aberturas branquiales (estigmata). Se ha encontrado, por microscopía de luz, que esta membrana se origina a partir de tres pares de cordones de células glandulares (Figura 1; zonas 2,4 y 6), las cuales están separadas entre si por tres pares de tractos de células ciliadas (zonas 1,3 y 5), dos de las cuales presentan cilios cortos y el tracto basal o zona 1, con cilios muy largos. Además de estas seis zonas, existen otros dos tipos de células que forman los labios dorsales del zurco endostilar, una zona de epitelio no ciliado (zona 7) y la otra de células ciliadas (zona 8), las cuales son responsables de dirigir la secreción endostilar hacia las paredes laterales de la faringe (FIGURA 1).

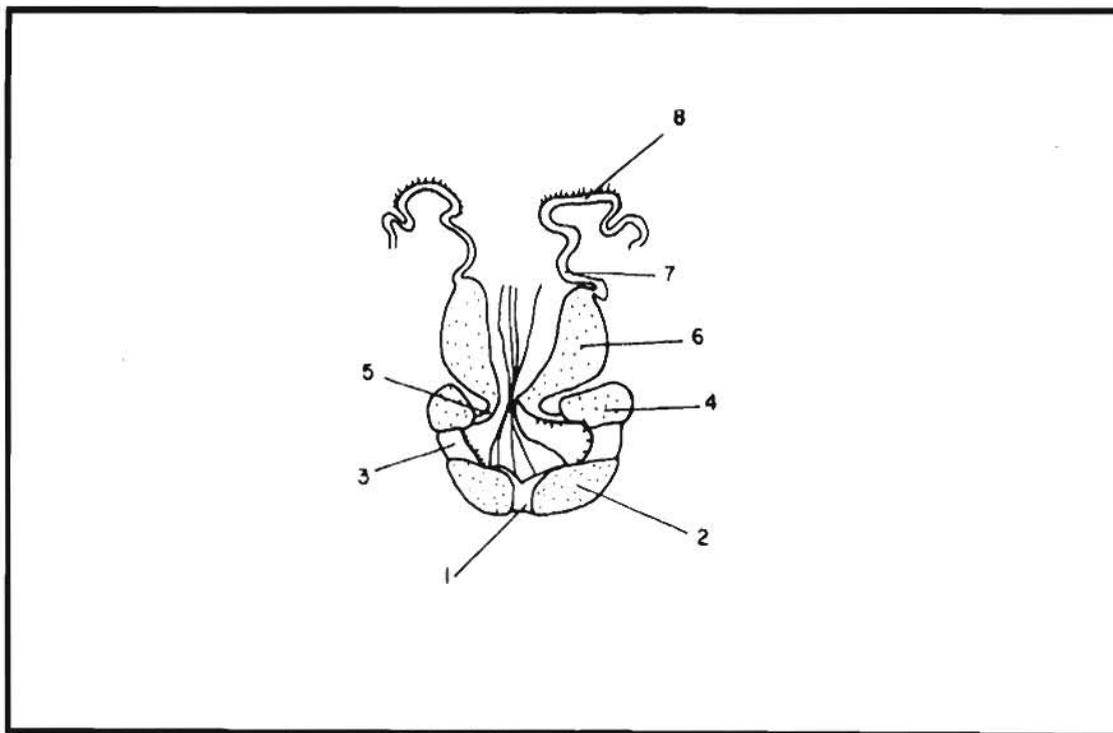


Figura 1. Diagrama transversal del endostilo en donde 1, 3 y 5 corresponden a las células ciliadas, 2, 4 y 6; a la porción glandular; 7, al epitelio no ciliado y 8, a las células ciliadas que expulsan la secreción a la faringe.

Se sabe que las células de las zonas 2 y 4 son secretoras de proteínas y que las de la zona 6 secretan tirosina y mucopolisacáridos. Las células de la zona 7 unen y acumulan yodo y promueven la síntesis de productos yodados. Estos productos y las secreciones de las zonas 2, 4 y 6 son vertidos a la luz del endostilo formando así la sustancia mucosa que va a recubrir a la faringe en forma de membrana. Esta membrana mucosa es capaz de atrapar partículas hasta de una micra de diámetro. Se considera que las células de las zonas 7 y 8 del endostilo son las homologas a las células tiroideas o prototirocitos (Barrington, 1965; Young, 1981).

En homogeizados de endostilo se han encontrado MIT, DIT, T₃ y T₄, pero no hay evidencia de que las yodotironinas secretadas por el animal ejerzan algún efecto hormonal (Young, 1981).

Por otra parte, se ha encontrado que la sangre de los protocordados une yodo en proporciones significativamente mayores que en el hombre y otros vertebrados (126 vs 6.3 µg/dl respectivamente). Este yodo circulante se encuentra unido a proteínas y se ha demostrado que está organificado, ya que por cromatografía se han encontrado MIT, DIT, y T₄ y ocasionalmente T₃ (Kennedy, 1966). Estas observaciones y el hecho de que la inhibición de la captura de yodo por el endostilo mediante la administración de tiocianato de potasio (KCNS), no provoca la desaparición de las yodotirosinas yodadas, ha llevado a proponer la posible existencia de dos mecanismos fijadores de yodo en protocordados: un mecanismo especializado, que involucra al endostilo, y otro más primitivo que no requiere de órganos especializados y que posiblemente dio lugar al primero. Esta información no es muy confiable, ya que solamente existe un estudio al respecto (Kennedy, 1966).

1.1.4 De Endostilo a Glándula Tiroides

En el Phylum Chordata, excepto en Hemichordata, todos los organismos presentan ya sea endostilo o glándula tiroides. Inclusive en Agnatha, ontogénicamente

el endostilo de la fase larvaria da lugar a la glándula tiroides de la vida adulta. Estos hechos representan por el momento la evidencia más sólida para considerar que efectivamente el endostilo es un primordio o precursor de la glándula tiroides (Clements-Merlini, 1962a,b; Barrington, 1975; Gorbman, 1978; Young, 1981).

Sin embargo, ya se ha mencionado que organismos de líneas evolutivas distintas a la de los cordados vgr., artrópodos, son capaces de fijar y organificar yodo. Este hecho sugeriría que el yodo puede estar participando de alguna manera en la fisiología del organismo, ya sea como tironinas, o por sí solo (Gorbman, 1955).

Aunque no exista evidencia contundente para comprobar que el endostilo efectivamente da lugar a la glándula tiroides, a continuación se revisarán los cambios que ocurren en este órgano a lo largo de la filogenia y su transformación en glándula tiroides.

Urochordata y Cephalochordata. En ambos subphyla, el endostilo cumple la misma función secretora de moco y atrapadora de yodo. También en ambos se han identificado MIT, DIT, T₃ y T₄ en la luz del endostilo. La única diferencia que se conoce, consiste en que cephalochordata no presenta la hilera de células secretoras que corresponden a la zona 6 (Barrington, 1959).

Agnatha. La larva amoceta pertenece al primer grupo de cordados verdaderos y sufre una metamorfosis transformándose en su vida adulta en lamprea. Esta larva posee un endostilo que aparece en el desarrollo temprano como dos órganos hendidos que se extienden del primero al quinto arco branquial y están separados por un septo medio. El lumen del endostilo se encuentra abierto hacia la faringe por el ducto hipobranquial y es este ducto el que se cierra en la metamorfosis. Se reconocen seis tipos de células en este endostilo, y únicamente dos de estos tipos se consideran homólogos a las células epiteliales foliculares de la tiroides: las células de las zonas 7 y 8. El resto de las zonas celulares degenera durante la metamorfosis. Por lo que

respecta a la fase larvaria, se ha propuesto que el endostilo únicamente sea un órgano primitivo de alimentación con función secretora de moco. En contraste, en el animal adulto, el órgano se reconoce desde el punto de vista morfofuncional como una glándula tiroides verdadera y se considera que de ser un órgano exocrino relacionado con la alimentación, pasa a ser una glándula de secreción interna (Clements-Merlini, 1962a,b; Fujita, 1980; Hoar, 1979; Young, 1981).

En la lamprea adulta y en todos los cordados superiores, las yodoproteínas sintetizadas en las células tiroideas son vertidas al torrente sanguíneo, y se conoce que su síntesis y secreción es controlada por señales específicas de naturaleza neuroendócrina que se describen más adelante. Es decir, a partir de la lamprea adulta existe una glándula tiroides totalmente endocrina (Hoar, 1979).

1.1.5 Evolución de la Glándula y de la Función Tiroidea

Existen dos teorías importantes que tratan de explicar la evolución de la glándula tiroides: a) la teoría elaborada por Gorbman (1955) propone los cambios que debieron haber ocurrido para que surgiera la glándula tiroides y b) la teoría propuesta por Etkin (1978), quien trata de explicar la evolución de la función tiroidea. Como se verá a continuación, ambas teorías son complementarias.

Evolución de la Glándula. Gorbman parte del hecho de que en los anélidos, moluscos y artrópodos se han encontrado yodoproteínas en o muy cerca de la boca o cavidad faríngea. Este investigador propone la siguiente secuencia evolutiva para explicar el desarrollo de la glándula tiroides:

- Las yodoproteínas de la cavidad bucal o faríngea fueron arrastradas o "lavadas" hacia el tracto digestivo.
- La T_4 liberada por hidrólisis durante la digestión intestinal pudo involucrarse en actividades metabólicas de los precordados.

- Favorecidos por la evolución, los organismos desarrollaron una fuente de yodoproteínas más grande y segura, este sería el caso de los protocordados y de la larva amoceta, que presentan su fuente de yodoproteínas en el endostilo. En estos organismos, la liberación de T_4 seguiría ocurriendo por hidrólisis en el tubo digestivo.
- Al cerrarse el ducto endostilar de la lamprea adulta y transformarse el endostilo en glándula tiroidea, se elimina la dependencia de enzimas digestivas para liberar a las hormonas tiroideas. Esto se debe a que las células que forman las yodoproteínas también proveen la proteasa que permite que la hormona se difunda a la sangre.

Evolución de la Función Tiroidea. En este contexto, la teoría pretende explicar la diversidad de funciones que exhiben las yodotironinas en los diferentes vertebrados. Etkin propone lo siguiente:

- La glándula tiroidea se originó a partir de alguno de los diversos tejidos de prevertebrados ancestrales que presentaban la capacidad de concentrar yodo del agua de mar y almacenarlo en una biomolécula: la T_4 .
- El yodo participaba de alguna manera en el metabolismo de dichos organismos, probablemente como micronutriente.
- Al surgir los primeros vertebrados de agua dulce, se requirió de un órgano especializado que concentrara, almacenara y asegurara un suministro de yodo al organismo.
- La persistencia de la glándula tiroidea en todos los vertebrados se puede entender en función del papel metabólico del yodo y de su molécula acarreadora, la T_4 . Su

persistencia la hizo accesible como "señal" cuando en la evolución de los vertebrados surgió la necesidad de un regulador químico.

- Así pues, cuando surgió la homeotermia en los mamíferos, las moléculas tiroideas se coaptaron para participar en la regulación de los cambios en la producción de calor. Cuando los anfibios desarrollaron su proceso de metamorfosis, la T_4 se utilizó como señal reguladora del proceso. La misma molécula se adaptó en varias líneas de la evolución de los vertebrados para ayudar a regular otros procesos fisiológicos relacionados a migraciones estacionales y reproducción.

Estas teorías pueden orientarnos acerca de la posible evolución morfofuncional de la glándula tiroides, pero una vez más es importante destacar que los experimentos que dieron lugar a ellas datan de hace más de veinte años. Sería interesante retomarlos con metodología actualizada, y obtener información más específica que permita entender mejor la evolución tanto de la glándula como de las diferentes moléculas yodadas.

1.2 La Glándula Tiroides

1.2.1 Aspectos Morfofuncionales

En todos los cordados, la glándula tiroides se origina a partir de la formación de un botón ventral en el piso de la faringe embrionaria, entre el primer y segundo saco branquial. Inicialmente, la glándula se diferencia formando cordones celulares que después se separan para formar grupos de células que formarán los folículos tiroideos. Estos grupos celulares secretan un fluido proteico denominado "coloide", que se acumula extracelularmente en el centro de los folículos tiroideos. Esta actividad secretora eventualmente da lugar a un espacio lleno de coloide; el "lumen" del folículo que queda rodeado de una capa de células epiteliales, o sea, el epitelio del folículo. La porción de la célula folicular o tirocito que tiene contacto con el lumen se conoce como parte apical, este extremo de la célula presenta microvellosidades. El núcleo se

encuentra generalmente en la parte "basal" de la célula, que es el extremo más alejado del lumen (Malacara y col, 1979; Flores y Cabeza, 1984). Así pues, la glándula tiroides esta formada por un gran número de folículos encapsulados en tejido conectivo y con una red capilar muy densa que rodea al folículo (Norris, 1980).

El folículo es la unidad estructural y funcional de la glándula tiroides. Como ya se mencionó, éste último incluye una capa de epitelio simple que reviste a una cavidad que esta llena de un material espeso llamado coloide. El coloide representa un reservorio de la secreción de los tirocitos y contiene glucoproteínas, enzimas y tiroglobulina. Esta última es una glucoproteína que sirve de soporte para la síntesis y almacenamiento de las HT, lo cual será tratado más adelante (Malacara y col, 1979; Norris, 1980; Flores y Cabeza, 1984). Así, la tiroides elabora y secreta al torrente sanguíneo el total de la T_4 , un pequeño porcentaje (~20%) de la T_3 , y una cantidad aún menor (~1%) de la rT_3 y del resto de las tironinas circulantes (Escobar y col, 1992)

1.2.2 Variaciones Morfológicas

Se sabe que básicamente la glándula tiroides opera de la misma manera en todos los vertebrados y que su origen, estructura y función es muy similar en todos los organismos que la poseen. Sin embargo, existen diferencias en la forma en que se agregan los folículos tiroideos. Estas diferencias morfológicas se encuentran ilustradas en la FIGURA 2.

Además de la forma de agregación folicular, es importante hacer notar una diferencia estructural peculiar que solamente se presenta en la glándula tiroides de los mamíferos. En las regiones interfoliculares se encuentran unas células llamadas **parafoliculares** o células "C", que son secretoras de calcitonina, hormona que participa en la regulación del metabolismo del calcio. En el resto de los vertebrados, esta hormona se sintetiza en una glándula separada conocida con el nombre de cuerpo ultimobranquial (Barrington, 1975; Norris, 1980; Young, 1981).

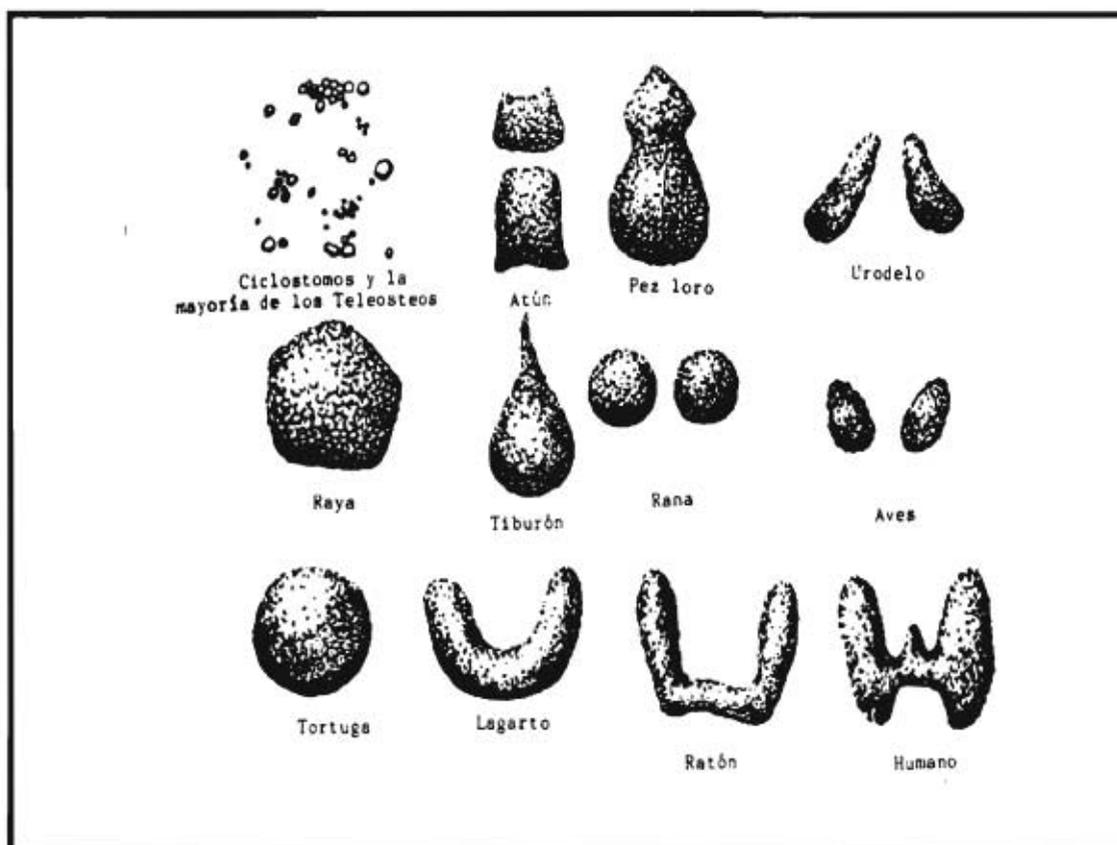


Figura 2. Morfología de la glándula tiroides en diferentes grupos de vertebrados.

1.2.3 La Glándula Tiroides en los Peces

Las glándulas tiroides de los peces comparten las principales características funcionales con el resto de los vertebrados: 1) sus unidades histológicas funcionales son los folículos, 2) poseen la capacidad de atrapar yodo inorgánico e incorporarlo a los residuos de tirosina de la tiroglobulina y 3) la composición de aminoácidos de la tiroglobulina es parecida a la de mamíferos. Sin embargo, en los peces, los folículos no se encuentran agrupados formando una glándula tiroides propiamente dicha, sino que están dispersos en pequeños cúmulos de tejido folicular (Gorbman, 1969; Lagler y col, 1977; Matty, 1985). Aunque algunos peces presentan la glándula tiroides encapsulada (vgr; pez loro), en la mayoría la distribución de los folículos es peri-aórtica (aorta ventral) y en algunos casos puede presentar distribución heterotópica peri-branquial.

A diferencia del resto de los vertebrados, la glándula tiroidea de los peces secreta primordialmente T₄, siendo la secreción tiroidea de T₃ despreciable. La evidencia experimental que apoya esta noción es sólida y se basa en lo siguiente:

- Los extractos tiroideos de trucha y otros teleosteos contienen niveles muy bajos de T₃ (Kuhn, 1993).
- Las inyecciones de TSH elevan significativamente los niveles circulantes de T₄, pero no modifican los de T₃ (Chan y Eales, 1975; Milne y Leatherland, 1980; Swanson y col, 1988; Inui y col, 1989).
- La T₃ plasmática marcada endógenamente no se eleva después de inyecciones de TSH (Chan y Eales, 1976).
- No se detectó liberación de T₃ en tejido tiroideo perfundido *in vitro* en presencia o ausencia de TSH (Grau y col, 1986).

Recientemente y utilizando un modelo matemático, se mostró que en truchas que ayunaron durante 5 días y a las que se administró con ¹²⁵I-T₃ y ¹²⁵I-T₄, la glándula tiroidea secretó entre el 75 y 81 % de la T₃ (Sefkow y col, 1996). Los autores proponen que los niveles bajos de T₃ circulante encontrados en los extractos tiroideos de peces puede deberse a una rápida conversión intratiroidea de T₄ a T₃ inmediatamente antes de la secreción, lo que no permitiría su fácil detección bajo las condiciones de estimulación por TSH exógena.

2. Las Hormonas Tiroideas

Las hormonas tiroideas (HT) juegan un papel crucial en el desarrollo, crecimiento y maduración normal del sistema nervioso central de los vertebrados, y se sabe que participan en un gran número de eventos fisiológicos. Generalmente se acepta que el efecto de las HT puede ser directo, indirecto o permisivo. El efecto directo está mediado por la interacción de la T_3 con su receptor nuclear, mientras que la tiroxina o T_4 actúa como prohormona para la neogénesis local de T_3 . Los efectos indirectos o permisivos de las HT son aquellos en que aumentan la acción de otras hormonas o factores de crecimiento en la activación génica o en alguna otra función celular (Oppenheimer y col, 1987; Larsen, 1989).

2.1 Biosíntesis y Secreción

Como ya se mencionó, la biosíntesis de las HT depende primordialmente del aporte dietético de yodo y por lo tanto, el primer paso para su síntesis consiste en la captación o transporte de yodo al interior de la célula folicular tiroidea. Este transporte constituye un proceso activo y está mediado por un mecanismo energético denominado genéricamente bomba de yodo (De Groot y Taurog, 1979; Guyton, 1984; Escobar y col, 1992).

Una vez en el interior de la célula tiroidea, el yoduro, que es la forma "inorgánica" del yodo, es convertido por acción de las peroxidasas tiroideas en "yodinio", una forma reactiva capaz de unirse o "yodar" a los residuos de tirosina que están presentes en la tiroglobulina (TgB). Esta glucoproteína de peso molecular elevado (660,000 daltons) está formada por 5,650 aminoácidos, de los cuales aproximadamente 125 corresponden a tirosina. En estos residuos se lleva a cabo la yodación para producir monoyodotirosina, precursor necesario para la diyodotirosina. A partir de estas yodotirosinas sin acción biológica aparente, se forman las yodotironinas T_3 y T_4 . La síntesis de las yodotironinas comprende el acoplamiento de dos residuos yodotirosilo (MIT o DIT). En esta reacción un yodotirosilo es el receptor para la síntesis

hormonal y el otro es el donador. El donador es un grupo yodofenilo que se separa de la cadena y se une al residuo receptor para formar el anillo externo de la yodotironina. Las yodotironinas permanecen como parte de la estructura primaria de la TgB en el lumen folicular, en donde se almacenan hasta su posterior biotransformación para ser secretadas (De Groot y Tautog, 1979; Gaveret y col, 1980; Lehman, 1982; Valverde-R y col, 1989; Green, 1987; Taurog, 1991; McNabb, 1992).

Las HT biológicamente activas T_3 y T_4 se liberan de la TgB por proteólisis. Las vellosidades de la parte apical de la célula folicular toman, por endocitosis, porciones de coloide y en su interior en donde lo unen a lisosomas que contienen enzimas proteolíticas. Estas vacuolas lisosomales transportan el coloide hacia la parte basal de la célula y los productos de la proteólisis - yodotironinas y tiroglobulina - son secretados por exocitosis hacia la circulación sanguínea (Taurog, 1991, McNabb, 1992).

2.2 Transporte y Metabolismo

2.2.1 Las proteínas transportadoras de HT.

Las HT son moléculas hidrofóbicas que no circulan libres en la sangre, sino que lo hacen "unidas" a proteínas transportadoras. En todos los vertebrados se han identificado por lo menos dos de las siguientes proteínas transportadoras de tironinas (TBPs): la globulina transportadora de HT (TBG), la prealbúmina (TBPA), la albúmina (ALB) y la transtiretina (TTR). Estas proteínas enlazan a las HT de manera que solo una pequeña fracción (0.018 - 0.016 %) de la cantidad total secretada queda libre. En humanos, la proteína con mayor afinidad para T_3 y T_4 es la TBG, la cual une entre el 55 y el 60 %, mientras que la TBPA y la ALB unen entre el 25 al 30 y el 10 % respectivamente (Robbins, 1978; Robbins y Bartalena, 1986). La unión de las tironinas con las TBPs no solo determinan su disponibilidad sino también influye sobre su metabolismo, excreción y actividad biológica (Robbins, 1991; McNabb, 1992).

Las HT unidas a proteínas son metabólicamente inactivas y se considera que constituyen una fuente de almacenamiento. La vida media de la T₄ circulante en el hombre es de 6 a 7 días, mientras que la de la T₃ es más corta (2 días). Esta diferencia es secundaria a la distinta afinidad que las proteínas transportadoras tienen para una y otra tironina (Robbins y Bartalena, 1986).

CUADRO 1. PROTEINAS TRANSPORTADORAS DE TIRONINAS EN VERTEBRADOS

Clase	Prealbúmina (TBPA)	Albúmina (Alb)	Transtiretina (TTR)	α-Globulina (TBG)
Peces	6.8	43.5	18.9	---
Anfibios	42.2	40.1	7.2	---
Reptiles	20.0	50.5	8.5	---
Aves	15.1	65.1	6.5	---
Mamíferos				
Humanos	10.6	20.0	5.0	47.8
Vaca	4.5	17.7	11.7	61.6
Caballo	15.7	52.3	16.5	11.8
Ratón	12.9	31.6	23.0	10.3
Rata	15.1	61.2	10.9	2.5

Las cifras representan el % de T₄ unida a la proteína correspondiente. Obsérvese que la TBG cuya constante de afinidad para la T₄ es la más elevada ($K_a=10 \times 10^{-10}$ mol/L), solo está presente en los mamíferos (Tanabe y col, 1969; Refetoff y col, 1970).

Las proteínas transportadoras de HT en peces. En el caso particular de los peces, y como se muestra en el CUADRO 1, se conoce que también existen tres proteínas transportadoras: La TBPA, la ALB y la TTR. Es importante hacer notar la total ausencia de la TBG. En cuanto a la afinidad de estas proteínas a HT, se ha observado que la unión es poco estable y muy débil (Refetoff, 1970). La ALB es la proteína con mayor afinidad a T₄, uniendo entre el 40 y el 60% de esta hormona, según la especie

de pez. La TBPA une entre el 15 y el 20% de T₄ y la TTR une también alrededor del 20% (Yuichi et al, 1969).

2.2.2 Metabolismo de HT

El metabolismo de las HT comprende principalmente cuatro acciones enzimáticas específicas: a) la conjugación con sulfato o glucoronato; b) la modificación de su cadena lateral; c) el rompimiento del enlace éter y d) la desyodación secuencial en ambos anillos (Chopra y col, 1978; Valverde-R y col, 1989). Estas vías son importantes en la degradación y excreción de estas hormonas y representan el 20% de la degradación de T₄. De todas, la desyodación de las HT es la vía metabólica más importante no solo por su papel dual en la activación/inactivación de las tironinas, sino también por su papel como una vía de recuperación y reciclamiento del yodo. La importancia de estas vías metabólicas que no son mutuamente excluyentes y que pueden operar secuencialmente, como es el caso de la sulfoconjugación que parece favorecer su posterior desyodación en algunos tejidos.

Conjugación. El grupo hidroxilo del anillo externo de las yodotironinas puede ser esterificado por una reacción de conjugación con ácido glucurónico o con ácido sulfúrico para formar glucurónidos o sulfatos respectivamente. La formación de estos conjugados con T₄ y rT₃ es rápida y parece depender de la posición 3' y 5' del yodo en el anillo fenilo que favorece esta reacción. Mediante su conjugación, los compuestos lipofílicos (T₄ y T₃) son convertidos en derivados hidrofílicos (T₄-glucurónido o T₃-sulfatada), los cuales rápidamente son excretados por la bilis o la orina. La conjugación de la T₄ con ácido glucurónico es más importante que en el caso de la T₃, mientras que para esta última lo es la conjugación con sulfato. La conjugación de las HT tiene lugar en su mayor parte en el hígado, pasando los metabolitos a la bilis e intestino en donde unos son rehidrolizados a T₄ y T₃ y reabsorbidos, eliminándose solo una pequeña fracción por heces fecales. En varios tejidos se lleva a cabo la desulfatación de la T₃ y esto implica una reactivación de la T₃-sulfatada. Además, hay evidencias de que la sulfoconjugación de la T₃ precede a la monodesyodación y que ésta es su más

importante ruta de degradación. Por otra parte, con base en sus características cinéticas se ha determinado que la forma sulfatada de la T_3 es preferencialmente desyodada sobre la forma nativa de la hormona ya que la desyodasa tiene una V_{max} más elevada y una K_m aparente menor cuando el sustrato es la T_3 -sulfato que cuando lo es la T_3 nativa (Sato y Robbins, 1981; Burger, 1986; Visser y col, 1991; Köhrle y col, 1991)

Modificación de la cadena lateral. La desaminación y descarboxilación oxidativa de la cadena aminoácido lateral resulta en la producción de análogos de ácido acético de HT, los ácidos 3,5,3',5'-tetrayodotiroacético (Tetrac), y 3,5,3'-triyodotiroacético (Triac). Este último puede ser producido por la desaminación/descarboxilación o por desyodación del Tetrac y es degradado por la misma vía por la cual se degrada su hormona precursora (desyodación y conjugación). Estos análogos presentan una alta afinidad por los receptores nucleares de T_3 , sin embargo tienen poca o ninguna acción fisiológica, probablemente debido a su rápida degradación (Pittman 1979; Köhrle y col, 1991)

Rompimiento del enlace éter. Esta vía presenta una de las más importantes reacciones metabólicas de la HT en el hombre. Es una reacción oxidativa que produce diyodotirosinas especialmente cuando se estimula la actividad de la peroxidasa en los tejidos. Este efecto se ha observado en leucocitos durante los procesos metabólicos que acompañan a la fagocitosis en donde se incrementa tanto la captación celular como la subsecuente degradación de T_4 en mono y diyodotirosinas (Köhrle y col, 1991).

Desyodación. En los últimos años se ha reconocido que la monodesyodación tisular de T_4 representa la principal fuente de T_3 endógena (aproximadamente 75% del total) y que esta desyodación puede dar lugar a la "formación" de una molécula de T_3 biológicamente activa, o bien a una molécula de T_3 inerte, desde el punto de vista metabólico, conocida con el nombre de triyodotironina reversa (rT_3). Este mecanismo

peculiar de biotransformación periférica es órgano-específico y selectivo, según ocurra en el carbón 5' o 5 de los anillos tirosilo o fenilo respectivamente (Chopra y col, 1978; Engler y Burger, 1984). Por motivos de interés de esta tesis, la desyodación se tratará en detalle más adelante.

Metabolismo de HT en Peces. De las vías metabólicas aquí mencionadas, en los peces se ha estudiado principalmente la conjugación de HT con ácido glucurónico y con sulfato. Estudios utilizando ^{125}I -HT han mostrado que, al igual que en el resto de los vertebrados, las yodotironinas en los peces se excretan a la bilis ya sea como TH nativas o como glucurónidos (Sinclair y Eales, 1972; Finnson y Eales, 1996). Recientemente se mostró que la T_3 y la T_4 son capaces de sulfatarse pero, en contraste con los mamíferos, estos derivados sulfatados son secretados en grandes cantidades por la bilis. Además se observó que la 3,3'- T_2 se excreta tanto en conjugados sulfatados como glucuronados (Finnson y Eales, 1996).

2.3 Efectos Biológicos y Mecanismos de Acción

Las HT tienen múltiples efectos fisiológicos que abarcan desde el nivel organismico hasta el celular y molecular. Actualmente se reconoce que los numerosos y variados efectos biológicos de las HT se producen primordialmente por estimulación de la síntesis proteínica *de novo*. Tradicionalmente se ha señalado que, por su tamaño y características fisicoquímicas, las HT difunden a la células blanco por difusión pasiva y se transportan directamente al núcleo celular, en donde estimulan la síntesis de proteínas. Sin embargo, en los últimos años se ha demostrado que las HT interaccionan con sitios específicos de unión o receptosomas en la membrana plasmática de las células blanco. Así, ahora se reconoce que el transporte intracelular de las tironinas es un proceso activo (dependiente de ATP), estereoespecífico y saturable, en el cual intervienen proteínas membranales con una afinidad moderada pero con una capacidad de unión relativamente alta con respecto a los receptores nucleares de T_3 . Además, se ha señalado que estos sitios de unión en la membrana

plasmática están asociados a otros procesos de transporte como iones (Na^+ , Ca^{++}) y sustratos metabólicos (glucosa) (Davis y col, 1982; Segal y col, 1990).

A la fecha no se ha descrito la presencia de una molécula citoplasmática que transfiera a las HT hacia el núcleo de la célula. Sin embargo, si se han descrito proteínas de baja afinidad que tienen una elevada capacidad de unión, lo cual les permite servir como reservorio celular para las HT. Estas proteínas citoplasmáticas parecen jugar un papel importante no solo regulando la transferencia de las hormonas al núcleo, sino también en su disponibilidad para ser desyodadas de T_4 a T_3 (Hashizume y col, 1989; Kato y col, 1989).

Se sabe que en el núcleo de prácticamente todas las células del organismo existen proteínas específicas de tipo no histona que enlazan selectivamente a las HT. Estos receptores de tironinas tienen un peso molecular de 48 a 78 KDa y pueden unir T_3 y T_4 con una Kd de 0.2 a 1.0 y 2 a 10 nM, respectivamente. Estos receptores nucleares pertenecen a una superfamilia de proteínas estrechamente relacionadas al oncogene de la eritroblastosis aviaria (*v-erb-A*). La proteína producida por este proto-oncogen forma parte de la superfamilia de receptores para las hormonas esteroides, la vitamina D, el ácido retinoico y las HT. Estas proteínas funcionan como factores de transcripción que se unen a sitios específicos de reconocimiento dentro del DNA genómico. Así, la unión de las HT a su "receptor" nuclear es una señal para activar a la DNA polimerasa e iniciar la transcripción de secuencias específicas del "templado" del DNA, a través de la síntesis y liberación del RNA mensajero específico. La traducción de éste en los ribosomas, aumenta la síntesis de diversas proteínas estructurales y funcionales que son responsables de los efectos finales observados. En el humano se han descrito por lo menos cuatro isoformas del receptor: las $\alpha 1$ y $\alpha 2$ y las $\beta 1$ y $\beta 2$, cuyos genes están localizadas en cromosomas diferentes. Estos receptores tienen tres dominios: uno en el amino terminal que aumenta la actividad del receptor; otro central altamente conservado y rico en cisteínas que se une al DNA, y el último que es el del

carboxilo terminal que se une a la hormona (Baxter y Funder, 1979; De Groot, 1979; Tata, 1980; Oppenheimer y col, 1987; Evans, 1993).

En los organismos adultos, la principal acción de las HT consiste en su efecto calorigénico el cual se debe a un aumento en la tasa basal del metabolismo. Existen varias hipótesis sobre este efecto y su mecanismo de acción: una postula que las HT aceleran la reacción secuencial de la fosforilación oxidativa mitocondrial, permitiendo así la generación de niveles elevados de ATP. Otra hipótesis sugiere que las HT estimulan la ATPasa de la membrana celular, produciendo liberación de calor y disipando los enlaces de fosfato de alta energía. También es probable que el efecto calorigénico de las HT sea otra expresión final de la mencionada estimulación de la síntesis proteínica (Sterling y Lazarus, 1977; Weinberger y col, 1986; Oppenheimer, 1987).

Es a través de estos mecanismos de acción como las HT intervienen en prácticamente todas las funciones del organismo; vgr., la regulación del metabolismo energético, la reproducción y lactancia, la hematopoyesis, la actividad del sistema nervioso central, el metabolismo hidromineral y de vitaminas, la función hipofisaria, etc. Es decir, se sabe que para mantener normales todas las funciones orgánicas se requieren concentraciones intracelulares suficientes y adecuadas de HT (Tata, 1980).

2.3.1 Efectos Biológicos de las HT en los Peces.

Las HT en Salmónidos: Esmoltificación, Migración y Reproducción. Los salmones son especies anadromas que efectúan dos migraciones durante su ciclo de vida. La primera ocurre durante la primavera, alrededor de los 18 meses de edad, cuando el pez nada río abajo hacia el mar para habitar ahí durante su vida adulta. El salmón sufre cambios morfológicos, fisiológicos y conductuales que lo van a preparar para la vida marina; el conjunto de estos cambios se conocen con el nombre genérico de "esmoltificación". El pez puede sobrevivir en el medio marino únicamente cuando ha culminado su esmoltificación. La segunda migración tiene lugar después de los 18-24

meses de vida en el mar cuando los salmones adultos se dirigen y migran al agua dulce para reproducirse. El pez, además de culminar su maduración sexual al entrar al agua dulce, también sufre varios cambios morfológicos y fisiológicos que le van a permitir la sobrevivencia en este medio (Hoar, 1979; Sower y Schreck, 1982).

Como se resume en el CUADRO 2, existe alguna información experimental que sugiere la participación de las HT en ambas migraciones, estimulando el proceso de esmoltificación en la primera y participando en la maduración sexual durante la segunda. Se piensa que las HT son la "señal" endógena que inicia ambas migraciones (Grau y col, 1981).

Durante la esmoltificación se ha observado que las concentraciones de T_4 circulante aumentan en forma sostenida y progresiva en el curso de cinco semanas. La magnitud de este incremento es muy variable según el estudio de que se trate, y es probable que esta dispersión en los valores informados obedezca al empleo de radioinmunoanálisis homólogos o de estuches comerciales en los diferentes estudios (ver CUADRO 2). Este incremento de T_4 que antecede y acompaña al proceso de esmoltificación se ha interpretado como indicativo de que las HT participan en el crecimiento y desarrollo del pez (Dickhoff y col, 1978; Sower y col, 1984). Se ha propuesto que dicho incremento prepara y facilita la adaptación del organismo al cambio hidroosmótico, ya que en forma simultánea ocurre un aumento en la actividad de la bomba de Na^+-K^+ -dependiente de ATPasa a nivel de las branquias (Folmar y Dickhoff, 1979). El hecho de que la elevación sostenida de T_4 este asociada al ciclo lunar ha llevado a proponer que dicho ciclo representa el principal evento o señal medioambiental que sincroniza el desarrollo y sobrevivencia del individuo. Se sabe que la ausencia de este incremento de T_4 se asocia a hipodesarrollo y/o a la muerte del organismo (Dickhoff y col, 1978; Grau y col, 1981).

Durante la migración asociada a la reproducción, en ambos sexos ocurre un aumento transitorio y significativo de T_3 y de T_4 (Sower & Schreck, 1982; Biddiscombe

& Idler, 1983). Posteriormente, cuando el animal entra al agua dulce, ocurre otro incremento que alcanza niveles muy elevados, y que en las hembras decrece paulatinamente conforme progresa la maduración de gametos y hasta el desove. Los machos exhiben un incremento en los niveles de la hormona antes de la espermiación. Estos hechos se han interpretado como parte de los mecanismos metabólicos y osmorregulatorios que permiten la adaptación del animal al agua dulce, y que influyen en los procesos de maduración gonadal del salmón (Sower & Schreck, 1982). El incremento de T₄ que precede a la espermiación en los machos parece participar en la misma (Biddiscombe & Idler, 1983). No se puede descartar la posibilidad de que el decremento de T₃ y T₄ en la madurez sexual avanzada pueda ser secundaria a una disminución de la estimulación de TSH (Biddiscombe & Idler, 1983).

CUADRO 2. TIRONINAS CIRCULANTES EN SALMONIDOS MIGRATORIOS

ESPECIE	ESMOLTIFICACION	MIGRACION
Oncorhynchus kisutch	<p>↑ sostenido y progresivo de T₄, sincronizado por la luna nueva:</p> <p>18 a 117.4 nmol/l</p> <p>10.3 a 77.4 nmol/l</p> <p>6.5 a 43.9 nmol/l</p>	<p>↑ premigratorio de T₄</p> <p>↑ de T₄ al entrar al agua dulce: 2.9 a 6.5 nmol/l</p>
Oncorhynchus nerka		<p>↑ ambas hormonas al entrar al agua dulce:</p> <p>T₃, 1.4 a 10.8 nmol/l</p> <p>T₄, 7.7 a 25.8 nmol/l</p>

Datos originales tomados de: Dickhoff et al, 1978; Grau et al, 1981; Sower & Schreck, 1982; Biddiscombe & Idler, 1984 y Sower et al, 1984.

Se ha documentado también la participación de otras hormonas en las migraciones de los salmones, principalmente en la reproductiva. Se sabe que la prolactina (PRL) alcanza niveles muy elevados algunas semanas antes de iniciarse la

migración, y se le ha atribuido un papel en la regulación hidrosmótica del animal (Lam, 1972). También se sabe que el estradiol presenta las mismas oscilaciones que la T₄ durante esta migración y se piensa que la hormona afecta la percepción sensorial de manera que el pez se sensibiliza a estímulos externos que influyen sobre los procesos de migración y/o esmoltificación. El estradiol también está estrechamente relacionado en la maduración de los gametos (Sower et al, 1984).

Hormonas Tiroideas en la trucha arcoíris:

Ritmos estacionales. En esta especie no migratoria y utilizando procedimientos de cromatografía de gas (Osborn et al, 1978), se ha encontrado que las concentraciones de T₃ y T₄ aumentan durante el otoño, alcanzando su valor más elevado en noviembre, justo en el periodo de diferenciación gonadal rápido. Sin embargo este aumento no se encontró relacionado funcionalmente a la maduración gonadal. Al mismo tiempo, se observó un decremento en la relación T_4/T_3 . Estas observaciones se han interpretado como sugestivas de una disminución en la utilización periférica o degradación hepática de T₄. En este mismo estudio los niveles hormonales se elevaron para alcanzar un segundo valor máximo en abril (primavera), pero la relación T_4/T_3 no presentó cambios. Esto sugiere un aumento en la tasa de secreción de la tiroides en esta época. La caída brusca de los niveles de T₃ y T₄ que se encuentra al final de la primavera y principios del verano, indican otro cambio en el equilibrio entre la liberación de hormona por la glándula y su utilización periférica y degradación. Se sugiere que en las temperaturas altas del verano se incrementa el consumo de HT y que este se compensa con un aumento en la actividad de la glándula (Osborn et al, 1978).

Ritmos circadianos. Se ha encontrado que durante el ayuno no se presenta ningún ritmo diario en las concentraciones plasmáticas de T₃ y T₄ (Brown et al, 1978). En contraste, durante la alimentación *ad libitum* se ha encontrado un ritmo diario en donde los niveles más altos ocurren entre las 09:00 y 13:00 hrs, y los más bajos entre las 05:00 y 19:00 hrs. Parece ser que esta elevación de T₃ y T₄ puede representar un ritmo endógeno circádico que únicamente se manifiesta en peces alimentados sin ser

influenciado por otros factores medioambientales (Eales et al, 1981). También se encontró que los niveles de T_3 y T_4 son más elevados durante el periodo de luz que en el de oscuridad (Eales et al, 1981).

Ayuno y HT. Se ha encontrado que el ayuno influye sobre la función tiroidea en teleosteos (Eales, 1979). Inicialmente se observó que tanto el ayuno corto (3 días), como el largo (12 a 37 días) deprimen los niveles plasmáticos de T_3 (Eales et al, 1981), y que también reducen la velocidad de depuración o recambio (MRC) y la tasa de degradación (DR) de T_3 y T_4 ; así como la tasa de conversión extratiroidea de T_4 a T_3 radioactiva, lo cual se asocia a la supresión de la función de la tiroides (Eales, 1979; Higgs & Eales, 1977 y 1979).

Después de proporcionar alimento aumenta la concentración de T_4 plasmática. Se ha sugerido que este aumento tal vez sea secundario a un incremento en la liberación de T_4 por la glándula tiroides, la cual sería estimulada por propiedades físicas o químicas del alimento ingerido, o por un cambio en el comportamiento y actividad asociado a la alimentación. En otras palabras, la depresión de T_4 que ocurre durante el ayuno crónico puede ser afectada temporalmente por una sola comida, la cual por algún mecanismo aún no bien precisado promueve la liberación de T_4 a la sangre. Esto se acompaña de un incremento en la conversión de T_4 a T_3 , lo cual puede depender de la cantidad de alimento presentado (Flood & Eales, 1983).

Temperatura y HT. A juzgar por los niveles circulantes de T_4 , se ha encontrado que el sistema tiroideo no exhibe ninguna respuesta a los cambios de temperatura. Sin embargo, sí se ha encontrado que la tasa de degradación de la T_4 incrementa a mayores temperaturas. Este fenómeno se explica de la siguiente manera. al aumentar la temperatura, se produce ya sea un decremento en la afinidad de las proteínas plasmáticas a T_4 y/o una alteración en la unión de los sitios receptores para T_4 en los órganos y tejidos efectores. Esto permitiría que la hormona penetrara a los tejidos con más facilidad y podría intercambiarse libremente con la poza (pool) de T_4 plasmática

Se piensa también que el sistema tiroideo participa en la aclimatación / tolerancia de la temperatura en algunos teleosteos, aunque dicha participación necesita ser bien estudiada (Eales et al, 1982).

Triyodotironina Reversa. En los peces, específicamente en la trucha arcoiris, existe controversia con respecto a la presencia de rT_3 y de su correspondiente vía desyodativa (Eales et al, 1983). Esto se debe a problemas metodológicos, ya que para la cuantificación se han utilizado estuches comerciales diseñados para humanos. Este detalle metodológico es clave, pues como se ha mencionado, se debe utilizar suero homólogo en las curvas estándar, ya que el uso de suero heterólogo introduce una diferencia significativa en la cuantificación de HT (Orozco, 1989; Orozco y col, 1992). Sin embargo, casi una década después de los primeros reportes, otros grupos de investigación reportaron la presencia de rT_3 en dos especies de teleosteos (Byamungu y col, 1990; Fenton y col, 1991; Fenton, 1994).

2.4 Control de la Función Tiroidea

El sistema que regula la síntesis y la secreción de las HT por la glándula tiroidea es complejo y comprende dos mecanismos de naturaleza diferente. Por un lado, el aporte dietético de yodo que a nivel de las células tiroideas interviene autorregulando la síntesis y secreción de yodotironinas con actividad hormonal. Por otra parte, existe un elaborado sistema de "señales" neuroendócrinas que en forma secuencial regulan y controlan la función de la glándula tiroidea. Esta cascada de señales se origina en el sistema nervioso central (SNC). En el hipotálamo existe una área tirotrópica cuyas neuronas sintetizan y secretan al sistema porta hipotálamo-hipofisario el tripéptido denominado TRH u hormona liberadora de tirotrópina. Esta neurohormona, como su nombre lo indica, estimula a nivel hipofisario la síntesis y liberación de la tirotrópina. La tirotrópina, hormona estimulante de la tiroidea o TSH, es una glucoproteína sintetizada y secretada en la adenohipófisis por las células especializadas llamadas tirotrópos, las cuales constituyen aproximadamente el 5% de la glándula hipófisis. Esta hormona hipofisaria estimula a las células foliculares de la glándula tiroidea para que

sinteticen y secreten HT a la circulación sistémica. Finalmente, y ya a nivel de los órganos efectoras, la desyodación órgano-específica de las tironinas determina la concentración intracelular de la hormona activa e inactiva (Gómez y col, 1990; Larsen e Ingbar, 1992; Valverde-R y col, 1993).

Esta cascada de señales neuroendócrinas constituye, desde el punto de vista funcional, el llamado "eje hipotálamo-hipófisis-tiroides" y en su control intervienen diferentes factores y señales neurohumorales que actúan a través de mecanismos de retroalimentación positiva y negativa. El principal mecanismo de retroalimentación está dado por los niveles circulantes y la concentración intracelular de T_3 y T_4 . Cuando la concentración es elevada, se suprime o disminuye la secreción de TSH (retroalimentación negativa). Esta inhibición de la producción y secreción de TSH hipofisiaria está mediada principalmente por la estimulación de la síntesis, a nivel de los tirotrópos, de la enzima que inactiva al TRH. Al contrario de lo anterior, cuando los niveles circulantes y la concentración intracelular de T_3 y T_4 son bajos, se estimula la secreción de TSH (retroalimentación positiva). Es evidente que en este sistema de regulación y control neurohumoral, los tirotrópos hipofisarios están sujetos a dos estímulos antagónicos: uno positivo, que está dado por la TRH y que induce la síntesis y liberación de la TSH, y otro negativo o inhibitorio, que está dado por la concentración de HT que bloquean la liberación de TSH. En esta forma, el sistema controla rigurosamente la cantidad de TSH liberada por la hipófisis. Este control está mediado primordialmente por la variable regulada por el sistema; es decir por las concentraciones de HT, ya que la cantidad de TSH secretada se ajusta a la señal o retroalimentación que le dan al propio tirotrópo, las concentraciones y/u ocupación de sus receptores nucleares por las HT (Gómez y col, 1990; McNabb, 1992; Valverde-R, 1993).

3. Desyodación de Tironinas

Actualmente se reconoce que en los diferentes órganos en los que actúan las HT, opera un mecanismo específico que regula la concentración intracelular de hormona activa o inactiva y por lo tanto, la magnitud de su efecto biológico. La glándula tiroides secreta al torrente sanguíneo el 100% de la T_4 circulante, y del 20 a 25 % de la T_3 ; la formación del resto de la hormona circulante activa ocurre a nivel extratiroideo por un proceso enzimático conocido como desyodación periférica. Así, a través de esta biotransformación órgano-específica y a partir de la desyodación de la prohormona T_4 se genera cerca del 80% de la hormona activa y prácticamente el total del isómero inactivo, la T_3 reversa (rT_3).

La desyodación periférica fue inicialmente descrita por Braverman y col (1970), quienes, estudiando el metabolismo de las yodotironinas en pacientes atiroóticos, mostraron la desyodación y conversión periférica de la T_4 hacia T_3 . A la fecha se reconocen dos rutas o vías desyodativas que están catalizadas por lo menos por tres isoenzimas llamadas genéricamente desyodasas. Estas son selenoproteínas que catalizan la remoción de un átomo de yodo de la molécula de tironina. La desyodación del anillo externo (ORD) o vía 5'D, que convierte a la T_4 en T_3 y a la rT_3 en $3,3'$ - T_2 se denomina vía de activación. Esta vía está catalizada por las isoenzimas 5'D-I (DI) y 5'D-II (DII). La desyodación del anillo interno de la tironina (IRD) que a partir de T_4 genera rT_3 y a partir de T_3 genera $3,3'$ - T_2 , se denomina vía de inactivación (FIGURA 2) (Burger y col, 1986, Engler y Burger, 1984, Kaplan, 1986, Leonard y Visser, 1986). La isoenzima que cataliza esta ruta es la 5D-III (DIII). A la fecha, las desyodasas no han sido aisladas ni purificadas, por esta razón, su caracterización se ha basado en aspectos operacionales y cinéticos (Leonard y Visser, 1986, y Köhrle y col, 1991).

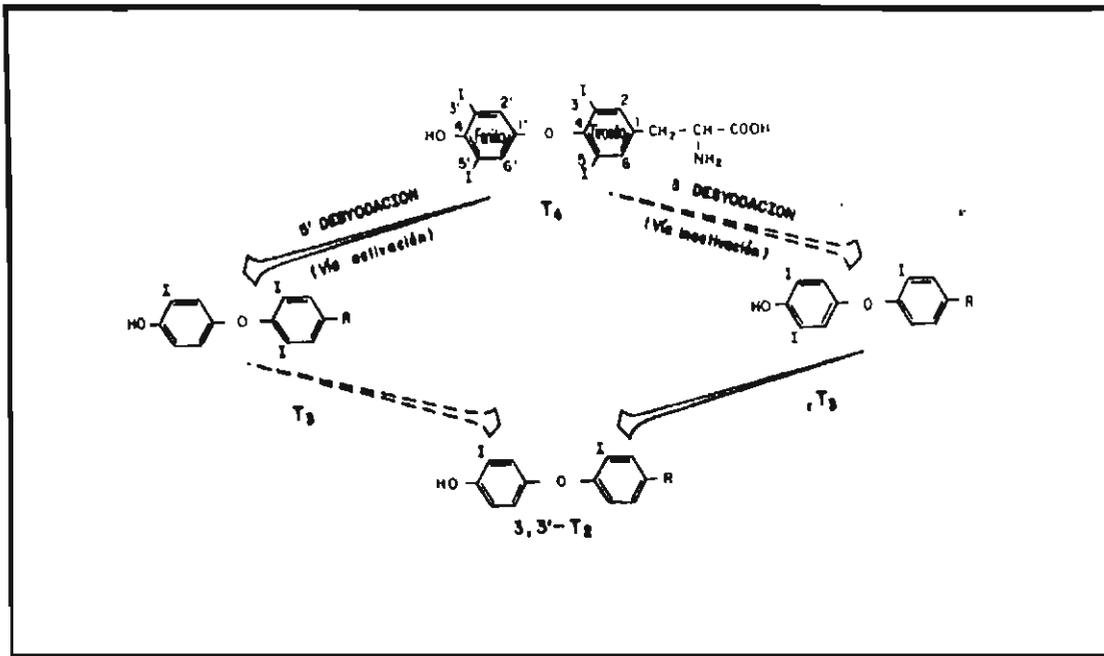


FIGURA 3. Productos de la desyodación secuencial obtenidos a partir de tiroxina. Las flechas con línea continua representan la vía de activación (ORD) y las flechas con línea discontinua muestran la vía de desactivación (IRD)(modificado de Leonard, 1991).

3.1 Desyodasa Tipo I (DI)

Esta isoenzima es la más estudiada y mejor caracterizada. Se encuentra ampliamente distribuida en todo el organismo con la posible excepción de las gónadas y el bazo (Leonard y Visser, 1986, y Köhrle y col, 1991). La mayor actividad catalítica se ha detectado en el hígado, el riñón y la glándula tiroidea, y los dos primeros han sido los órganos más utilizados para su estudio. La distribución subcelular de la DI es aún controvertida y varía de órgano a órgano. En el hígado, la mayor actividad se ha detectado en fracciones crudas de microsomas (membranas del retículo endoplásmico) obtenidas por centrifugación diferencial. En el riñón, la DI co-purifica con enzimas marcadoras de membranas plasmáticas (ATPasa dependiente de Na⁺, K⁺). En el caso de la corteza cerebral se ha asociado a membranas sinaptosomales. En otros tejidos como la hipófisis, la tiroides y el músculo esquelético, la información es muy limitada (Chopra, y col, 1978, Leonard y Visser, 1986, y Köhrle y col, 1991).

3.1.1 Purificación de la Enzima.

Los intentos para aislar y purificar a la DI utilizando técnicas bioquímicas convencionales han sido infructuosos. Este fracaso se puede explicar en parte por lo siguiente: a) la baja concentración de la enzima (5-20 pmol/mg de proteínas totales de hígado y riñón); b) la hidrofobicidad de esta proteína intrínseca de la membrana; c) la inestabilidad de la actividad catalítica en detergentes; d) su dependencia de fosfolípidos; e) el desconocimiento de su co-substrato fisiológico y f) su posible estructura heterodimérica (Fekkes y col, 1983, Köhrle y col, 1990; Leonard, 1991). Sin embargo, la combinación de estos métodos con el marcaje de afinidad con derivados N-bromoacetilados de tironinas (^{125}I -BrAc-T₃ ó ^{125}I -BrAc-T₄) ha permitido establecer que la isoenzima hepática tiene dos subunidades con un peso molecular aproximado de 55 y de 25 a 28 kilodaltones (kDa). Ambas subunidades unen al substrato y tienen actividad catalítica, esto sugiere que la enzima está constituida por al menos dos subunidades homoméricas o heteroméricas. Con estas preparaciones semipurificadas se alcanza un enriquecimiento de 2400 veces y se ha podido estimar un coeficiente de sedimentación de 3.6 S y un radio de Stokes de 32 a 37 Å (Mol y col, 1988; Köhrle, 1990, Leonard, 1991; Safran y Leonard, 1991).

3.1.2 Clonación y Expresión de la Enzima.

Recientemente y de manera independiente dos grupos de investigadores (Berry y col, 1991a y St Germain y col, 1990), utilizando ácido ribonucleico mensajero (RNA_m) de hígado de ratas, lograron aislar e identificar el ácido desoxirribonucleico complementario (cDNA) que codifica para la DI. Las propiedades cinéticas así como la especificidad por substrato y la sensibilidad a propiltiouracilo (PTU) de la proteína codificada por este cDNA (expresado en células en cultivo o en ovocitos de *Xenopus*), confirmaron que es idéntica a la DI. Además, la secuencia del cDNA reveló la

presencia de un codón TGA (UGA) que codifica para el aminoácido selenocisteína (Se-Cys), un análogo de la cisteína en el cual el azufre es reemplazado por el selenio (Se). Los estudios de mutagénesis dirigida cambiando el codón UGA por UAA (codón de terminación) o por UUA (codón para leucina) dieron como resultado una proteína inactiva. Igualmente, si UGA es reemplazado por UGU (codón para cisteína), se produce una desyodasa funcional aunque con propiedades alteradas comparadas con la DI. Estos resultados confirmaron que en el caso de la DI, el codón UGA no es una señal de terminación y que esta enzima es un nuevo miembro de la familia de selenoproteínas. El aminoácido Se-Cys confiere propiedades especiales a esta familia de selenoenzimas ya que su actividad catalítica es inhibida de manera competitiva por el oro. En el caso de la DI esta inhibición tiene una K_i de 6.6 nM para tioglucosa aúrica (Berry y col, 1991; Berry y Larsen, 1992). En la FIGURA 4 se muestra el mecanismo propuesto para explicar esta inhibición.

Por otra parte, estos hallazgos llevaron a revalorar el papel del Se^+ en la fisiología tiroidea y el metabolismo de las HT. Así, en ratas mantenidas con dietas deficientes de selenio (4 - 6 semanas), se elevan las concentraciones circulantes de T_4 y disminuyen las de T_3 . Estas alteraciones se asocian a una marcada disminución de la actividad desyodativa hepática y renal, pero no en la glándula tiroides, la cual aparentemente es resistente a la depleción de selenio (Behne y col 1990 ;Köhrle, 1994). Los mecanismos celulares para la conservación del Se por la glándula tiroides no se conocen. Sin embargo, se ha mostrado que la deficiencia de selenio también provoca la depleción de yodo y hormonas tiroideas en la glándula, presumiblemente debido al incremento en la síntesis y secreción de la TgB estimulada por la hipersecreción de TSH.

3.1.3 Características Cinéticas y Operacionales.

La especificidad para el sustrato de la DI ha sido determinada por el análisis de la relación estructura-actividad de una serie de yodotironinas y sus análogos. El análisis de la cinética de reacción, así como la determinación de las constantes de Michaelis-Menten, han permitido determinar la afinidad para el sustrato, expresada como Km. Los valores mostraron los siguientes ordenes de magnitud: rT_3 (10^{-8} - 10^{-6} M) > T_2 (10^{-7} - 10^{-6} M) > T_3 (10^{-6} M) (Chopra, 1980, Fekkes y col, 1979, y Kaplan y Utiger, 1978).

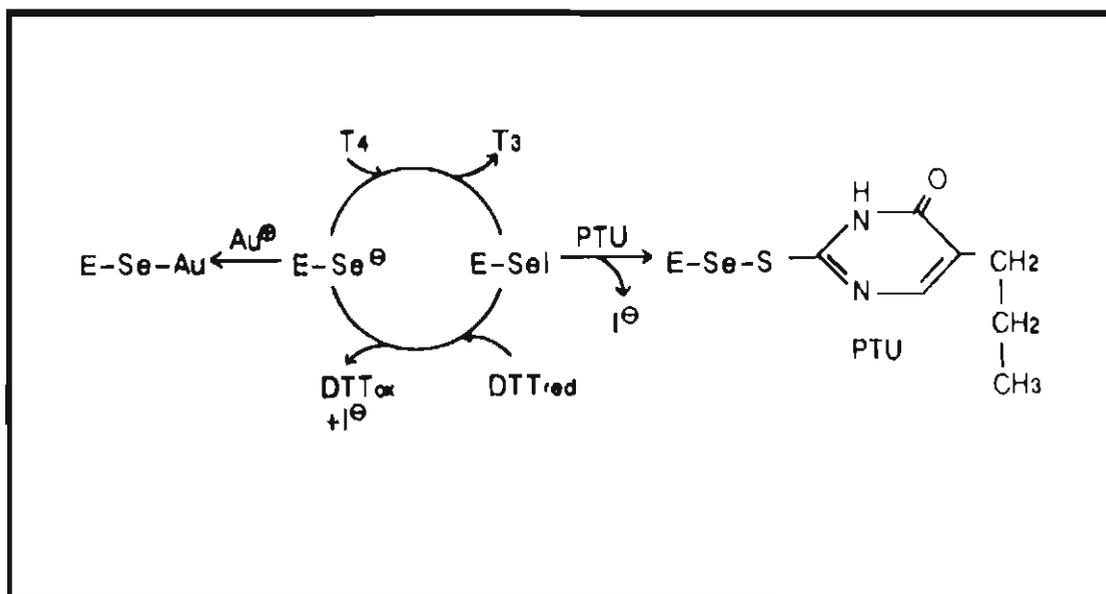


FIGURA 4. Mecanismo de acoplamiento de ATG a la 5'D. La enzima reacciona con la T_4 , remueve el yodo de la posición 5', y libera rT_3 . La forma selenoil-yodo de la enzima puede entonces reaccionar con los cofactores tioles, liberando el yodo y regenerándose. La inhibición competitiva del oro consiste en su reacción con el anión selenolato que es el aceptor del yodo en el sitio activo de la enzima libre para formar el complejo inactivo selenoil-oro (Modificado de Berry y col, 1991b).

Estudios *in vitro* han permitido confirmar que el sustrato preferencial para la DI es la rT_3 y que requiere altas concentraciones de sustrato (0.5 - $5 \mu M$) y bajas de cofactor 5 - 8 mM (Leonard, 1991). La desyodación de las tironinas es un proceso substitutivo en el cual el átomo de yodo es reemplazado con uno de hidrógeno y esta

reacción puede ser considerada un proceso de liberación de yodo. Numerosos estudios han intentado, sin éxito, identificar el sistema de cofactor que participa en la transferencia del hidrógeno. En algunos reportes se ha propuesto al glutatión reducido (GSH) como el posible cofactor fisiológico ya que es el tiol intracelular no proteínico más abundante. Sin embargo, en estudios *in vitro*, y comparado con el ditioneitol (DTT), el GSH tiene un efecto pobre en la activación de la enzima (Kaplan, 1984, Leonard y Visser, 1986; Visser y col 1976; Visser y col, 1978). Sawada y col (1986) mostraron que los sistemas de óxido-reductasas dependientes de NADPH como la tioredoxina y la glutarredoxina, pueden sustituir parcialmente a los tioles reducidos en la reacción DI. Sin embargo, la relación entre el cofactor citosólico y estos hallazgos aún no se ha determinado. Se ha observado una gran activación con los ditioneoles de elevado potencial redox, tales como etanediol, 2,3-ditioneopropanol, ditioneitol y ditioneitreitol, mientras que con los monotioneoles: vgr., mercaptoetanol, la activación fue menos efectiva. Se desconoce la razón por la cual los ditioneoles son más potentes pero parece depender de su habilidad para formar puentes disulfuro intramoleculares (Goswami y Rosenberg, 1988; Sawada y col, 1986).

La DI es inhibida por el propiltiouracilo (PTU) y otras tiocarbamidas. El PTU se une de manera covalente a los grupos sulfhidrilo esenciales de la enzima, sin embargo este efecto puede ser revertido por la presencia de altas concentraciones de tioles (DTT). Es decir, la inhibición por PTU es acompetitiva con el substrato y competitiva con el cofactor.

Los estudios iniciales sobre el mecanismo catalítico de la DI, mostraron que la reacción procede de acuerdo al tipo cinético de "ping-pong". Estos mecanismos son típicos de reacciones de dos substratos en las cuales la enzima existe en dos formas interconvertibles y cada forma muestra diferente afinidad para cada uno de los

substratos. La confirmación de este mecanismo es la demostración de una forma oxidada y una reducida de la enzima. Así, y como se ilustra en el FIGURA 5, aprovechando la capacidad del PTU para interactuar específicamente con la enzima oxidada (grupos -SH) y sólo en presencia del sustrato, y la incapacidad de α -haloácido para inactivar a la DI oxidada, se ha confirmado que estos inhibidores interactúan con la enzima en diferentes etapas del ciclo catalítico (Chopra y col; 1978; Kaplan, 1984; Leonard y Visser, 1986; Köhrle y col, 1991).

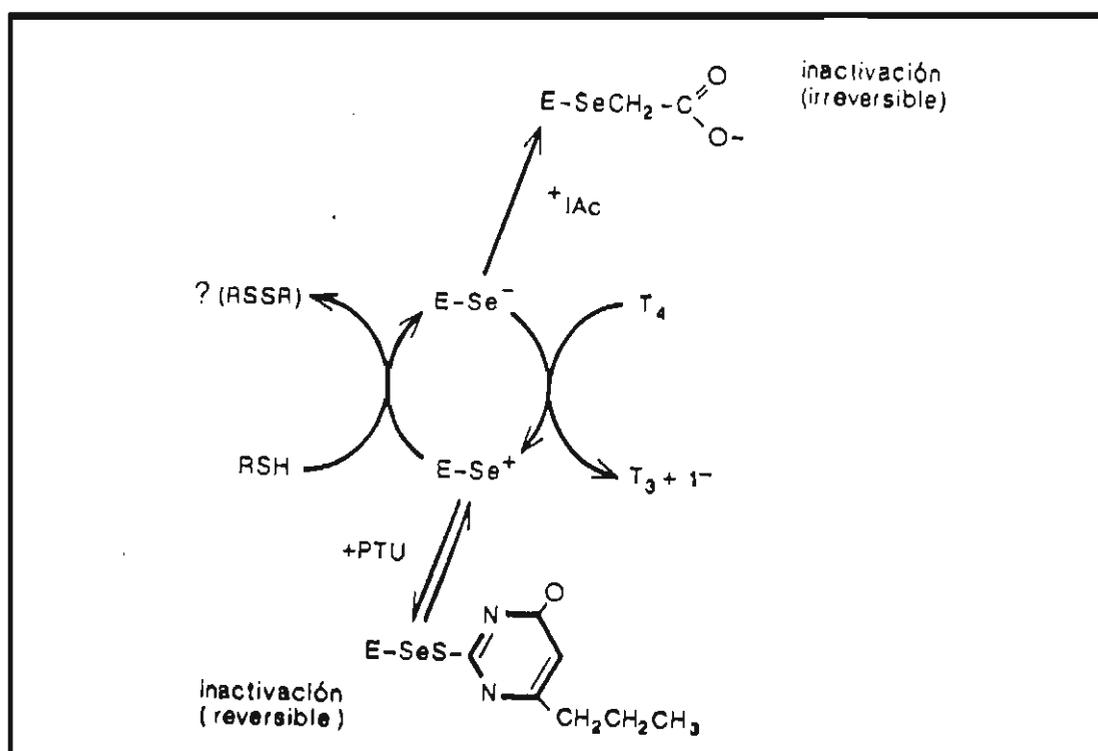


FIGURA 5. MECANISMO DE REACCION DE LA DI. Se muestra la primera mitad de la reacción de desyodación de la tioronina a través de la remoción de un átomo de yodo del anillo externo. Esto coincide con la reducción del carbono, que contiene al yodo en la posición 5', mediante la transferencia de dos electrones a un sulfhidrilo en o cerca del sitio activo de la enzima que es oxidado a sulfenil $-S^+$ liberando un protón. Presumiblemente con este grupo sulfenil se forma un intermediario muy lábil $ES-I$ con una nueva liberación de yodo. La reducción de estos grupos funcionales usualmente por los tioles, completa el ciclo catalítico y prepara a la DI para iniciar otra ronda de desyodación (Modificado de Köhrle y col, 1991).

De igual forma, observaciones realizadas con el sustrato, especialmente con rT_3 , mostraron que el curso de la reacción es bifásico. Se observó un primer pico de formación de producto durante tiempos muy cortos (menores a 30 segundos) siendo esta liberación independiente del agente reductor y muy aguda ya que después de este periodo la producción baja a niveles escasos. Por otra parte, en la segunda fase y en presencia de concentraciones crecientes del cofactor, la liberación de yodo se incrementa correspondiendo a la reacción que se lleva a cabo a tiempos más largos sin modificar la liberación inicial. En trabajos subsecuentes se determinó que durante la fase inicial rápida de la reacción la enzima no es inhibida por PTU, en tanto que en la fase de desyodación dependiente de tioles sí fue sensible a este agente. Este modelo catalítico es consistente con el mecanismo de reacción "ping-pong" observado en la actividad DI de hígado y riñón. Por esta razón, la gráfica doble recíproca de la velocidad de reacción (V_{max}) contra la concentración del sustrato utilizando diferentes concentraciones de PTU, muestra una serie de líneas paralelas (gráfica de Lineweaver-Burk) (FIGURA 6a y c). Resultados semejantes se obtienen al graficar la velocidad de reacción en mezclas que contienen varias concentraciones de sustrato y una concentración fija de cofactor en presencia de diferentes concentraciones de inhibidor (PTU) (FIGURA 6b). Tales resultados permiten concluir que los tiouracilos son inhibidores acompetitivos con el sustrato y competitivos con respecto al cofactor. De aquí que una disminución en la concentración del cofactor produce un efecto similar en la actividad de la enzima al que produce la adición de tiourenos (disminución de la V_{max} y la K_m).

La DI puede ser inhibida por metales pesados como Hg^+ , Ag^+ y cualquier otro compuesto que contenga mercurio así como agentes oxidante (H_2O_2 , diamina), debido a que actúan a nivel del sitio activo. Por esta razón la utilización de agentes quelantes

como el EDTA, que tiene la habilidad de formar complejos con metales pesados, pueden activar a la enzima.

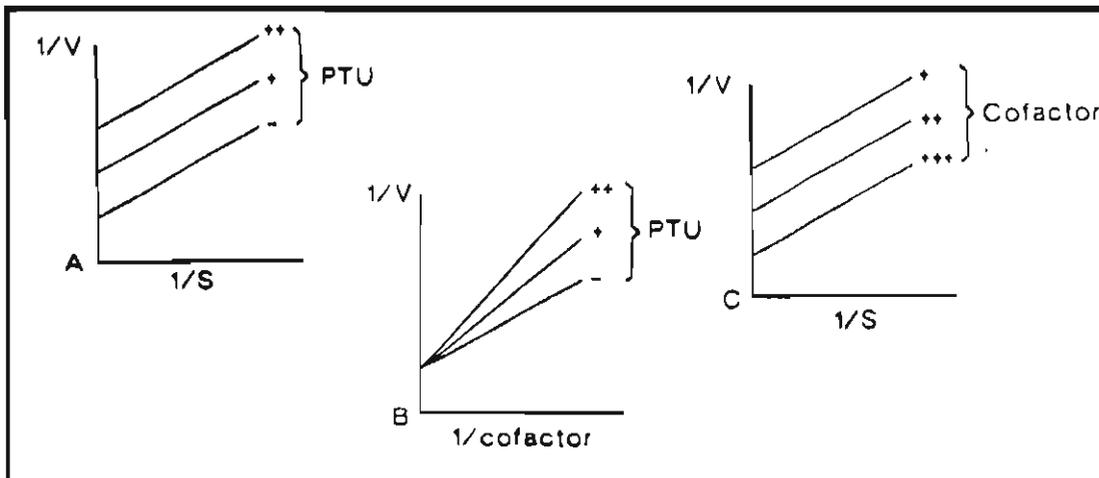


FIGURA 6. CINETICA DE REACCION DETERMINADA PARA LA DI. Gráficas de doble recíproca: A) estas líneas paralelas muestran una inhibición acompetitiva del PTU con respecto al sustrato. B) inhibición competitiva del PTU con respecto al cofactor y C) efecto concentración dependiente del cofactor en la actividad. (Modificado de Leonard, 1991).

Como se indica en el CUADRO 3, la DI cataliza tanto la vía ORD como la IRD. A pesar de que aún no se conocen los factores que regulan la selectividad para desyodar uno u otro anillo, se ha mostrado que a pH ligeramente ácido a neutro (6.5 - 7.5) se desyoda preferencialmente el anillo externo; mientras que el pH óptimo para la desyodación del anillo interno es más alcalino (8.0). Se ha sugerido que el pH óptimo para el sitio de desyodación es principalmente determinado por el pKa del grupo hidroxilo en la posición 4'. Estos hallazgos permiten sugerir que el pH intracelular puede determinar cual es el anillo que se va desyodar (Visser y col, 1978, Kaplan, 1984, Leonard y Visser, 1986 y Köhrle y col, 1991). En este contexto tiene importancia fisiológica establecer la llamada eficiencia catalítica de la enzima, i.e., la velocidad con la cual los diferentes sustratos son desyodados. En estudios *in vitro* se ha determinado que la T4 es relativamente un pobre sustrato tanto para la desyodación

5' como para la 5 D, en el caso de la 5'D la relación V_{max}/K_m es 500 veces menor que el de la rT_3 , y para la 5 D es 100 veces menor que para la T_4 sulfatada.

3.1.4 El gen.

El gen para la DI se ha identificado en el ratón (Maia y col, 1995) y en el humano (Toyoda y col, 1995). El gen *dio1* de ratón es de aproximadamente 15 Kb y contiene 4 exones. El análisis de las regiones exónicas mostró un codón ATG en el exón 1. El exón 2 contiene un triplete TGA que codifica para la Se-Cys. El exón 4 contiene el codón terminal TGA, el elemento SECIS que reconoce al primer codón TGA como Se-Cys y no como codón terminal y la cola de poliadenilación. Estudios acerca de la regulación de la transcripción del gen *dio1* humano han mostrado la presencia de dos elementos de respuesta a hormonas tiroideas (TREs) en la región promotora del gen, los cuales, en contraste con otros TREs, no requieren de la familia de receptores a ácido retinoico X (RXRs) para su función (Maia y col, 1995; Toyoda y col, 1995).

3.1.5 Probable función.

Se ha descrito que la DI es una vía desyodativa de exportación, es decir, genera la T_3 que circula en el torrente sanguíneo. De todos los órganos que contienen esta enzima, se sabe que el hígado es el responsable de alrededor del 40% de toda la desyodación en el organismo y que el 70% de la producción diaria de T_3 posiblemente se origina en este órgano.

3.2 Desyodasa Tipo II (DII)

Esta isoenzima identificada a principios de los años 80, se considera la verdadera monodesyodasa 5' ya que exclusivamente cataliza la vía ORD (FIGURA 3). Aparentemente la T_4 es el sustrato preferencial de esta enzima por un factor 5 a 6 veces mayor sobre la rT_3 . Esto se determinó usando la relación V_{max}/K_m como

indicador de la especificidad por el sustrato. La DII no es inhibida por PTU y tiene un gran número de propiedades que la distinguen de la isoenzima tipo I, incluyendo diferencias tanto biológicas como bioquímicas. El primer indicio de la existencia de la DII fue el análisis del origen de la T_3 intracelular, especialmente en el cerebro y la hipófisis. Utilizando la técnica de doble marca *in vivo* la $[^{125}I]-T_4$ como sustrato para la desyodación 5' y la $[^{131}I]-T_3$ para determinar la contribución de una y otra al pool circulante e intracelular respectivamente, Silva y col, (1982), mostraron que aproximadamente 80% de la T_3 unida al núcleo celular provenía de la desyodación intraneuronal de la T_4 . Esta generación intracelular de T_3 no fue bloqueada por concentraciones elevadas de PTU que sí bloquean completamente a la DI en el hígado y el riñón. La DII tiene una distribución más limitada en los tejidos de mamíferos que la DI y la mayor actividad ha sido reportada en el SNC, hipófisis, tejido graso café (BAT) y placenta. La enzima también se ha encontrado en la glándula pineal y la de Harder en la rata y otros roedores, así como en varias líneas celulares de tumores hipofisarios, células de neuroblastoma y queratinocitos. Debido a que estos tejidos recambian tironinas en forma lenta, se ha sugerido que la DII cataliza la producción local de T_3 para "autoconsumo" (Kaplan y Yaskloski, 1980, 1982; Kaplan 1980, 1984, 1986; Kaplan y col, 1983; Visser y col, 1983; St Germain, 1986, 1994a).

La distribución de la DII no es uniforme en los diferentes tipos de células hipofisarias. En ratas hipotiroideas la mayor actividad se localiza en los somatotropos y lactotropos seguido de los corticotropos y gonadotropos y menor cantidad en los tirotropos (Koenig y col, 1984). En el caso de la corteza cerebral, datos obtenidos de cultivos primarios sugieren que las neuronas tienen la mayor actividad de la DII, aunque los astrocitos pueden ser estimulados para expresar la enzima a través de la elevación de los niveles de AMPc intracelular (Farwell y Leonard, 1989, Leonard y col, 1991, y St Germain, 1986). En el cerebro de ratas eutiroideas, los niveles de la DII son

menores en la eminencia media que a lo largo del sistema límbico. En tanto que en ratas hipotiroideas, el hipotálamo, el núcleo arcuato y la eminencia media son los que tienen mayor actividad que la hipófisis anterior. En la placenta esta enzima fue menos activa en la membrana coriónica comparada con la membrana placentar pero está presente en los trofoblastos y en las membranas de la decidua en el ser humano (Kaplan, 1984, Köhrle y col, 1991).

Con respecto a su distribución subcelular existen pocos estudios y en aquellos órganos donde ésta se ha analizado, muestran que tiene una distribución heterogénea. En el caso de la corteza cerebral la DII copurifica con la enzima marcadora de membrana plasmática; i.e., la ATPasa dependiente de Na^+, K^+ y también se encontró en fracciones enriquecidas de terminales nerviosas y membranas plasmáticas dendríticas. Los sinaptosomas parcialmente purificados del cerebelo han mostrado contener una producción local de T_3 , apoyando la localización neuronal de la DII (Dratman y Crutchfield, 1979). Sin embargo, en hipófisis anterior de bovino, la enzima copurifica con la glucosa 6-fosfatasa, una enzima marcadora de la membrana del retículo endoplásmico (Coutin y col, 1985). La baja actividad y la limitada cantidad de esta enzima disponible en los tejidos, así como su localización hacen más difícil su detección que la abundante desyodasa DI. (Kaplan y Yaskioski, 1980, 1982; Kaplan 1980, 1984, 1986; Kaplan y col, 1983; Visser y col, 1983; Leonard, 1991; St Germain, 1994a).

3.2.1 Purificación de la Enzima.

En la membrana plasmática de células gliales y utilizando el ligando de alta afinidad bromoacetil- T_4 ($^{125}\text{-I-BrAct}_4$), Safran y Leonard (1991) identificaron una proteína intrínseca de 29 KDa. La solubilización con taurodesoxicolato y la filtración en gel permitió determinar un peso molecular aproximado de la holoenzima de 199 KDa,

con un coeficiente de sedimentación de 5.22 S, un coeficiente de fricción de 1.8 y un radio de Stoke de 4.97 nm. Esta enzima muestra propiedades típicas de una proteína asimétrica integrada a la membrana, a diferencia del comportamiento globular que presenta la isoenzima tipo I. En conjunto, éstas y otras características; vgr., patrones de fragmentación con bromuro de cianógeno y el análisis del mapa peptídico, indican que tanto la DI como la DII son multiméricas, pero difieren en el tamaño de la holoenzima, así como en las subunidades que las conforman y en el peso de su subunidad catalítica. Los estudios sobre esta subunidad, utilizando cultivos primarios de células gliales en medio deficiente de selenio, mostraron que ni la actividad ni el contenido de la enzima fueron afectados por dicha deficiencia, revelando que la DII no presenta el residuo hiperactivo nucleofílico de la selenocisteína encontrado en el sitio activo de la DI (Köhrlé y col, 1991; Safran y Leonard, 1991).

3.2.2 Clonación y Expresión de la enzima.

Esta es la desyodasa más recientemente clonada a partir de músculo de las patas traseras de *Rana catesbiana* (Davey y col, 1995). El cDNA obtenido es de 1459 pb, con un marco abierto de lectura del nucleótido 11 al 802. Al igual que la DI, contiene un codón TGA (nucleótido 380-382) que codifica para Se-Cys. La proteína para la cual codifica, al igual que la de las otras desyodasas, posee un dominio hidrofóbico en el extremo amino terminal y las dos histidinas que han probado ser cruciales para la actividad DI (Berry, 1992). Otra área importante y de alta homología es el sitio activo (87% con la DIII de rana y 80 % con la DI de rata).

Recientemente en nuestro laboratorio se clonó la DII en el hígado del teleosteo *Fundulus heteroclitus*. Usando una biblioteca de DNA complementario derivado de hígado de este pez, se identificó un DNA complementario que codifica para la DII. El análisis de las secuencias demostró que existe una homología muy alta entre esta

clona de pez y las previamente descritas en otros vertebrados. Estas similitudes incluyen la presencia del codón TGA que codifica para selenocisteína, sugiriendo que la familia de las desyodasas se ha conservado a lo largo de la evolución de los vertebrados (Valverde y col, 1997).

3.2.3 Características Cinéticas y Operacionales.

Uno de los principales criterios para clasificar a las desyodasas es su especificidad por el sustrato. La DII tiene una alta afinidad para T_4 con una K_m aparente entre 0.5 - 3 nM en tanto que la K_m para para la rT_3 es mayor y va de 1 a 10 nM. Estos parámetros se determinaron en ensayos *in vitro* y en presencia de 20 mM de cofactor (DTT). Los valores de V_{max} para estos sustratos (T_4 y rT_3) son de 10 - 30 fmoles de producto formado por miligramo por minuto (fmol/mg/min). Mediante estudios de competencia se determinó una eficiencia catalítica (V_{max}/K_m) para T_4 de 5 a 6 veces sobre la rT_3 . Estas constantes cinéticas corresponden a las concentraciones de sustrato encontradas tanto en los fluidos biológicos como en el citosol (Leonard y Visser, 1986; Visser y col, 1982).

A diferencia de la DI, la DII requiere elevadas concentraciones de tioles reductores como cofactor (RSH 5 - 100 mM) para mantener la actividad enzimática en ensayos *in vitro* (Kaplan, 1980; Visser y col, 1983). La presencia de estas elevadas concentraciones de agentes antioxidantes son importantes para modificar el estado redox de la enzima y estabilizar los puentes disulfuro intra e intermoleculares previniendo la formación del complejo PTU-DII y bloquear la habilidad del PTU para inhibir a esta desyodasa. La resistencia de la desyodasa tipo II al PTU es uno de los criterios que se ha utilizado tradicionalmente para diferenciarla con la DI, sin embargo sólo esta característica no es suficiente. En ensayos *in vitro*, con microsomas de BAT, en donde se ha determinado a la enzima utilizando concentraciones menores del

intervalo mM de cofactor y subnanomolares de sustrato la conversión de T_4 a T_3 se ha visto inhibida por el PTU (Leonard y Visser, 1986; Goswami y Rosenber, 1988). Otros autores han tenido dificultad en corroborar estos hallazgos sobre la capacidad del PTU para inhibir a la DII, y sólo con concentraciones mayores de 100 μ M han podido reproducir este efecto (Silva y col, 1982). Estos datos ilustran la importancia de modificar las condiciones de ensayo ya que no sólo sirven para definir el mecanismo operacional de la enzima sino también para identificar y caracterizar los diferentes tipos de isoenzimas.

Las características cinéticas de la DII muestran que tiene una K_m en el intervalo nanomolar (nM) para yodotironinas y este parámetro es 200 a 400 veces menor que el determinado para la DI. El mecanismo de reacción propuesto para esta enzima es de reacciones multisustrato, en las cuales tanto el sustrato como el cofactor se combinan con la enzima previo a la catálisis, y son usualmente descritas como "secuenciales" FIGURA 7, (Leonard y Visser, 1986; Visser y col, 1978; Visser y col 1983). En una gráfica de doble recíproca de la formación de producto contra concentraciones crecientes de T_4 o rT_3 , con diferentes concentraciones de DTT, revelan un patrón de líneas convergentes, característico de un mecanismo secuencial (FIGURA 8). Por otra parte, el ácido iopánico es un potente inhibidor de esta enzima ya que compite desplazando a la yodotironina de su sitio de unión.

La actividad es inhibida por altas concentraciones de T_4 , rT_3 y en menor grado T_3 . Análisis subsecuentes mostraron que esta actividad enzimática es rápidamente modulada por cambios de las hormonas tiroideas circulantes. En ensayos *in vivo* y en células en cultivo mostraron que estos cambios son independientes a la transcripción o traducción y principalmente dependen de la velocidad de recambio y de la vida media de la enzima. En animales eutiroideos la vida media de la DII de cerebro es corta (30

min) y se incrementa de 4 a 6 hr en animales hipotiroides, sobre esto existen evidencias que sugieren fuertemente que las hormonas tiroideas modulan a la DII mediante modificaciones en la velocidad de degradación/inactivación de la enzima. Así, otro parámetro distintivo de la DII es la corta vida media de esta isoenzima comparada con la de la tipo I.

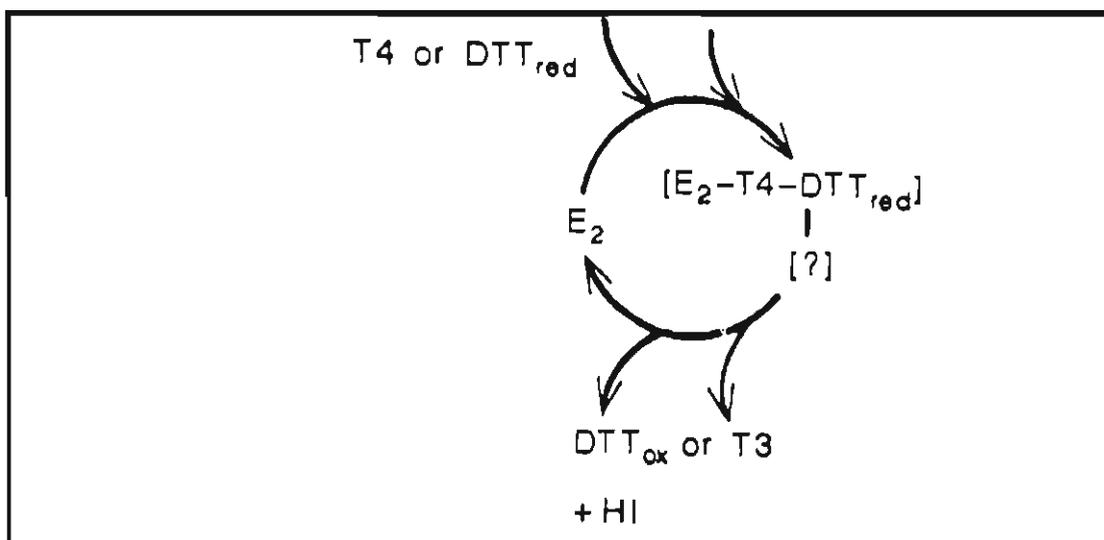


FIGURA 7: Mecanismo de reacción secuencial propuesto para la desyodasa tipo II. (modificado de Köhrle, 1994).

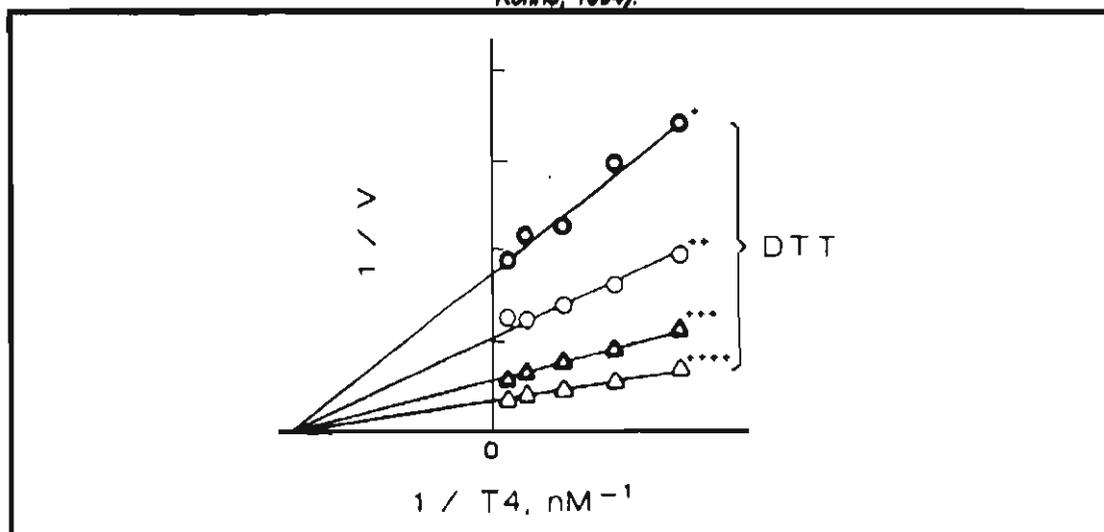


FIGURA 8. Gráfica Lineweaver-Burk. Cinética de reacción determinada para la DII en una fracción de membranas de cerebro. (Modificada de Visser y col, 1982).

3.2.4 Probable función.

Se ha sugerido que la DII cataliza la producción local de T_3 para el "autoconsumo" del órgano que contiene este tipo enzimático.

3.3 Desyodasa Tipo III (DIII)

Esta enzima representa la verdadera 5D ya que cataliza exclusivamente la vía IRD. Esta desyodación ocurre en casi todos los tejidos excepto en la hipófisis. Los principales órganos en los que se ha detectado son: corteza cerebral y piel de rata adulta; en la placenta de rata y humano y en varios tejidos fetales de rata como músculo, intestino, hígado y cerebelo (Kaplan y col, 1983; Leonard y Visser, 1986). También se ha encontrado en hígado y cerebro fetal de pollo (Berghman y col, 1989; Valverde-R y col, 1993) y en piel de trucha (Fenton, 1994). Su distribución subcelular no está bien definida, sin embargo esta enzima parece ser también una proteína intrínseca de la membrana asociada a las membranas microsomales. Como en el caso de las otras isoenzimas la inestabilidad para mantener la actividad catalítica durante el procedimiento de fraccionamiento ha dificultado el establecimiento de su localización subcelular. La actividad se encuentra asociada principalmente a tejidos fetales (indiferenciados) y en órganos que aún no responden a las HT. Por esta razón, se plantea que su función es prevenir la exposición a niveles excesivos o a periodos inapropiados de T_3 . Además, a diferencia de la vía 5'D que incrementa concomitantemente a los procesos de maduración, la vía 5 D disminuye.

3.3.1 Purificación de la Enzima.

En placenta de rata y a partir de preparaciones microsomales solubilizadas, deslipidizadas, separada por cromatografía en columna de carboximetil-celulosa-sephadex y marcadas por afinidad utilizando $[^{125}I]$ -BrAc T_3 ; se identificó una banda en

electroforesis con un peso molecular de alrededor de 31 kDa. La densidad de esta banda marcada aumenta en presencia de DTT y es inhibida (60 %) por T_3 150 μ M. Esta proteína se ha identificado como DII, y se ha visto que se requiere la presencia de fosfolípidos para mantener su actividad (Roti y col, 1981).

3.3.2 Clonación y Expresión de la Enzima.

No obstante la importancia fisiológica de la reacción que cataliza la DIII, ya que constituye la vía de inactivación de las tironinas, se conoce poco acerca de las propiedades bioquímicas, fisiológicas y funcionales de esta isoenzima. Sin embargo, recientemente St. Germain y col (1994b), utilizando una técnica de hibridación substractiva por PCR, aisló un cDNA de *Xenopus laevis* (XL-15), que codifica para una proteína que tiene una actividad de DIII. Análisis secuenciales de este cDNA mostraron una gran homología con el RNAm que codifica para la DI, incluyendo el codón UGA que codifica para una selenocisteína en la enzima de mamífero. Las características funcionales de la desyodasa expresada en *X. laevis* a partir de esta metodología mostraron: una K_m para T_3 de 2 nM, con una V_{max} de 1.3 pmol/mg/min de proteína y una eficiencia catalítica de hasta 727. Esta actividad requiere de elevadas concentraciones de cofactor (200 mM) y mostró una resistencia al PTU y a la TGA ya que se requieren concentraciones mayores (>100 veces) para poder ver efectos inhibitorios con estos agentes en comparación a la DI (St. Germain y col, 1994b).

3.3.3 Características Cinéticas y Operacionales.

La 5D requiere elevadas concentraciones de agentes reductores RSH y el papel de estos tioles en la reacción no es claro. Sin embargo, la adición de concentraciones crecientes de éstos aumentan proporcionalmente la actividad de la enzima y muestran una cinética de saturación hiperbólica típica, sugiriendo que los tioles participan en la reacción como cofactor (70 mM). Estos tioles en concentraciones > 200 mM inhiben a

la 5 D por un mecanismo aún desconocido, aunque se ha propuesto que sea a través del rompimiento de un puente disulfuro estructural que altera la conformación del sitio activo. Por sus características cinéticas su substrato preferencial es la T₃ (Km 6nM), comparado con la T₄ (Km 40nM). Estudios recientes realizados en el hígado muestran que los derivados sulfatados de ambas tironinas tiene una mayor eficiencia catalítica (50-200 veces) que los no conjugados. La regulación de la DIII es diferente a las de las otras desyodasas, su pH óptimo es ligeramente básico (8 - 8.5) y no es inhibida por PTU (Kaplan y col, 1983). La única forma de analizar *in vitro* la vía 5-D es utilizando un pH alcalino y su substrato preferencial. El mecanismo de reacción propuesto para esta enzima es también el "secuencial", en el cual tanto el substrato como el cofactor interaccionan con la enzima al mismo tiempo.

CUADRO 3. DESYODASAS. PRINCIPALES CARACTERISTICAS EN MAMIFEROS

CARACTERISTICAS	DI	DII	DIII
Anillo desyodado	ambos	fenólico	tirosilo
Sustrato preferencial	$rT_3 > T_4 > T_3$	$T_4 > T_3$	T_3 sulfato $> T_4$
Km	~500 nM	~ 1-2 nM	~ 5-20 nM
Cofactor (Km)	~ 5 mM	~ 25 mM	~ 70 mM
Mecanismo catalítico	ping-pong	secuencial	secuencial
Sitio activo	Se-Cys	Se-Cys	Se-CyS
Efecto de:			
Tioglicosa aurica	++++	+	+
PTU	++++	±	+
Iodoacetato	++++	+	
Acido iopanoico	++++	++++	++++
Flavonoides	++++	+++	
Principal distribución en órganos	hígado, infón, tiroides,	SNC, BAT, pineal, hipófisis, suprarrenal	placenta, SNC, piel
Localización subcelular	membrana microsomal	membrana microsomal y plasmática	membrana microsomal
Hipotiroidismo	↓ hígado	↑ todos	↓
Hipertiroidismo	↑ hígado	↓ todos	↑
Probable función	proveer T_3 circulante	autoconsumo	desactivación tisular de T_3 y T_4

SNC, sistema nervioso central; BAT, tejido graso café; Km, constante de Michaelis; PTU, 6-propil-2-tiouracilo. (Modificada de: Leonard, 1991; Köhrle y col, 1991 y St Germain, 1994a).

3.4 Actividad Desyodativa Hepática en Teleostea.

El estudio de la desyodación periférica en los peces se inició hace poco más de 10 años (Pimlott y Eales, 1983). En este lapso se han realizado diversos estudios que incluyen la caracterización cinética de la vía 5'D principalmente en el hígado (Shields y Eales, 1986), así como estudios encaminados a entender la regulación de esta actividad y su interacción con otras hormonas (Cyr y col, 1988; Vijayan y col, 1988; Mac Latchy y Eales, 1990; Brown y col, 1991).

3.4.1 Actividad enzimática 5'D.

Hasta 1992 únicamente se había descrito y caracterizado la actividad 5'D total en el hígado de los salmónidos (Shields y Eales, 1986; Eales y Finnison, 1991). Posteriormente, el mismo grupo de investigadores reportó la presencia de actividad DI y DII en el hígado de estos peces (Mac Latchy y Eales, 1992). Los estudios iniciales sobre la caracterización de la cinética de la actividad 5'D total en el hígado de la trucha arcoiris mostraron resultados contradictorios. Así, y utilizando T4 como sustrato, los valores de Km resultaron de 190 nM (Shields y Eales, 1986), o bien 13 nM (Vijayan y col, 1988). Los estudios subsecuentes, utilizando también T₄ arrojaron resultados sorprendentes. Así, y comparadas con su isotipo correspondiente en mamíferos, la Km de la DI sensible a PTU fue *ultra baja* (0.098 nM), mientras que la DII resistente a PTU mostró un valor de Km significativamente mayor al encontrado en el resto de los vertebrados (10 nM) (Mac Latchy y Eales, 1992). Es importante resaltar que la DI de Km ultra baja resultó ser solo parcialmente sensible a la inhibición por PTU, requiriendo por lo menos concentraciones un orden de magnitud mayores a las que se han reportado para el resto de los vertebrados. Estudios recientes en el hígado de la tilapia (Mol y col, 1993) apoyan la noción de que el hígado de tilapia presenta una enzima con características cinéticas muy parecidas a las de la DII de mamífero. Este último grupo argumenta que la DI no está presente en el hígado de los poiquiloterms, incluyendo a los peces (Kuhn y col, 1993).

Las controversias existentes sobre la presencia o no de la actividad DI pueden estar fundadas en aspectos metodológicos, ya que en ninguno de los casos se ha utilizado a la rT₃ como sustrato en la caracterización de la enzima, siendo éste el sustrato preferencial *in vitro*. Otro aspecto que llama la atención, es la descripción de la presencia de actividad DII en el hígado de algunos teleósteos, ya que se trataría del único grupo de vertebrados que presentara a este tipo enzimático en el hígado adulto. La presencia de ambos tipos enzimáticos en el hígado de los teleosteos sugiere arreglos funcionales y de regulación diferentes en el sistema tiroideo de estas especies.

3.4.2 Actividad enzimática 5D.

Con respecto a la vía enzimática desyodativa que genera rT_3 en los peces, los estudios son aún más recientes y se iniciaron en 1992. La actividad DIII se ha detectado principalmente en el hígado y el cerebro tanto de truchas (Sweeting y Eales, 1992 a,b) como de los salmones (Morin y col, 1993). Se ha propuesto que esta vía desyodativa es activa solamente bajo ciertas condiciones: vgr., dieta y esmoltificación (Sweeting y Eales, 1992 a,b; Morin y col, 1993; Eales y col, 1993).

4. Regulación y Significado Funcional de la Desyodación

En contraste a la regulación de la glándula tiroides por el eje hipotálamo-hipófisis-tiroides, la producción extratiroidea de T_3 y la regulación de las vías desyodativas correspondientes es un proceso órgano-específico y compartimentalizado cuya magnitud varía según el estado ontogénico y fisiológico del organismo. Aunque su estudio apenas inicia y se ha circunscrito principalmente a especies homeotermas, en términos generales se reconoce que la desyodación extratiroidea de las tironinas está regulada principalmente por tres factores: 1) el aporte y la disponibilidad del sustrato; 2) el aporte y balance energético, y 3) algunos mensajeros del sistema neuroendócrino. A continuación revisaremos brevemente los estudios más relevantes al respecto enfatizando, la información relativa a la actividad DI y DII. Es pertinente aclarar que para el caso particular de los teleosteos, la información es muy escasa y que además, en todos los estudios solamente se ha evaluado la actividad hepática total.

4.1 Disponibilidad del Sustrato

Como se resume en el CUADRO 4, en la rata, las alteraciones en los niveles circulantes de las HT (hiper o hipotiroidismo) tienen efectos diferenciales sobre la actividad 5'D dependiendo del tejido u órgano que se analice. El hipertiroidismo aumenta la actividad DI en hígado y riñón (Jenning y col, 1984 y Balsam y col, 1978), pero disminuye la actividad DII en hipófisis y corteza cerebral. Por el contrario, durante el hipotiroidismo, los cambios en la actividad desyodativa son inversos, decrece la actividad DI e incrementa la DII. Estos cambios, particularmente los que exhibe la actividad de la enzima DII, sugieren la instalación de una estrategia compensatoria para proteger a los órganos que poseen dicha isoenzima (corteza cerebral, BAT, hipófisis, pineal y placenta), de las alteraciones secundarias al exceso o deficiencia de

HT (Balsam y col, 1978; Erickson y col, 1982; Kaplan y Yaskioski, 1982; Larsen y col, 1981, Leonard y Visser, 1986; Silva y Larsen, 1986).

En contraste a la DI, la DII es rápidamente inactivada por el sustrato T_4 y por la rT_3 , pero no por la T_3 . Esta inactivación es relativamente rápida (4 hr) y ocurre simultáneamente con la reacción de desyodación. Se ha propuesto que dicha inactivación es una acción extragenómica de las tironinas que aparentemente no requiere síntesis de proteínas de *novo* (Silva y Matthews, 1984 y Leonard y col, 1984). También se ha propuesto que es una acción secundaria al mecanismo de internalización de la 5'D II que ocurre simultáneamente a la desyodación y en la cual interviene el citoesqueleto celular. Este mecanismo ha sido analizado con mayor detalle en astrocitos de rata en cultivo después de ser estimulados con AMPc. El modelo propone que la subunidad de la DII que se une a este sustrato (p29 SBS) es trasladada de la membrana plasmática a un compartimento endosomal formando un complejo T_4 -SBS-actina F. En este compartimento ocurre la disociación de la actina F y la consecuente internalización/inactivación de la enzima. En ausencia de la T_4 , este proceso sigue una ruta primaria de degradación/inactivación de la subunidad p29 SBS que termina en lisosomas densos sin la participación de los microfilamentos (Leonard, 1991; Farwell y col, 1993).

Por otra parte, en ensayos *in vitro* utilizando agentes que bloquean la polimerización de la actina se observa que se bloquea la inactivación rápida inducida por el sustrato y se prolonga la vida media de la DII, en tanto que agentes como el ácido retinoico, que se sabe aumentan la polimerización de la actina, no incrementan el recambio de la DII ($t_{1/2}$ 1.99 h) o promueve la unión de la enzima con la actina. Esto sugiere que el citoesqueleto o la actina F en ausencia de la T_4 , no afectan el recambio rápido de la enzima, inducido por esta tironina. Por lo tanto el ácido retinoico no afecta

el recambio de la enzima el cual está en el orden de minutos a horas comparada con la de la DI que se estima entre 20 -30 hrs. El efecto directo de las HT sobre la membrana plasmática y su relación con el citoesqueleto puede jugar un papel importante durante los procesos relacionados al desarrollo y la diferenciación del SNC y así como también en las comunicaciones intraneuronales durante estos procesos (Leonard, 1991; Farwell y col, 1993).

CUADRO 4. ACTIVIDAD DESYODATIVA Y APORTE DE HORMONAS TIROIDEAS

TRATAMIENTO	DESYODASA			Referencia
	I	II	III	
Ratas hipertiroideas. (T ₄)	↑ hígado riñón	↓ hipófisis	↑ SNC	Kaplan, 1980 Kaplan y Yaskoski, 1980 Kaplan, 1984
Ratas hipotiroideas. (Tx / metimazol)	↓ hígado riñón hipófisis	↑ hipófisis SNC BAT	↑ SNC	Kaplan y Yaskoski, 1980 Kaplan Yaskoski, 1982 Sato y Robbins, 1981
Ratas (Tx + T ₄)	↓ BAT			Silva y Larsen, 1986
Ratas (Tx + rT ₃)	↓ BAT			Silva y Larsen, 1986
Ratas (Tx + T ₃)	→ BAT			Silva y Larsen, 1986

BAT, tejido graso café; SNC, sistema nervioso central; Tx, tiroidectomía.

Las hormonas tiroideas juegan un papel crucial en el desarrollo, crecimiento y maduración normal del SNC de los vertebrados y generalmente se acepta que este efecto puede ser directo, indirecto o permisivo. El efecto directo está mediado por la interacción de la T₃ con su receptor nuclear, mientras que la T₄ actúa como prohormona para la neogénesis local de T₃ que es catalizada por la actividad 5' desyodasa tipo II. Los efectos indirectos o permisivos incluyen entre otros el facilitar la acción de otras hormonas o factores de crecimiento en la activación génica o en alguna otra función celular (metabolismo energético) (Oppenheimer y col, 1987; Larsen, 1989). Los datos referentes a la 5'D neural durante la vida embrionaria es escasa y fragmentada, sin embargo, en especies atriciales (rata), se han detectado niveles bajos

de la actividad DII cerebral durante el último tercio de la gestación. Simultáneamente, la vía de desactivación o desyodasa tipo III mostró sus valores máximos en corteza cerebral, cerebelo e hipotálamo en esta misma etapa de gestación (Kaplan y col, 1982; McCann y col, 1984). En especies precociales, vgr, ovejas y pollos el patrón es diferente. En oveja, a la mitad de la gestación se detectaron concentraciones significativas de DII en corteza cerebral. Al final del periodo de gestación en la hipófisis esta actividad fue 2.5 veces mayor que en la madre. Por otra parte, en el pollo la actividad 5' D cerebral mostró un patrón bifásico con valores máximos a los 13 y 20 días de gestación. El primer pico se ha asociado con una disminución de la actividad DI hepática (día 14-17) y un incremento en la DIII en ambos órganos (periodo de sinaptogénesis). Finalmente en los días 18-20 (periodo perinatal), la actividad de la vía 5' alcanza sus valores máximos tanto en hígado como en cerebro en tanto que la vía 5D es reducida en 40 % en el cerebro y desaparece en el hígado (Darras y col, 1992 y Valverde y col, 1993). Estos datos reafirman el concepto de un mecanismo protector del cerebro contra la sobreexposición de la T_3 durante el periodo de sinaptogénesis y sugiere que dicho mecanismo involucra la regulación de las desyodasas extraneurales (Valverde y col, 1993).

4.1.1 Estudios en peces.

El suplemento con T_3 en el alimento (12 ppm) durante dos semanas aumenta las concentraciones circulantes de esta hormona pero disminuye la actividad 5'D en el hígado de la trucha arcoiris alrededor de 25%. Este mismo suplemento administrado por 12 semanas inhibe completamente dicha actividad (Eales y Finnson, 1991).

Por otra parte, el efecto agudo (1, 2 ó 3 días) del suplemento de T_3 y T_4 (12 ppm) fue evaluado también en la trucha arcoiris (Sweeting y Eales, 1992a). En todos los casos, la administración de T_3 incrementó los niveles circulantes de T_3 y T_4 , y disminuyó significativamente la actividad 5'D hepática. En contraste, la ingesta de

hasta 48 ppm de T4 durante 3 días no modificó la actividad 5'D hepática en estos organismos. Esto último podría indicar insensibilidad del sistema enzimático 5'D a T4.

4.2 Aporte y Balance Energético

Siendo las HT de los mensajeros químicos más importantes en la regulación del metabolismo energético y la respiración celular, no resulta sorprendente que la actividad de las vías desyodativas sea a su vez regulada por el aporte y el gasto energético (balance) del organismo (CUADRO 5). Numerosos estudios han revelado que los cambios cuali- y cuantitativos en la ingesta calórica modifican substancialmente la actividad de la vía 5'D en diferentes órganos y sistemas del individuo.

En diferentes especies animales, incluyendo al hombre, se ha mostrado que al cabo de 6 a 8 h de ayuno las concentraciones circulantes de T_4 y T_3 disminuyen significativamente; mientras que las de rT_3 aumentan y las de T_4 libre y de TSH no se modifican (Burger, 1986; Tibaldi y Surks, 1985; Wartofsky y Burman, 1982). Estas alteraciones se asocian a una disminución de la actividad DI hepática y, consecuentemente, a la reducción tanto de la conversión de T_4 a T_3 como de la degradación de rT_3 (Balsam y col, 1978; Burger, 1986; Chopra, 1980; Kaplan, 1986; Silva y Larsen, 1986).

Por otra parte, la administración selectiva de nutrimentos ricos en hidratos de carbono y proteínas revierte estos cambios, mientras que las grasas no tienen efecto (Gavin y col, 1981; Gavin y col, 1987). Se ha sugerido que los hidratos de carbono aumentan el contenido de la enzima activa, mientras que las proteínas incrementan la concentración intracelular de compuestos con grupos R-SH (Goswami y Rosenberg, 1988). Además, estas modificaciones en la actividad y selectividad de las vías monodesyodativas ocurren de manera compartimentalizada y órgano-específica, ya

que durante el ayuno, la actividad 5'D incrementa en hipotálamo y eminencia media y permanece sin cambio en corteza cerebral y riñón (Balsam y col, 1978; Kaplan y Yaskioski, 1982). Los estudios sobre la regulación de la 5'D hepática durante modificaciones nutricionales revelan que la glucosa e insulina son capaces de revertir el efecto del ayuno en la producción de T_3 . Estos factores muestran efectos independientes, pero a la vez son aditivos, lo que sugiere mecanismos de regulación diferentes.

Recientemente se ha mostrado que una dieta adicionada de glucosa aumenta la actividad 5'D I de hígado (2.5 veces) y la 5'D II de BAT (12 veces), en tanto que en el cerebro el contenido de T_3 se incrementa sólo (2 a 3 veces) al compararlos con animales con una dieta normal. Estos últimos resultados pueden implicar un incremento en: a) el acceso al sustrato T_4 , b) en la actividad 5'D II, y c) en la entrada de T_3 al pool presente en este órgano (Gavin y col, 1987). Recientemente se mostró en nuestro laboratorio que la sobrealimentación con glucosa a ratas lactantes aumenta hasta 55% la actividad DI mamaria asociada a un incremento en la producción láctea (Aceves y col, 1994). Este efecto de la glucosa sobre la actividad DI mamaria es congruente con observaciones previas de que, durante la lactancia, la glándula mamaria (Bauman y Currie, 1980) consume más del 80 % de la glucosa circulante y la demostración de que en el hígado un incremento de glucosa estimula la DI hepática (Kaplan, 1986; Gavin y col, 1989).

La glucosa estimula la actividad DII en cultivos primarios de neuroblastoma de ratón y este incremento es dependiente de la concentración del carbohidrato e independiente de la presencia de insulina en el medio. Estos datos confirman estudios previos (St. Germain y col 1986) que muestran que la insulina no modifica la actividad DII, en estas células neurales. Aunque el mecanismo íntimo de este efecto

estimuladorio de la glucosa no se conoce, los inhibidores de síntesis de proteínas (cicloheximida, puromicina) bloquean marcadamente la activación inducida por glucosa, lo que permite sugerir que el efecto de la glucosa es dependiente de síntesis de proteínas de *novo* a través de la regulación transcripcional de esta enzima (Gavin y col, 1989).

CUADRO 5. ACTIVIDAD DESYODATIVA Y APOORTE ENERGETICO

MANIPULACION EXPERIMENTAL	TEJIDO	ACTIVIDAD DESYODATIVA	REFERENCIA
ayuno	hígado	↓ DI	Kaplan y Yaskoski, 1982
ayuno	hígado	↓ DI (30-50%)	Kaplan y Utiger, 1978 *
CHO, proteínas	hígado	↑ DI	Gavin y col, 1981
grasa	hígado	sin efecto	Gavin y col, 1981
glucosa	hígado	sin efecto	Kaplan y Utiger, 1978 Kaplan y Yaskoski, 1982
glucosa	hígado	↑ DI	Sato y Robbins, 1981 **
ayuno	riñón	sin efecto	Gavin y col, 1987 **
glucosa	BAT	↑ DII	Gavin y col, 1987
glucosa	SNC	↑ DII	Gavin y col, 1989 Gavin y col, 1990
glucosa	NB41A3	↑ DII	Sato y Robbins, 1981 ***
ayuno	hipotálamo	↑ DII	Kaplan y Yaskoski, 1982

BAT, tejido graso pardo; SNC, sistema nervioso central; NB41A3, cultivo de células de neuroblastoma; CHO, Chow purina; *, los tres tipos de desyodasa; ** *in vitro*; ***ratón.

Los trabajos respecto a insulina y glucagon son escasos y debido a las limitaciones del modelo experimental utilizado es necesario tomar con cautela los resultados obtenidos. La insulina parece aumentar la actividad DI en cultivos de hepatocitos, lo cual sugiere que la hormona regula el metabolismo de las tironinas en el hígado (Gavin y col, 1987; Sato y Robbins, 1981). Por otra parte, el glucagon antagonizó el efecto de la insulina, pero en ausencia de ésta no se observaron cambios (Sato y Robbins, 1981).

En el BAT, la administración *in vivo* de insulina estimula la actividad hasta ocho veces. La cicloheximida administrada 30 min antes de la hormona bloquea la respuesta, indicando que se requiere de síntesis de proteínas *de novo* continua para que se observe la estimulación de la DII (Silva y Larsen, 1986). Por el contrario, en cultivos primarios de células NB41A3 la actividad DII no se modifica al suplementar el medio con insulina (Gavin y col, 1990).

Se conoce que durante el último tercio de la gestación y durante la lactancia disminuye la actividad termogénica del BAT, y que esta reducción probablemente es parte de los mecanismos de ahorro energético relacionados con la demanda impuesta por la producción láctea (Trayhurn y col, 1982). Estudios recientes han mostrado que durante estas situaciones fisiológicas, la administración subcutánea de NA no tiene efectos sobre la 5'D del BAT. Aunque por el momento se desconocen los mecanismos que regulan esta disminución durante el ciclo reproductor, se ha propuesto la participación de uno o más de los siguientes factores: a) disminución de la actividad del sistema nervioso simpático (SNS); b) disminución en la sensibilidad de los receptores adrenérgicos en el BAT; c) interacción con otras hormonas cuyos niveles o actividad se modifica durante estas situaciones fisiológicas (Giralt y col, 1986). En este contexto, resulta pertinente señalar que en ratas hipofisectomizadas, la actividad DII en el BAT aumenta significativamente, y que la administración de hormona de crecimiento bovina bloquea dicho aumento (Silva y Larsen, 1986). Este efecto inhibitorio de GH sólo fue evidente cuando la hormona se administró en forma crónica. Resultados semejantes se obtuvieron administrando GH a ratas tiroidectomizadas y el efecto inhibitorio sobre la actividad DII fue selectivo al BAT y no afectó la actividad enzimática en corteza cerebral y en hipófisis. Este estudio muestra que la expresión de la enzima depende no sólo de hormonas tiroideas y del SNS sino que se encuentra también bajo la influencia inhibitoria de GH o de procesos dependientes de GH (Silva y Larsen, 1986).

En vacas lactantes la administración de bGH recombinante redujo ligeramente o no afectó a la actividad DI hepática y renal en tanto que en la glándula mamaria la actividad se incrementó casi al doble. El mecanismo de acción de la GH no se conoce, sin embargo, se plantea que sea a través de sus intermediarios como el factor de crecimiento insulinoide IGF-I (Capuco y Keys, 1980). El efecto de la GH sobre la desyodación también se ha estudiado en otros vertebrados; en embriones de pollo, la DI también es estimulada en contraste al efecto inhibitorio inducido en la actividad DIII (Berghman y col, 1989). Por otra parte, estudios sobre el efecto de la PRL en la rata señalaron que esta hormona no tiene efecto, sin embargo se observó una inhibición por somatostatina en la DI (Gavin y Moeller, 1983).

4.2.1 Estudios en Peces.

Solo conocemos un estudio en el que se analizó la interrelación entre el efecto nutricional, la función tiroidea y la acción de GH (Leatherland y Farbridge, 1992). Los experimentos consistieron en la administración intraperitoneal de 2 inyecciones de GH ovina (oGH) o recombinante humana (rhGH) (2 µg/g de peso), en presencia o no de la misma dosis de TSH bovina (bTSH) a truchas arcoiris ayunadas y alimentadas normalmente. El efecto se evaluó a las 2, 4 y 6 semanas. La GH administrada sola no modificó los niveles circulantes de T4 en ninguno de los grupos en estudio, pero si incrementó los niveles circulantes de T3 y el contenido hepático de T3 en el grupo de las truchas alimentadas. La actividad 5'D hepática aumentó significativamente con la administración de la oGH y la rhGH en ambos grupos, ayunados y alimentados. La bTSH suprime a la 5'D hepática estimulada tanto por oGH como por rhGH en los grupos ayunados, y en los grupos alimentados estimulados con rhGH.

El efecto de la GH sobre el sistema tiroideo en los teleosteos es bien conocido y probablemente uno de los más estudiados. Estudios iniciales (Milne y Leatherland, 1978; Grau y Stetson, 1979) mostraron un efecto tirotrópico y estimulador sobre la conversión periférica de T4 a T3, evaluado a través de su efecto sobre la velocidad de recambio de los niveles circulantes de ¹²⁵I-T4. Recientemente Mac Latchy y Eales (1990) administraron GH a truchas arcoiris, vía i.p. en dosis de 0.1, 0.4 y 1 µg/g de peso y evaluaron el efecto en un lapso de 5 a 48 hrs de exposición. La GH incrementó los niveles circulantes de T3 paralelamente con la actividad desyodativa a partir de las 8 hrs post-inyección presentando un incremento máximo a las 24 hrs, sin embargo no modificó los niveles circulantes de T4. Los autores proponen que el efecto de la GH sobre los niveles circulantes de T3 y la actividad desyodativa hepática puede ser directo, o bien ocasionado por factores liberados por la GH, como las somatomedinas.

Posteriormente, para determinar los mecanismos moleculares de la regulación de la 5'D hepática por T3 y GH, Sweeting y Eales (1992b) prepararon cultivos primarios de hepatocitos de trucha, y los incubaron a diferentes tiempos con GH humana (5, 20, 25, 50, 100 ó 259 ng hGH/ml) o T3 (15 ó 30 nM). Observaron que la hGH no incrementó la actividad 5'D a ninguna dosis y tiempo de exposición y propusieron que esta falta de efecto se deba a una o varias de las siguientes causas: (i) que el medio de incubación requiera de algún factor adicional que le permita a la GH ejercer su acción y/o (ii) que la GH normalmente no actúe directamente sobre el hígado sino sobre algún otro órgano blanco, que a su vez genere otra señal que podría ser nerviosa o humoral que incremente la actividad 5'D hepática. Por otra parte, la T3 administrada en el medio de cultivo inhibe la actividad de la 5'D en los cultivos de hepatocitos, confirmando hallazgos previos de ese grupo, en donde muestran que la ingesta de T3 inhibe a la 5'D hepática (Eales y Finnsen, 1991; Sweeting y Eales, 1992a)

Byamungu y col (1992) evaluaron el efecto de la somatostatina sobre la actividad 5'D en riñón e hígado de tilapia. La somatostatina (0.1µg/g de peso) se administró vía intravenosa y su efecto se monitoreó a las 4 hrs post-inyección. La

actividad 5'D hepática se incrementó con la administración de la somatostatina. Los autores cuestionan el efecto observado ya que se conoce que la somatostatina es un potente inhibidor de la función tiroidea.

4.3 Sistema Neuroendócrino

4.3.1 Sistema Nervioso Autónomo.

La relación recíproca entre hormonas tiroideas y sistema nervioso autónomo particularmente con su división simpatoadrenal (SSA), es bien conocida y constituye una parte integral del control del sistema tiroideo (Scanlon, 1991; Silva y Landsberg, 1991). Existen algunas evidencias que apoyan la noción de que modificaciones en el tono simpático y en el contenido de HT en los tejidos, son las principales determinantes en la regulación tanto de la actividad desyodativa como de la velocidad de recambio de esta enzima, que está involucrada en el control de la concentración intracelular de T_3 local. Este control selectivo y órgano-específico que ejerce el SNS en la actividad desyodativa a nivel de las células blanco, completan la cascada de señales neuroendócrinas que gobiernan la velocidad de secreción de las hormonas y parecen ser parte de los mecanismos de adaptación reostática en el organismo. Esta interacción sinérgica entre el SSA y las HT se da en respuesta a demandas como la exposición al frío, la lactancia y el ayuno. En el caso de la exposición aguda al frío es a través de incrementar la producción de calor por termogénesis sin temblor, en tanto que en situaciones opuestas como el ayuno y la lactancia se estimula la respuesta simpatomedular y es inhibida la termogénesis facultativa. Esta interrelación se ha abordado desde dos perspectivas: la primera es el efecto de las HT sobre el SSA y por otra parte el efecto de las catecolaminas en la regulación de la glándula tiroidea y en la acción de las hormonas tiroideas (Silva y Landsberg, 1991). Los estudios relacionados con la interacción funcional de las HT y el sistema SSA, han mostrado que mientras el

exceso de HT está asociado a una disminución en la actividad del SNS, la deficiencia de tironinas se asocia con un incremento substancial en la actividad simpática. Las HT modifican la acción y la respuesta catecolaminérgica a nivel celular por diversos mecanismos que varían dependiendo del tipo de tejido y la especie. Estos mecanismos pueden aumentar la sensibilidad a catecolaminas modificando la densidad de receptores adrenérgicos, o bien amplificando la respuesta de los efectores simpáticos a nivel postreceptor. El efecto de las HT a nivel de los receptores adrenérgicos parece ser selectivo, ya que en general, incrementa el número de los receptores β en tanto que disminuye los α en diversos tejidos. A este nivel también se ha mostrado que las HT aumentan la actividad del sistema adenilato ciclasa-AMPc (Silva y Landsberg, 1991).

Con respecto al efecto de catecolaminas sobre la glándula tiroides, se sabe que ésta se encuentra inervada por terminales que se originan del ganglio cervical superior, y tanto el epitelio folicular como la vasculatura de la glándula tienen una inervación simpática. Las catecolaminas estimulan tanto la síntesis como la liberación de HT, y por lo tanto juegan un papel importante en la regulación de la secreción de las HT en determinadas circunstancias fisiológicas. En contraste a la potenciación de los efectos de catecolaminérgicos por las HT, no existen evidencias que muestren que el sistema simpatoadrenal aumenta la respuesta de las células a la T_3 a nivel de receptores o postreceptores. Sin embargo, las catecolaminas pueden aumentar la desyodación de la T_4 a T_3 en la glándula tiroides. Así, debido a que la T_3 es 10 veces más potente que la T_4 , éste es un mecanismo mediante el cual las catecolaminas pueden aumentar el efecto tiroideo.

Por otra parte, las catecolaminas tienen poco efecto sobre la actividad DII hepática en contraste con la gran estimulación que muestra la actividad DII del BAT y cerebro de rata, y otras especies. (Silva y Landsberg, 1991).

La influencia del estatus tiroideo en varias respuestas metabólicas mediadas por catecolaminas ha sido foco de numerosos estudios. Las principales respuestas estudiadas son las que involucran los receptores β -adrenérgicos, incluyendo lipólisis, secreción de insulina, termogénesis y aclimatación al frío.

La relación entre las catecolaminas y las HT en la regulación del metabolismo productor de calor (termogénesis) en mamíferos es compleja. El SNS es el principal responsable del ajuste en la producción de calor extra en respuesta a la disminución de la temperatura medioambiental. Por otra parte, las hormonas tiroideas se pueden ver como los principales reguladores de la tasa del metabolismo basal o como moduladores de la termogénesis inducida por las catecolaminas (Himms-Hagen, 1975; Silva y Landsberg, 1991)

Específicamente en relación a la termogénesis uno de los más importantes sitios de producción de calor metabólico regulado por catecolaminas es el BAT. Está bien establecido que la actividad DII de BAT aumenta en tejidos de animales neonatos y de adultos durante la exposición al frío y que este efecto está mediado por receptores adrenérgicos α_1 . (Silva y Landsberg, 1991). Por otra parte, el bloqueo de la actividad simpática por un antagonista α_1 , inhibe la estimulación de la DII, así como el incremento de T_3 por la inervación simpática (Silva y col 1986; Shupnik y Ridway, 1987). En este último trabajo, la inhibición de la síntesis de proteínas por cicloheximida y actinomicina D, disminuyó el efecto de NA sobre la 5'D, sugiriendo que el mecanismo

involucra la síntesis de novo de RNAm para su efecto (CUADRO 6) (Mills y col, 1989; Obregón y col, 1987; Silva y Larsen, 1986).

La termorregulación al frío incluye dos tipos de respuesta, una inmediata o aguda de naturaleza simpática y neuroendócrina que está mediada principalmente por catecolaminas y algunos factores hipofisarios (TSH, ACTH y GH) y la otra crónica, de instalación lenta pero sostenida, que involucra componentes tanto de naturaleza endocrina como metabólica, entre las que destacan las hormonas tiroideas (Collins, 1978). Se sabe que el SNS así como los ejes hipotálamo, hipófisis, tiroides y suprarrenal son los principales órganos involucrados en la respuesta aguda de termorregulación (Collins, 1978; Himms-Hagen, 1975).

CUADRO 6. ACTIVIDAD D II. EFECTO DE LAS CATECOLAMINAS

TRATAMIENTO	DII	REFERENCIA
BAT, (H), NA (3.3 Uμ/Kg, sc) sacrif 4-6 h postrat.	↑ 7 veces	Giralt y col, 1986
BAT, (M), NA (40 ug/Kg, sc) ↑20 veces 109 sacrif 4-6 h postrat.	↑ 20 veces	Silva y Larsen, 1986
BAT, (M), NA (40 ug/Kg, sc) + ciclohex (5 mg/100 g, ip)	Bloquea efect NA	Silva y Larsen, 1986
BAT, (M), NA (40 ug/Kg, sc) + Actin D (.2-.4 mg/100 g, ip)	Bloquea efect NA	Silva y Larsen, 1986
BAT, G o L	↓	Giralt y col, 1986
BAT, G o L NA (3.3 uM/Kg)	Sin efecto	Giralt y col, 1986

BAT, tejido adiposo café; NA, noradrenalina; Ciclohex, cicloheximida; Actin, actinomicina; G, gestante; L, lactantes; M, machos; H, hembras.

En nuestro laboratorio se determinó que en la glándula suprarrenal existe DII y que la exposición aguda (15 a 120 min) al frío (4° C) se acompaña de: 1) un aumento rápido y sostenido de la 5'D en hipotálamo e hipófisis; 2) un aumento bifásico de la 5'D en la glándula suprarrenal. El componente rápido de la glándula suprarrenal corresponde a la médula y el lento a la corteza, y 3) la hipofisectomía aumenta significativamente la actividad enzimática basal de la glándula suprarrenal y durante la exposición al frío ocurre una hiperrespuesta en hipotálamo y la propia glándula suprarrenal (Anguiano y col, 1991).

Aunque su función no se conoce con certeza, el ritmo circádico que exhibe la DII en varios órganos neuroendócrinos parece ser una característica funcional distintiva entre las dos isoenzimas que catalizan la desyodación del anillo externo de las tironinas. En efecto, mientras que la actividad DI no exhibe ciclos de actividad, con excepción del BAT y los reportes controvertidos sobre la hipófisis anterior, la ritmicidad circádica de la actividad DII ha sido reportada en corteza cerebral, glándula pineal y de Harder (Guerrero y col, 1987; 1988; Murakami y col, 1988).

Recientemente en nuestro laboratorio se determinó que la DII presenta un ritmo marcado en el eje hipotálamo-hipófisis-suprarrenal, y mientras la ritmicidad hipotalámica parece estar sincronizada por el encendido de la luz, la oscilación de la DII en hipófisis y glándula adrenal corresponde a un fenómeno circádico endógeno y fotodependiente (Luna y col, 1995)

4.3.2 Glucocorticoides

En homeotermos, principalmente en mamíferos y aves, la evidencia experimental sugiere que estas hormonas inhiben a la actividad DI hepática. Sin embargo, este

efecto parece depender del estado de desarrollo de los organismos en estudio, pues se ha encontrado que en el periodo fetal y embrionario, los glucocorticoides ejercen el efecto opuesto sobre la actividad desyodativa, es decir, la activan o inducen. Así, en ratas macho adultos, la administración intraperitoneal de dexametasona produce elevación de rT_3 en suero e inhibición de la conversión hepática de T_4 a T_3 (Kaplan y Utiger, 1978). La administración de dosis farmacológicas de corticosterona durante siete días a ratas recién nacidas, sólo tiene efectos inhibitorios sobre la 5'D hepática, pero no sobre la tipo I en corteza cerebral, hipófisis y pulmón y tampoco modifica la actividad DII en corteza cerebral e hipófisis, ni la actividad tipo III en corteza cerebral (Kaplan, 1986).

Por otra parte, en experimentos realizados en fetos de oveja a término, la infusión sostenida de dosis crecientes de cortisol mimetiza el aumento fisiológico preparto y eleva las concentraciones de T_3 y disminuye las de T_4 en el feto; lo cual sugiere una activación de la vía 5'D I hepática (Thomas y col, 1978). En embriones de pollo *in vivo*, los glucocorticoides incrementan la actividad 5'D hepática y consecuentemente los niveles de T_3 (Decuypere y col, 1983). En trabajos *in vitro* empleando túbulos renales de rata, se encontró que el cortisol, la dexametasona y la corticosterona inhiben la conversión de T_4 a T_3 , y este efecto es bloqueado por actinomicina D (Heyma y Larkins, 1982). El efecto de los glucocorticoides en la desyodación de T_4 en cultivos de células de neuroblastoma también fue inhibitorio y aún no se ha determinado su significado biológico. En contraste, en cultivos de células gliales la hidrocortisona incrementa hasta dos veces la actividad DII en forma dosis dependiente y esta activación requiere de AMPc (Farwell y Leonard, 1989; Leonard y col, 1991).

Estudios en Peces. Hasta donde sabemos, existen dos estudios en los cuales se ha analizado el efecto del cortisol sobre la actividad 5'D hepática de teleósteos. En ambos casos se utilizaron implantes de liberación lenta. Vijayan y col (1988) administraron el cortisol en dosis de 5 y 50 mg/kg de peso y su efecto fue evaluado a los 56 días de administración. Los resultados mostraron que el cortisol aumenta la actividad 5'D hepática en la especie estudiada (*Salvelinus fontinalis*) pero que este incremento no se acompaña de un aumento en los niveles circulantes de HT. Los autores sugieren que esta discrepancia se puede explicar en base a un aumento en la tasa de depuración de la T3 producido por el cortisol.

Por otra parte, Brown y col (1991) administraron dosis de cortisol de 10 y 25 mg/kg de peso, y el efecto se evaluó a las 6 hrs, 1, 2, 3, 7, 14 y 21 días post-inyección. Los implantes de cortisol no modificaron la actividad 5'D, pero sí redujeron las concentraciones circulantes de T3 después de los 3 a 7 días de exposición, e incrementaron la tasa de depuración de T3. Los autores sugieren que el hecho de encontrar la tasa de depuración de T3 aumentada sin modificaciones en los índices de su producción es congruente con la idea de que el cortisol tiene efectos antagónicos en la función tiroidea.

4.3.3. Esteroides sexuales

La testosterona estimula la actividad 5'D hepática (Harris y col, 1979). La actividad es menor en homogenizados de hígado de rata hembra adulta que en machos adultos, y esta diferencia aparece en el momento de la maduración sexual. Los estudios sobre castración y reemplazo hormonal muestran que la administración de testosterona produce un aumento en la generación de T₃ hepática tanto en machos como en hembras. En tanto que la administración de progesterona no tiene efectos; sin embargo, la administración de estradiol en machos disminuye significativamente la generación de T₃ hepática, pero lo aumenta o no tiene efecto sobre la actividad DI en hembra (CUADRO 7). Estos datos sugieren que las diferencias de la actividad DI hepática está relacionada con el sexo y se deben al efecto estimulador de la

testosterona, con un posible efecto inhibitorio adicional de los estrógenos (Harris y col, 1979).

CUADRO 7. ACTIVIDAD DESYODATIVA Y HORMONAS ESTEROIDES

TRATAMIENTO	ACTIVIDAD 5'D	REFERENCIA
Hígado; Dexa (1.5 mg/kg)ip sacrif 24 h postrat	↓5' D-I	Kaplan y Utiger, 1978
T. Renis; Ct, Dexa, Cta	↓DI	Heyma y Larkins, 1982
Ratas recién nacidas corticost/7 días	Sin cambio I, II y III Hígado ↓ 5' D	Kaplan y Yaskoski, 1982
Hígado feto oveja; Infus. cte Ct 2.8-44.8 mg/24 h	↑5' D posible	Thomas y col, 1978
Hígado; ratas GnX Test 1 mg/20 días	↑5' D	Kaplan y Utiger, 1978
Hígado; ratas GnX Estradiol 0.3-1 ug/20 d	↓5' D mach ↑5' D hemb	Harris y col, 1979
Hígado; ratas GnX Prog 0.5 mg/100 g/20 d	↑5' D	Harris y col, 1979

Dexa, dexametasona; T Renis, tubulos renales; Ct, cortisol; Cta, corticosterona; Infus, Infusión; Cte, creciente; GnX, gonadectomía; Test, testosterona; Prog, progesterona; mach, macho; hemb, hembra.

4.3.4. Prolactina y Peces

En cuanto al efecto de la PRL sobre la actividad desyodativa en los peces, hasta donde sabemos, existe un solo estudio al respecto. El estudio consistió en administrar vía intraperitoneal (i.p.) extractos de PRL (57 ng/g peso) de diferentes especies (esturión, salmón, tilapia, rana, tortuga, avestruz, pavo, pato, rata y oveja) a anguilas y se evaluó la actividad desyodativa analizando el índice de conversión de 125 I-T4 a 125 I-T3 (T3*/T4*) en el suero. Las diferentes PRLs no modificaron esta actividad, con excepción de la PRL de origen ovino, que aumentó significativamente el índice T3/T4, el resto de las PRLs ensayadas no tuvo ningún efecto. Los autores sugieren que el efecto de la PRL ovina sobre la actividad desyodativa es heterosomatotrópica, probablemente debido a la homología estructural o molecular común con la GH (De Luze y col, 1989).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Como se ha revisado, la bioactividad de las TH depende de un mecanismo enzimático específico de desyodación periférica a partir del cual se genera la hormona activa T_3 o el isómero inactivo rT_3 . La vía de activación está catalizada por dos enzimas; la DI y la DII. La DI produce a la T_3 de exportación, mientras que la DII genera T_3 para uso local. El hígado de los mamíferos presenta actividad DI, la cual contribuye con alrededor del 70% de la T_3 circulante.

La información referente a la actividad 5'D en el hígado de los peces es escasa y contradictoria. Aún cuando se ha sugerido que este órgano contiene a las dos enzimas que catalizan la vía de activación, la presencia de la DI, la principal desyodasa hepática en el resto de los vertebrados, no es clara en el hígado de los teleosteos. Además, la descripción de la DII hepática ha resultado sorprendente ya que se trataría del único vertebrado adulto que presentara a este tipo enzimático en el hígado.

En todos los vertebrados, la función tiroidea se modifica ante cambios en las condiciones del medioambiente, tales como alteraciones en la temperatura, fotoperiodo, cambios estacionales, cambios en el aporte alimenticio, y otros. En el caso de los teleosteos, la función tiroidea también se modifica en respuesta a cambios en la osmolaridad del medio acuático. En esta respuesta como en otras, las HT actúan de una manera sinérgica o co-activa con otras hormonas y mensajeros del sistema.

En la regulación endócrina del balance hidrosmótico en los peces participan principalmente la PRL y el cortisol, además de otras hormonas como las tiroideas, la y la GH. Estas últimas sinergizan el efecto del cortisol y antagonizan el efecto de la PRL en los peces expuestos a medios hipertónicos, sin tener efecto aparente en aquellas especies expuestas a medios hipotónicos.

Por todo lo anterior, nosotros proponemos lo siguiente:

Hipotesis de trabajo:

La presencia de la actividad enzimática DII en el hígado de los peces permite el aporte necesario de T_3 para el uso local de éste órgano, mientras que la presencia de la DI pudiera activarse unicamente en estados fisiológicos específicos como serían los procesos de osmorregulación. Así, proponemos que la actividad DI está asociada a los cambios osmorregulatorios provocados por la tonicidad del medio externo, los cuales a su vez están modulados por otras hormonas.

Objetivos

1. Caracterizar la cinética de la vía 5'D y establecer los tipos enzimáticos presentes en el hígado de dos especies eurhalinas: la trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) y el fundulus (*Fundulus heteroclitus*)
2. Evaluar los cambios en la actividad 5'D hepática que ocurren durante un periodo de la ontogenia de la trucha arcoiris.
3. Evaluar el efecto del reto osmótico sobre la actividad 5'D hepática de la trucha arcoiris y el fundulus.

MATERIAL Y METODOS

Animales.

Oncorhynchus mykiss. Las truchas arcoiris empleadas en este trabajo tienen dos orígenes. Los organismos utilizados para la caracterización cinética y el estudio ontogenético se obtuvieron del criadero "El Zarco" situado en el estado de México. Para los experimentos de reto osmótico se utilizaron truchas de la planta de hidrobiología de la UAM-Iztapalapa. En ambos casos, los animales se alimentaron *ad libitum* con pellets comerciales.

Fundulus heteroclitus. Se utilizaron fundulus machos, de 2 a 5 gr de peso. Los organismos se colectaron en el río Matanzas en el estado de Florida, E.U.A., y posteriormente se mantuvieron en estanques con agua de mar, y alimentaron *ad libitum* con pellets comerciales en el Laboratorio Whitney de la Universidad de Florida.

En todos los casos, los animales fueron pesados y medidos (longitud fural) y se les disectó el hígado en frío, congelándolo inmediatamente en nitrógeno líquido para su posterior homogeneización con un Politron en amortiguador de Hepes 10 mM, sacarosa 25 mM, y pH 7.0, empleando una relación 1:10 peso/volumen. Los homogeizados se congelaron rápidamente en acetona - hielo seco y se almacenaron a -70°C para su análisis posterior.

Diseño Experimental

1. Caracterización Cinética de la Actividad 5'D Hepática.

Truchas. Se empleó un "pool" de homogeizados de hígado de 40 animales, cuyas edades abarcaron de 60 a 70 semanas y con un peso corporal 300 a 600 g. Este "pool" se fraccionó en alícuotas de 500 µl y se almacenó a -70 °C. La caracterización

cinética incluyó los siguientes parámetros: tiempo y temperatura de incubación, concentración óptima de proteínas, cinéticas respecto a la concentración de sustrato y cofactor, y sensibilidad al efecto inhibitorio selectivo de agentes como el PTU.

Fundulus. Para la caracterización cinética en esta especie se utilizaron tres diferentes "pools" de hígado de 10 individuos cada uno. Todos eran machos y su peso corporal osciló entre 2 y 5 g. La caracterización cinética incluyó los mismos parámetros que en el caso de la trucha.

2. Perfil Ontogénico de la 5'D Hepática en la Trucha

Para este estudio se utilizaron animales de un solo lote (n= 177). En el CUADRO 8 se muestran los datos biológicos de estos organismos. El estudio inició (primer muestreo) 30 días después del desalevinaje; es decir cuando los animales pesaban en promedio 2.4 ± 0.14 g, y comprendió 2 años para abarcar organismos sexualmente maduros (1422 ± 151 g). La colección de muestras fue inicialmente quincenal hasta que los organismos alcanzaron una edad de 5 meses y un peso corporal de 20 g. A partir de este momento y hasta el final del estudio, los muestreos se espaciaron a 30 días.

CUADRO 8. PERFIL ONTOGENICO. DATOS BIOLÓGICOS

SEMANAS	n	TALLA (cm) \pm EE	PESO (g) \pm EE
14-16	19	5.2 ± 0.1	3.7 ± 2.7
18-22	18	7.5 ± 0.2	7 ± 0.4
26-36	11	11.8 ± 0.4	25.3 ± 2.5
41-48	15	17.5 ± 0.6	82 ± 8
53-60	16	24.7 ± 0.5	250 ± 17
65-72	17	31.4 ± 0.5	502 ± 39
79-84	17	36 ± 1.2	769 ± 91

3. Reto Osmótico y Actividad Desyodativa.

La disponibilidad de dos especies de teleosteos eurihialinos que como ya se mencionó son capaces de habitar en ambientes con diferentes salinidades, permitió iniciar estudios encaminados a analizar la posible participación de las hormonas tiroideas en la instalación y/o mantenimiento de esta respuesta adaptativa.

Reto hiperosmótico. La trucha arcoiris es una especie cuyo hábitat natural es el agua dulce (AD). Sin embargo, por tratarse de una especie eurihalina, es capaz de tolerar cambios hiperosmóticos moderados, razón por la cual resulta un buen modelo para estudiar dicho reto. Se utilizaron 45 truchas arcoiris inmaduras de ~ de 15 cm y 100 gr de peso aclimatadas al AD. El día del experimento, las truchas se transfirieron a un medio hipertónico equivalente a 14 ‰ de agua de mar (5 ‰) y se sacrificaron a los 30 min, 1, 2, 4, 8, 12, 24 y 48 horas post traslado (n=5). También se sacrificó un grupo control (n=5/tiempo) que incluyó animales que permanecieron el AD. Al momento del sacrificio, los animales se anestesiaron (MS-222, 125 g/L), se sangraron (vena caudal) y se disectó el hígado. La sangre y el hígado se procesaron como se describió con anterioridad.

Reto hiposmótico. El fundulus es una especie cuyo hábitat natural es el agua de mar o salada (AS) (35 ‰). Sin embargo y debido a su condición eurihalina, es capaz de tolerar cambios hiperosmóticos significativos. Por esta razón se utilizó al fundulus como modelo para estudiar dicho reto. Se utilizaron 50 fundulus (2-5 gr peso). El día del experimento los animales se transfirieron a un medio hipotónico equivalente a 50-50 ‰ de AS-AD y se sacrificaron por grupos (n=5/grupo) a los 30 min, 1, 2, 4, 8, 12, 24 y 48 horas post traslado. También se sacrificó un grupo control (n=5) que incluyó animales que permanecieron el AS. Se disectó el hígado y se procesó como se describió con anterioridad. Este experimento se repitió dos años consecutivos (Agosto de 1995 y 1996).

Métodos.

Cuantificación de la actividad desyodativa. Esta actividad se analizó mediante la técnica de radioyodo liberado (Leonard y Rosemberg, 1980). En resumen, la técnica consiste en lo siguiente: Se utilizan como sustratos tironinas marcadas con ^{125}I de alta actividad específica (1200 mCi/mg, New England Nuclear Co). En tubos de ensayo se colocan 50 μl de homogeneizado con la cantidad de proteínas suficientes (previamente estandarizada) que se requieran con 50 μl de la mezcla radioactiva que contenga 2 nM de ^{125}I -rT₃ ó ^{125}I -T₄ (alrededor de 50 000 cpm) más la tironina correspondiente no marcada para completar la concentración final de sustrato requerida, y ditioneitol (DTT) como cofactor. Los tubos se incuban el tiempo requerido y a la temperatura óptima. La reacción se detiene por la adición de 50 μl de una solución que contiene suero normal bovino al 50% y 10 mM de PTU más 350 μl de ácido tricloroacético (TCA) al 10%. Se centrifuga en frío (4°C) a 3000 rpm por 10 min y el sobrenadante se cromatografía en una columna de intercambio catiónico Dowex W-50 X2 previamente equilibrada con ácido acético (Ac) al 10%. Se eluye con 2 ml de Ac y el eluido se cuenta en un contador gamma. La actividad enzimática se calcula mediante la cantidad de yodo radioactivo liberado con respecto a la cantidad total de sustrato por miligramo de proteína por hora (actividad específica). En todos los ensayos se incluyen dos pares de tubos sin proteínas con los cuales se calcula el porcentaje de yodo liberado no-específico.

FALTA PAGINA

No. 75

RESULTADOS.

1. Caracterización Clínica de la Actividad 5'D Hepática

Trucha. Para establecer las condiciones iniciales de ensayo se utilizaron 2 nM de uno u otro sustrato: 125 I-rT3 o 125 I-T4. Los ensayos se realizaron a un pH de 7.

Tiempos y temperatura de incubación. En el CUADRO 9, se muestran los porcentajes de actividad enzimática a 3 diferentes tiempos de incubación y con 3 diferentes concentraciones de proteína, utilizando como sustrato 125 I-rT3 (2 nM). Se puede observar que para las 3 concentraciones de proteína, el mejor tiempo de incubación es el de 60 min. Se utilizaron estos tiempos de incubación en base a la experiencia en el laboratorio ya que se ha encontrado que la actividad hepática es elevada y a ese tiempo aún se mantiene una relación lineal entre el tiempo de incubación y el porcentaje de actividad.

CUADRO 9. ACTIVIDAD 5'D HEPATICA. TIEMPOS DE INCUBACIÓN.

μ g proteína	15 min	30 min	60 min
500	2.6	8.5	13.5
60	0.9	2.0	4.0
20	---	0.8	1.5

Los valores corresponden al porcentaje de actividad de un ensayo.

La influencia de la temperatura de incubación se analizó ensayando una concentración fija de proteínas (100 μ g) e incubando a 0, 4, 12, 24 y 37 °C. Como se muestra en la FIGURA 8, la temperatura óptima de incubación para uno y otro sustrato es alrededor de la temperatura ambiente (24 °C).

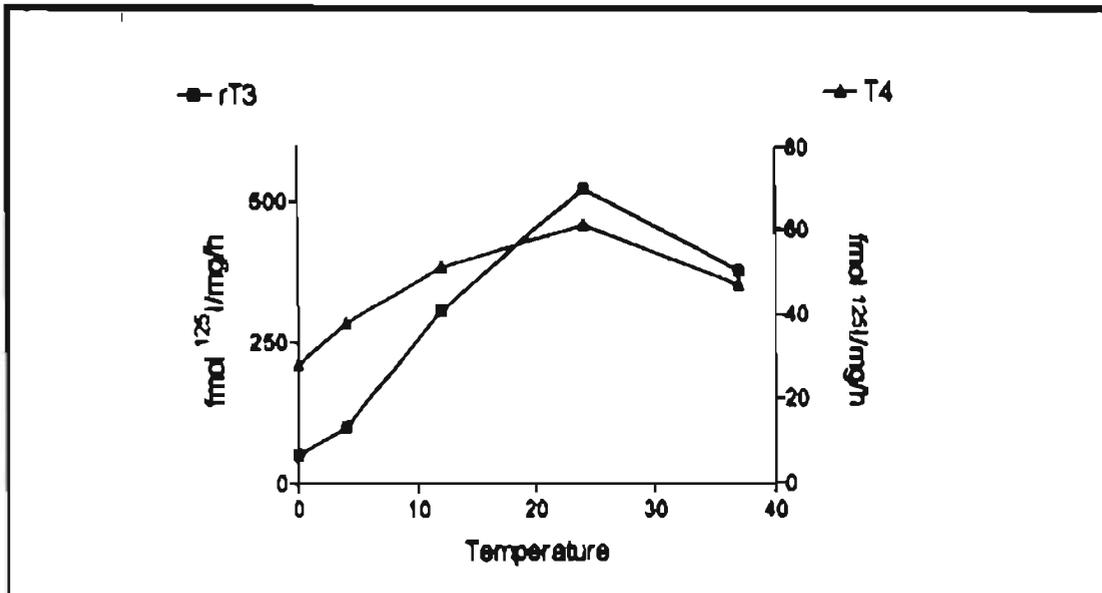


FIGURA 8. Efecto de la temperatura de incubación en la actividad desyodativa 5'D hepática de trucha. En el intervalo de 0-37 °C se determinó la temperatura óptima de incubación, usando 2 nM de ¹²⁵I-rT3 o de ¹²⁵I-T4, y 25 mM de DTT. Para ambos sustratos, la actividad enzimática fue mayor alrededor de la temperatura ambiente (24°C). Las incubaciones se hicieron por triplicado por 1 hr a pH 7.

Concentración de proteínas y cofactor. El efecto de la concentración de proteína a diferentes concentraciones de DTT y utilizando 2 nM de ¹²⁵I-rT3, se ilustra en la FIGURA 9. Se estudiaron 13 diferentes concentraciones de proteína cada una con 3 diferentes concentraciones de DTT. Se puede observar como para las tres concentraciones de DTT la actividad es lineal hasta alrededor de los 200 µg de proteína. Los ensayos subsiguientes se realizaron utilizando alrededor de 100 µg de proteína en la incubación.

Cinéticas de sustrato. Utilizando uno u otro sustrato, la reacción de desyodación se satura a concentraciones mucho más altas (2 órdenes de magnitud) cuando se usa rT₃ que T₄ (1µM vs 10 nM, respectivamente). Esto sugiere que la vía de desyodación de estos sustratos está catalizada por enzimas diferentes (FIGURA 10).

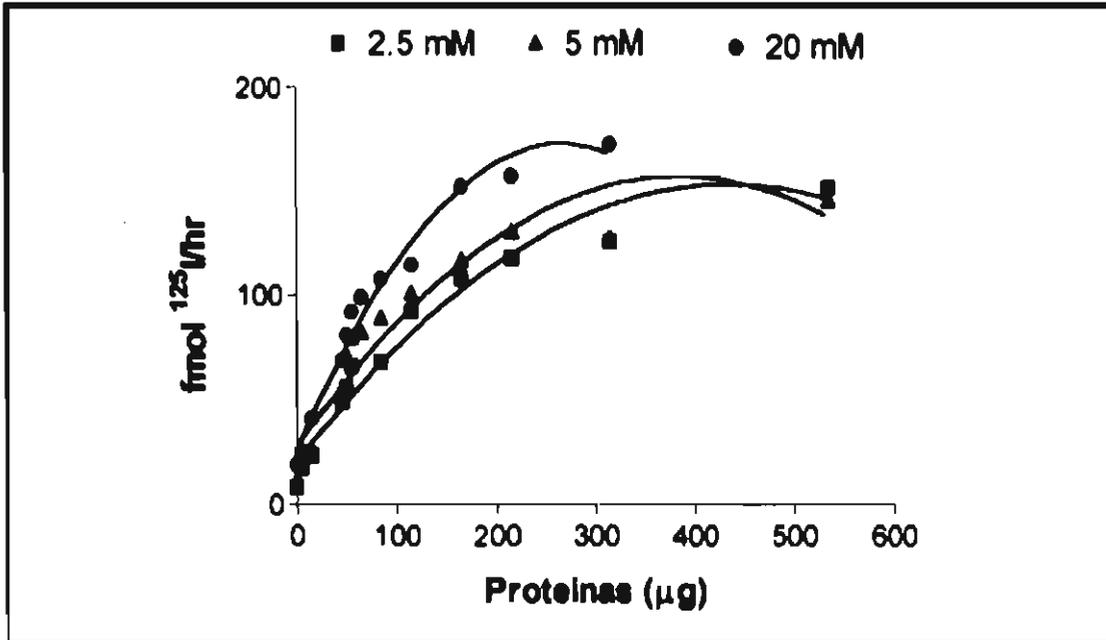


FIGURA 9. Concentración de proteína y DTT. Se ensayaron concentraciones de proteína de 15 a 550 µg/tubo y tres diferentes concentraciones de DTT (2.5, 5 y 20mM). Las incubaciones se hicieron por triplicado por 1 hr a 24 °C, utilizando ¹²⁵I-rT3 a pH 7.

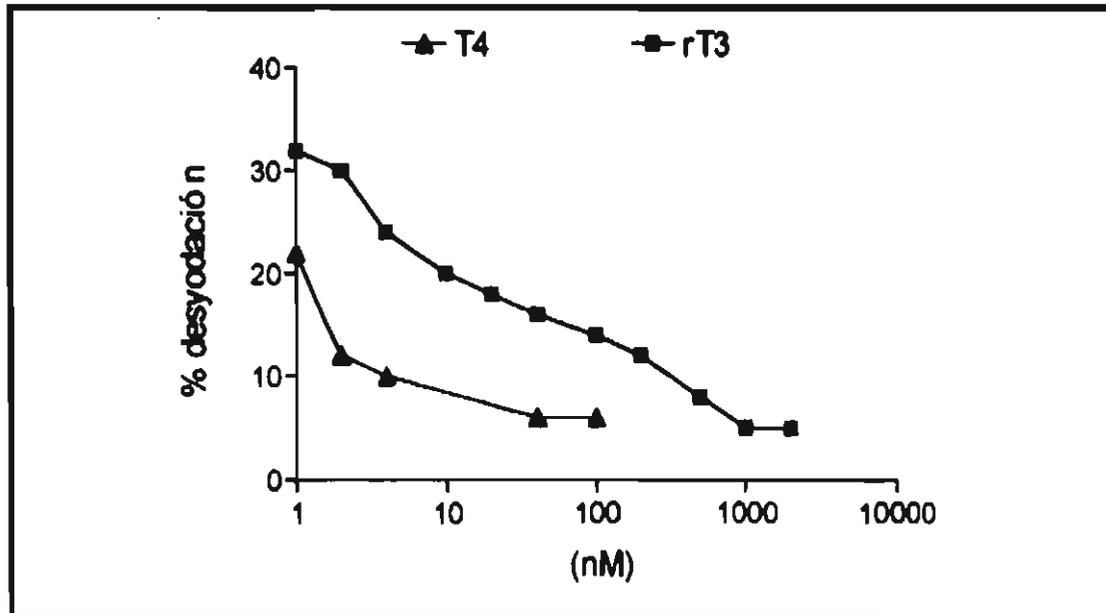


FIGURA 10. Efecto de la concentración del sustrato en la desyodación de ¹²⁵I-rT3 o de ¹²⁵I-T4 en homogeneizados de hígado de trucha. Se ensayó un amplio intervalo de concentraciones de rT₃ y T₄ (0.5-2000 nM) con 25 mM de DTT, ~100 µg de proteína y 2 nM de ¹²⁵I-rT3 o de ¹²⁵I-T4.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Así, y basandonos en los resultados iniciales, se corrieron cinéticas completas usando un intervalo amplio de rT₃ (0.5 a 2000 nM). Estos ensayos se incubaron a diferentes temperaturas (12, 24 y 37 °C) y se utilizaron a concentraciones altas de DTT (25 mM) con la idea de poder distinguir más de una vía enzimática. Como se muestra en la FIGURA 11, la enzima parece ser más eficiente a temperaturas cercanas a la fisiológica en la trucha (24 °C). A esta temperatura, el análisis de los resultados utilizando el método de Eadie-Hofstee (FIGURA 12) claramente muestra dos componentes, sugiriendo la presencia de dos enzimas que catalizan la desyodación de rT₃ en el hígado de la trucha arcoiris. El cálculo de las constantes de Michaelis-Menten mostró que uno de los componentes tiene una Km para rT₃ de 180 nM con Vmax de 28 pmol ¹²⁵I/mg/hr, mientras el otro componente tiene una Km ~200 veces menor (0.8 nM) con Vmax de 0.2 pmol ¹²⁵I/mg/hr.

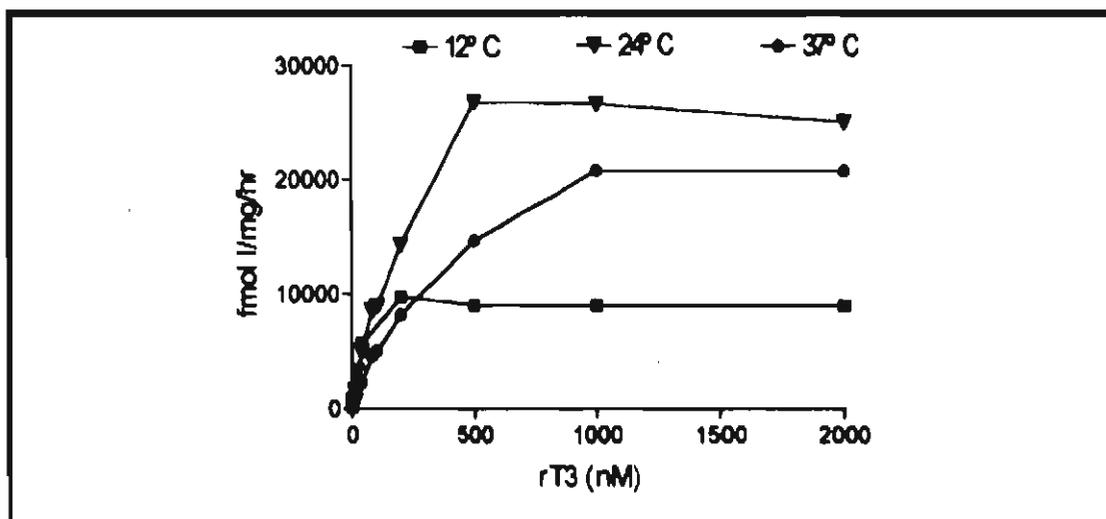


FIGURA 11. Cinética de la desyodación 5'D de rT₃ en homogeneizados de hígado de trucha. Efecto de la temperatura en la reacción. Gráfica de velocidad - sustrato a las temperaturas indicadas. El ensayo incluyó una solución isotópica de 0.5 nM de ¹²⁵I-rT₃, concentraciones crecientes de rT₃ y 25 mM de DTT. Las incubaciones se hicieron por triplicado por 1 hr a pH 7.

También se realizó la caracterización cinética utilizando T₄ en concentraciones de 0.5 a 9 nM T₄ en soluciones isotópicas, con diferentes concentraciones de DTT (15, 25 y 35 mM). En la FIGURA 13 se muestra la cinética de sustrato con 25 mM de DTT. La mayor actividad se encuentra ~1 nM de T₄, y se satura a partir de 3 nM. El cofactor

solo modifica la actividad enzimática cuando se utiliza la concentración de 1nM de T4 siendo la concentración óptima de este, 25 nM. Al analizar estos resultados por el método de Eadie-Hofstee y en contraste con lo que ocurre al utilizar rT₃, se observó un solo componente, con una Km y Vmax de 0.63 nM y 200 fmol ¹²⁵I/mg/h respectivamente (FIGURA 14).

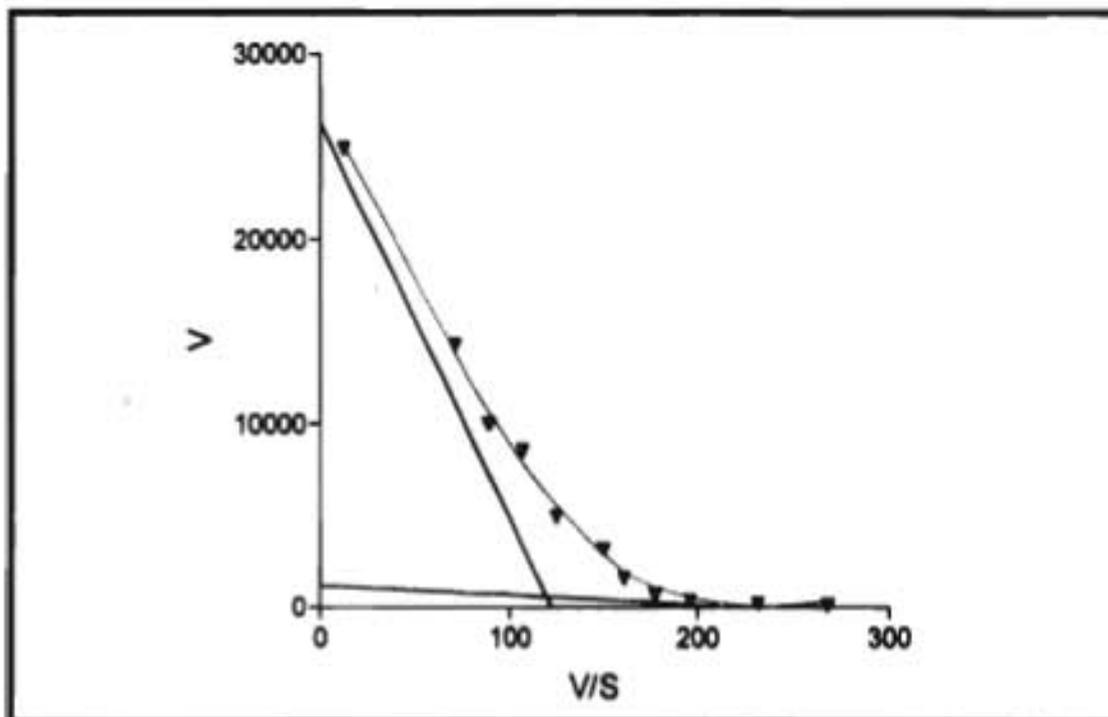


FIGURA 12. Cinética de la desiodación 5'D de rT₃ en homogeneizados de hígado de trucha. Análisis por el método de Eadie-Hofstee de los resultados obtenidos de la cinética de sustrato (rT₃ de 0.5 a 2000 nM) con 25 nM de DTT e incubada a 24 °C en homogeneizados de hígado de trucha. Se obtuvieron dos componentes con valores de Km y Vmax de 180 y 8 nM y 28 y 2 pmol ¹²⁵I/mg/h, respectivamente.

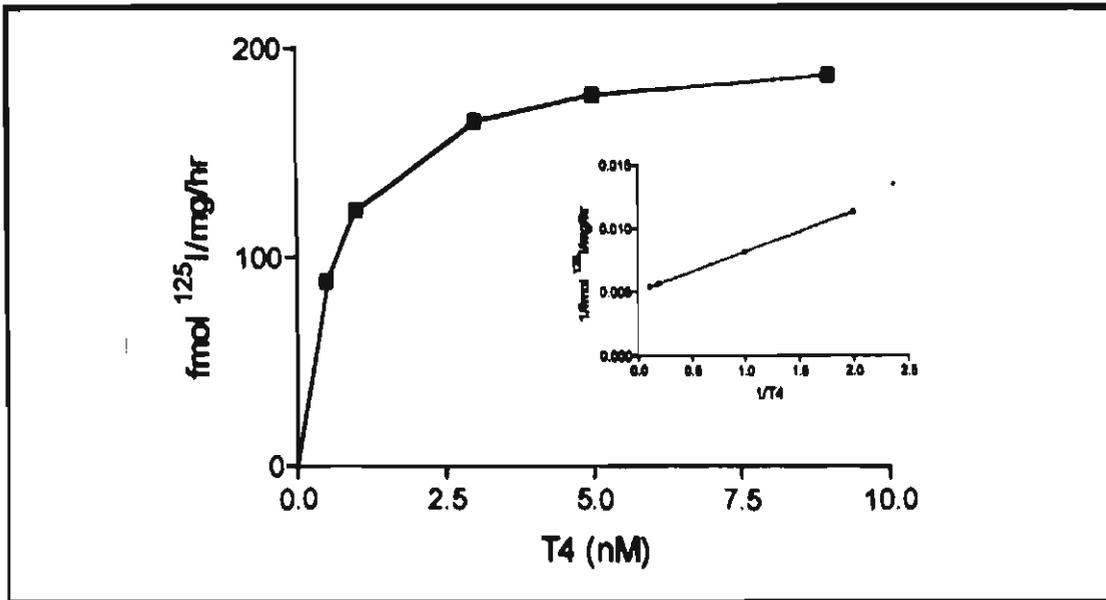


FIGURA 13. Cinética de la desyodación T_4 -5'D en homogeneizados de hígado de trucha. *inserto*: Gráfica de doble recíproca de los mismos datos. Gráfica de velocidad - sustrato. El ensayo incluyó una solución isotópica de 0.5 nM de 125 I- T_4 , concentraciones crecientes de T_4 (0.5-9 nM) y 25 mM de DTT. Las incubaciones se hicieron por triplicado por 1 hr a pH 7.

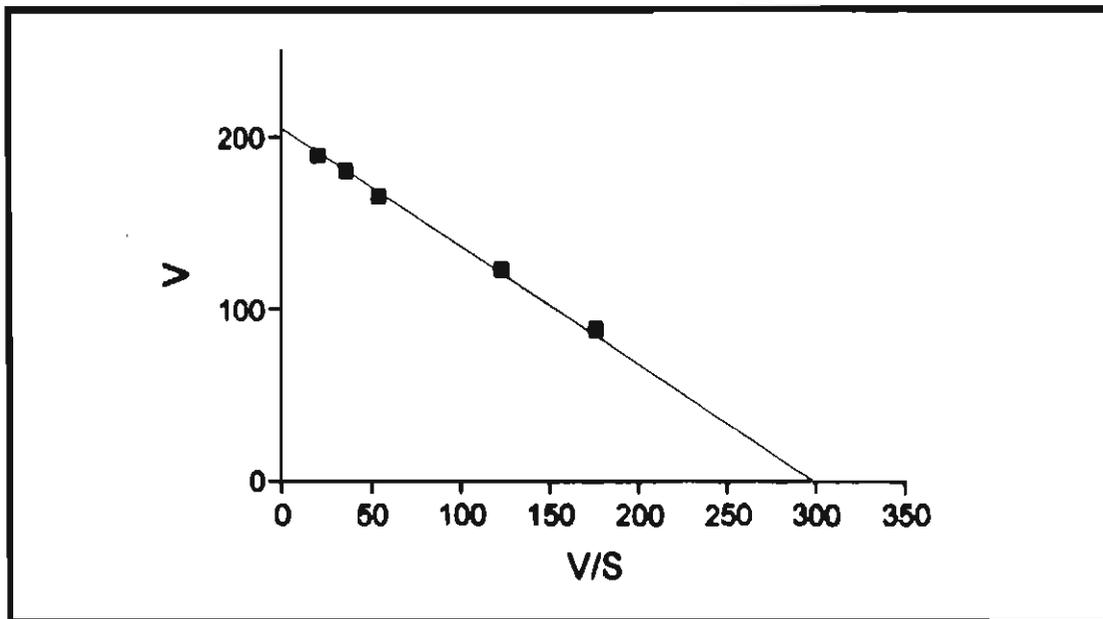


FIGURA 14. Cinética de la desyodación T_4 -5'D en homogeneizados de hígado de trucha. Gráfica de Eadie-Hofstee. El ensayo incluyó una solución isotópica de 0.5 nM de 125 I- T_4 , concentraciones crecientes de T_4 (0.5-9 nM) y 25 mM de DTT. Las incubaciones se hicieron por triplicado por 1 hr a pH 7.

Efecto del cofactor (DTT) sobre la actividad 5'D. El efecto del DTT sobre la actividad 5'D utilizando 200 nM de rT₃ o de 1 nM de T₄ se muestra en la FIGURA 15. En los ensayos con ¹²⁵I-T₄ como sustrato se utilizó además 1 mM de PTU para bloquear a la actividad DI. Los resultados muestran claramente que cuando se utiliza rT₃ como sustrato, la actividad desyodativa no se modifica con las concentraciones crecientes de DTT. En contraste, cuando se utiliza T₄, la actividad 5'D es proporcional a la concentración de cofactor hasta los 25 mM. Estos resultados confirman la presencia de los dos sistemas enzimáticos en el hígado de la trucha, uno de los cuales tiene un requerimiento significativamente mayor (~ 10 veces) de cofactor.

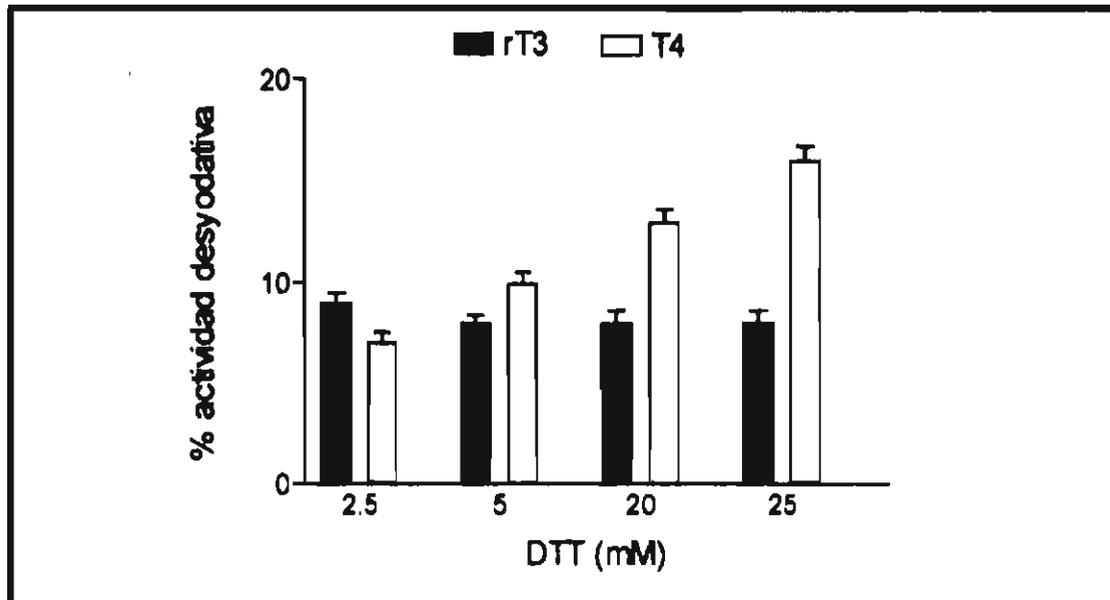


FIGURA 15. Efecto del DTT sobre la actividad 5'D hepática usando ¹²⁵I-rT₃ y ¹²⁵I-T₄ como sustratos en homogenizados de hígado de trucha. El ensayo se realizó utilizando una solución isotópica de 200 nM ¹²⁵I-rT₃ o 1 nM de ¹²⁵I-T₄ a las concentraciones indicadas de DTT. Cada barra representa el promedio ± EE del porcentaje de las cuentas totales de radioyodo liberado (n=3).

Efecto del PTU. Este parámetro se determinó con ensayos usando rT₃ y T₄ como sustratos con su respectivo requerimiento de cofactor y en presencia de 1 ó 10 mM de PTU. Los resultados muestran (FIGURA 16) que mientras la actividad T₄-5'D es insensible a la inhibición por PTU, la actividad rT₃-5'D se inhibió ~ 45 y 80% con 1 y 10 mM respectivamente. En apoyo a lo anterior, en la FIGURA 17 se muestra una cinética

de sustrato en presencia o no de 1 mM de PTU. Se puede observar que el PTU tiene un mayor efecto inhibitorio a concentraciones mayores de sustrato, mientras que a concentraciones bajas no tiene efecto.

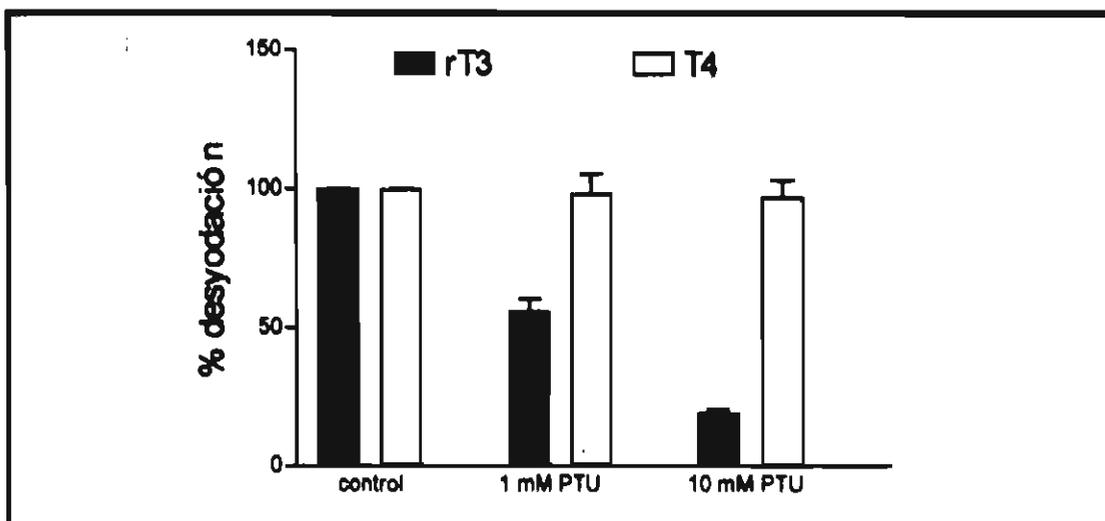


FIGURA 16. Efecto del PTU sobre la actividad rT3- y T4-5'D hepática. Se incubó utilizando una solución isotópica de 200 nM rT3 con 5 mM de DTT y otra de 2 nM de ¹²⁵I-T4 con 25 mM de DTT a las concentraciones de PTU indicadas. Cada barra representa el promedio ± EE del porcentaje de las cuentas totales de radioyodo liberado (n=3).

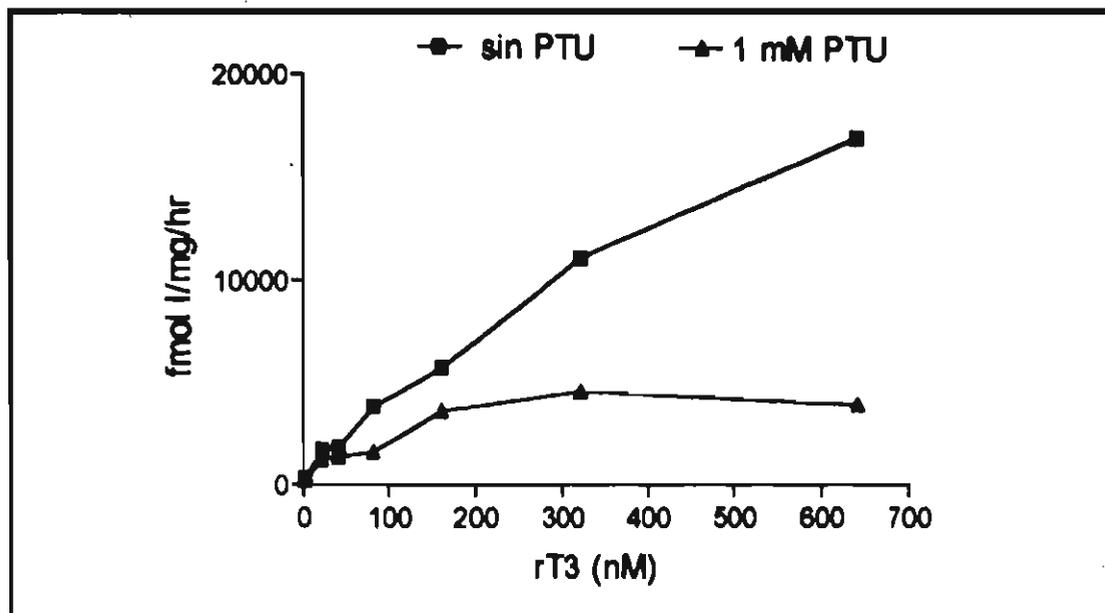


FIGURA 17. Cinética de sustrato (rT3) y el efecto del PTU: La cinética de rT3 (0.5-650 nM) se ensayó con (1 mM) y sin de PTU, 25 mM de DTT y las condiciones descritas para los otros ensayos.

Condiciones óptimas de ensayo. Las condiciones óptimas para cuantificar de manera confiable la actividad 5'D hepática en la trucha arcoiris se establecieron tomando en cuenta los resultados obtenidos en la caracterización de las enzimas. El CUADRO 10 resume estas condiciones de ensayo.

CUADRO 10. CONDICIONES ÓPTIMAS DE ENSAYO PARA CUANTIFICAR LA ACTIVIDAD DI Y DII HEPÁTICA EN LA TRUCHA

	DI	DII
Sustrato	rT3	T4
Concentración de sustrato	200 nM	1 nM
Concentración de DTT	5 mM	25 mM
Concentración de PTU	----	1 mM
Concentración de proteínas	100 µg/tubo	100 µg/tubo
Tiempo de incubación	1 hr	1 hr
Temperatura de incubación	24 °C	24 °C

Fundulus. La caracterización cinética de la vía 5'D hepática en el fundulus incluyó los mismos parámetros que la caracterización de su contraparte en la trucha (tiempo y temperatura óptimas de incubación, concentración óptima de proteínas, cinéticas respecto a sustrato y cofactor y el efecto inhibitorio selectivo de factores como el PTU). Debido a la similitud de algunos de los resultados en las dos especies, en esta sección solo se describen en detalle los experimentos en los cuales se encontraron diferencias. Así, para establecer las condiciones iniciales de ensayo se utilizó también 2 nM de ¹²⁵I-rT3 y ¹²⁵I-T4 como sustratos. Los ensayos se realizaron a un pH de 7.

Concentración de proteínas. Se ensayaron diferentes concentraciones de proteína (1 a 500 µg) utilizando una sola concentración de DTT (25 mM). Se puede

observar (FIGURA 18) que la actividad es lineal hasta alrededor de los 60 μg de proteína. En los ensayos subsiguientes se utilizaron entre 20 y 50 μg de proteína.

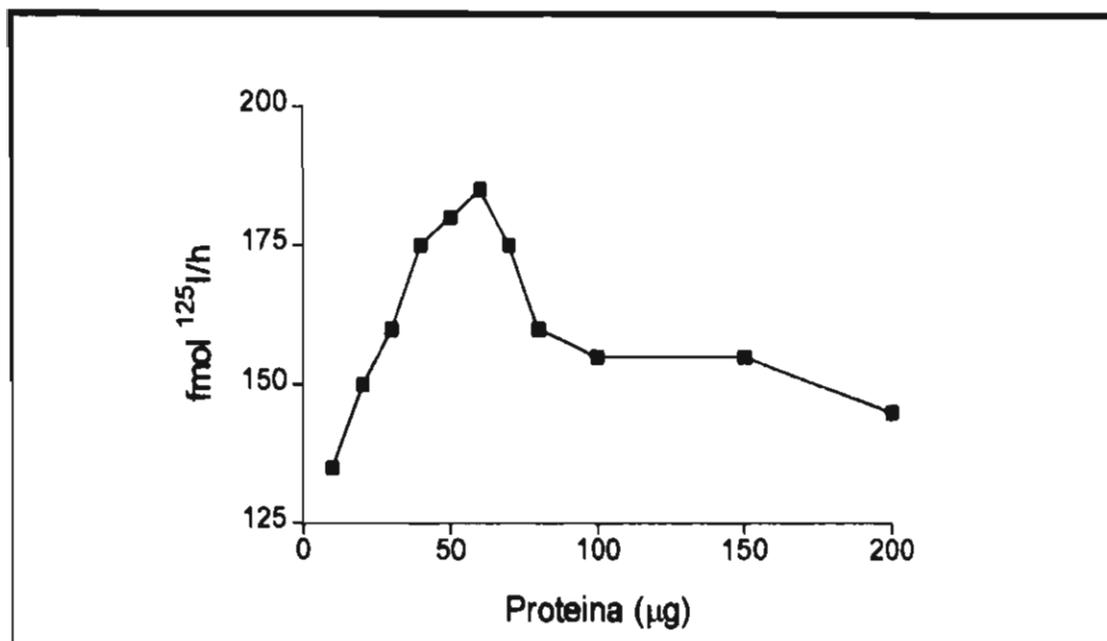


FIGURA 18. Concentración óptima de proteína en el ensayo de la actividad 5'D en homogeneizados de hígado de fundulus. La concentración óptima de proteína se ensayó probando un rango de proteína de 1 a 500 μg /tubo, con 25 mM de DTT. Las incubaciones se hicieron por triplicado por 1 hr a 24 °C, utilizando ¹²⁵I-rT₃ a pH 7.

Temperatura de incubación: La FIGURA 19 muestra una correlación directa entre actividad enzimática y temperatura de incubación hasta los 30 °C. A partir de esta temperatura y hasta los 40 °C la actividad no se modifica. Por conveniencia, los ensayos subsiguientes se incubaron a 37 °C.

Cinéticas de sustrato. Así, y basándonos en los resultados iniciales, se corrieron cinéticas completas usando un intervalo amplio de rT₃ y T₄ (0.5 a 1000 nM) a concentraciones altas de DTT (25 mM). Como en el caso de la actividad 5'D hepática en trucha, la saturación de la desyodación ocurre a concentraciones significativamente mayores (1 μM vs 10 nM) con rT₃ que con T₄ (FIGURA 20). Sin embargo, en homogeneizados de fundulus y utilizando concentraciones bajas de T₄, los porcentajes

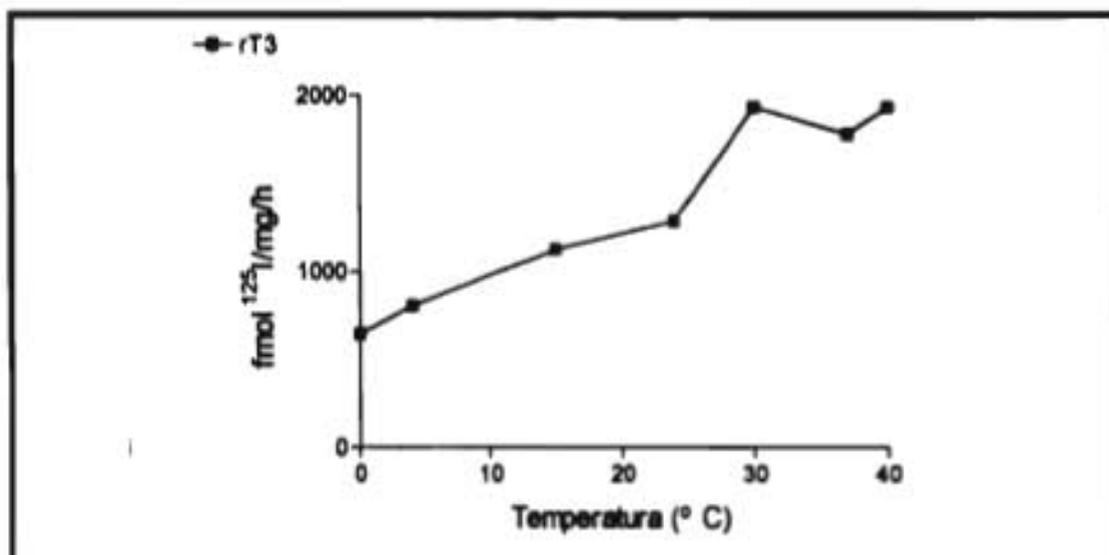


FIGURA 19. Efecto de la temperatura sobre la actividad 8'D hepática de fundulus. Los ensayos se realizaron con $-5 \mu\text{g}$ de proteína, 25 mM de DTT y 2 nM de $^{125}\text{I-rT3}$, incubando a las temperaturas indicadas. La temperatura óptima de incubación en el ensayo parece variar entre los 30 y los $40 \text{ }^\circ\text{C}$.

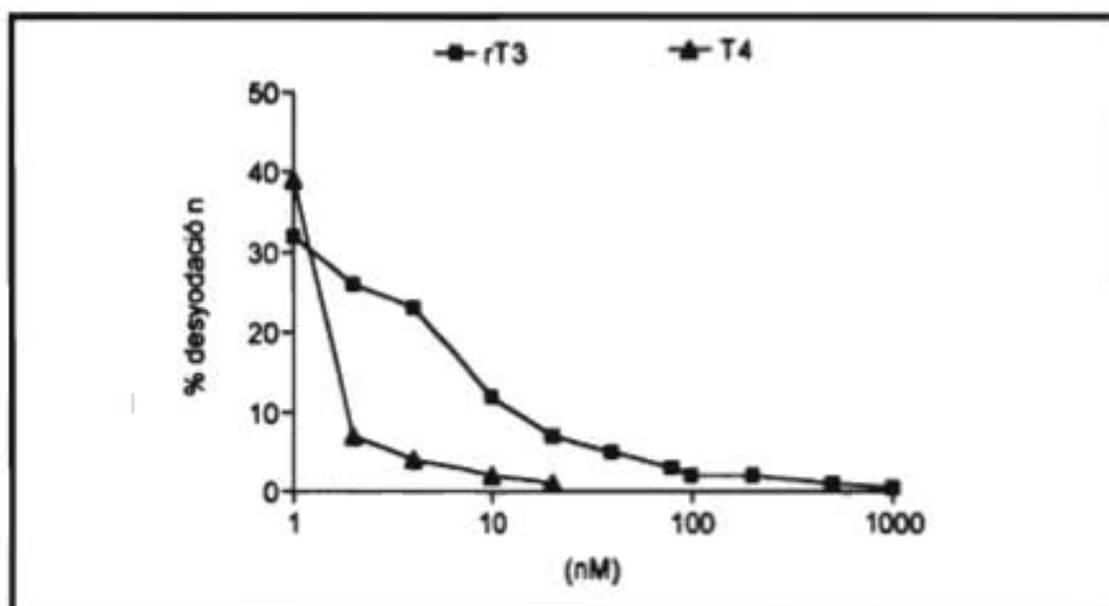


FIGURA 20. Efecto de la concentración del sustrato en la desyodación de $^{125}\text{I-rT3}$ o de $^{125}\text{I-T4}$ en homogeneizados de hígado de fundulus. Se ensayaron concentraciones de rT_3 y T_4 de 0.5 a 2000 nM , con 25 mM de DTT, $-5 \mu\text{g}$ de proteína y 2 nM de $^{125}\text{I-rT3}$ o de $^{125}\text{I-T4}$, incubando por 1 h a $37 \text{ }^\circ\text{C}$.

Como en la trucha, en el fundulus, la cinética con rT_3 (Eadie-Hofstee, FIGURA 21) sugiere la presencia de dos enzimas que catalizan la vía 5'D hepática. Uno de los componentes tiene una K_m para rT_3 de 93 nM con V_{max} de 36 pmol 125 I/mg/hr, mientras el otro componente tiene una K_m para rT_3 más baja (1.3 nM) con V_{max} de 2.5 pmol 125 I/mg/hr.

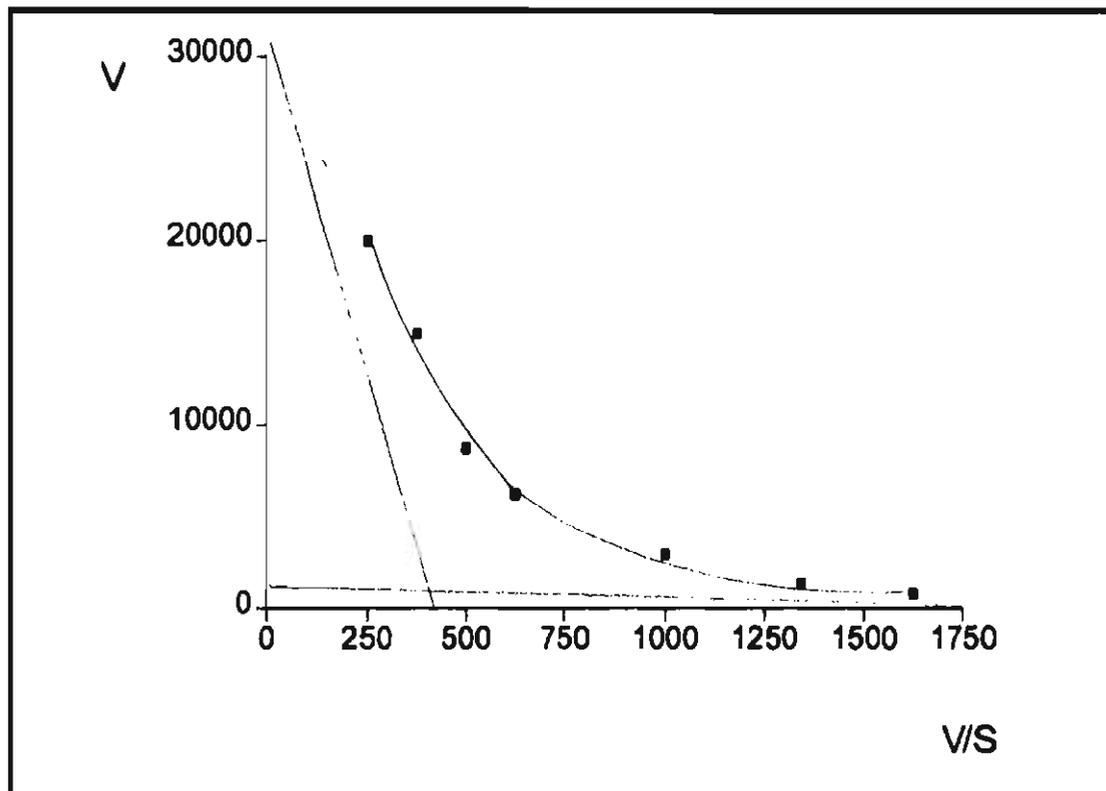


FIGURA 21. Cinética de la desyodación 5'D de rT_3 en homogenizados de hígado de fundulus. Análisis por el método de Eadie-Hofstee de los resultados obtenidos de la cinética de sustrato (rT_3 de 0.5 a 2000 nM) con 25 mM de DTT e incubada a 37 °C en homogenizados de hígado de fundulus. Se obtuvieron dos componentes con valores de K_m y V_{max} de 93 y 1.3 nM y 36 y 2.5 pmol 125 I/mg/h, respectivamente

La caracterización cinética utilizando T_4 (FIGURA 22) muestra un solo componente enzimático con constantes de Michaelis-Menten calculadas de: K_m de 1 nM y V_{max} de 0.860 pmol 125 I/mg/hr.

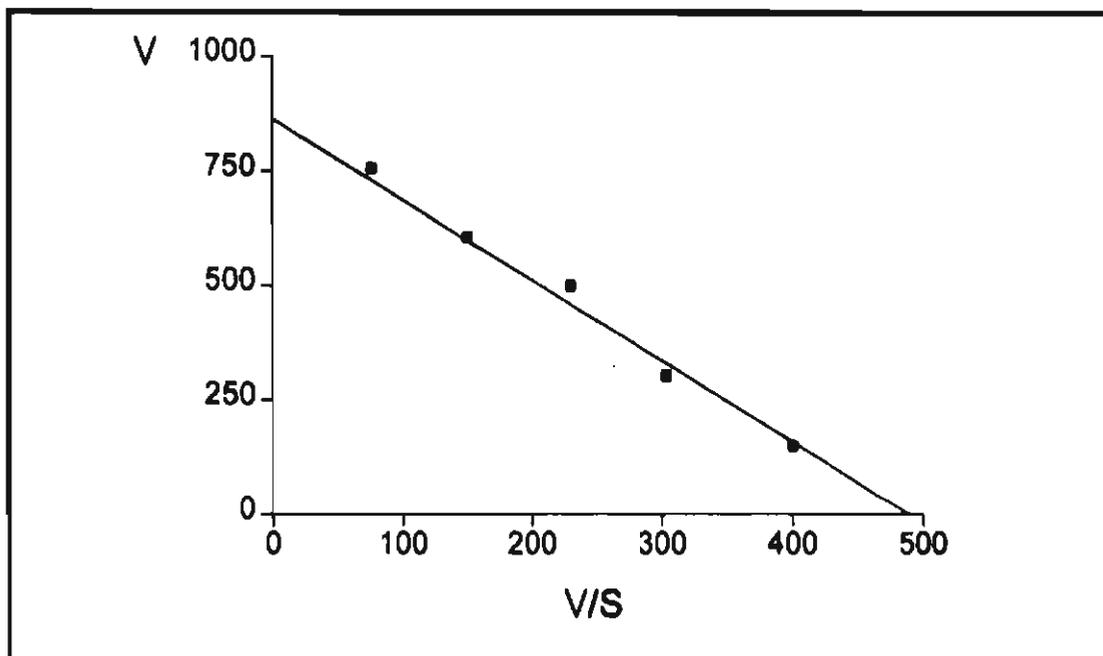


FIGURA 22. Cinética de la desyodación T_4 -5'D en homogeneizados de hígado de fundulus. Gráfica de Eadie-Hofstee. Se usó una solución isotópica de 0.5 nM de ^{125}I - rT_4 (0.5-20 nM) y 25 mM de DTT. Las incubaciones se hicieron por triplicado por 1 hr a 37°C y pH.

Condiciones óptimas de ensayo. Las condiciones óptimas para determinar confiablemente la actividad 5'D hepática en el fundulus se establecieron tomando en cuenta los resultados obtenidos en la caracterización cinética. En el CUADRO 11 se encuentran resumidas estas condiciones de ensayo.

CUADRO 11. CONDICIONES ÓPTIMAS PARA CUANTIFICAR LA ACTIVIDAD DI Y DII EN EL HIGADO DEL FUNDULUS HETEROCLITUS

	Tipo I	Tipo II
Sustrato	rT3	T4
Concentración de sustrato	100 nM	1 nM
Concentración de DTT	5 mM	25 mM
Concentración de PTU	----	1 mM
Concentración de proteínas	5 µg/tubo	5 µg/tubo
Tiempo de incubación	1 hr	1 hr
Temperatura de incubación	37 °C	37 °C

2. Perfil ontogénico de la 5'D hepática en la trucha

Utilizando las condiciones óptimas de ensayo se prosiguió a realizar el estudio ontogénico de la DI y DII. Los resultados de la actividad desyodativa se muestran en la FIGURA 23, en donde se muestra que el perfil temporal de la actividad hepática DI y DII de las 14 a las 84 de edad es diferencial. Al inicio del estudio, ambas actividades son bajas hasta las 41-48 semanas en donde ambas presentan un incremento significativo. Posteriormente, la actividad DI disminuye a las 53-60 semanas de edad y presenta un segundo incremento en las semanas 65-72 que se sostiene hasta la semanas 79-84. La actividad DII se mantiene elevada de la semana 41-48 hasta la 65-72, disminuyendo significativamente en la semanas 79-84.

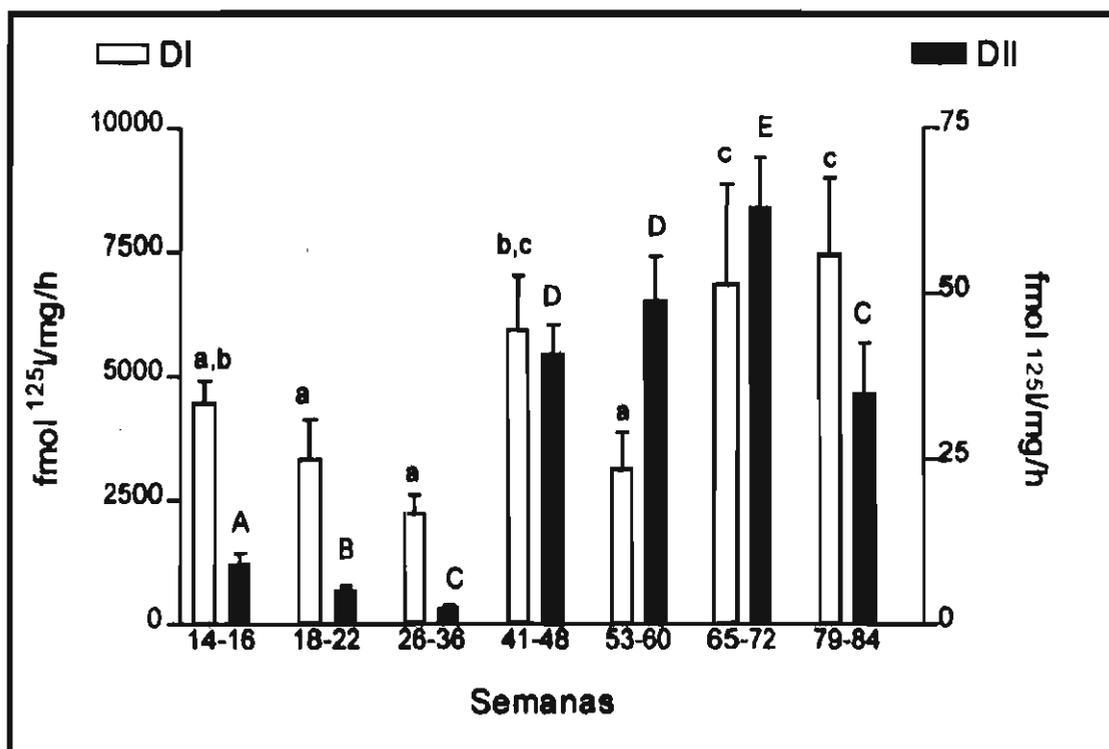


FIGURA 23. Cambios ontogénicos de la actividad DI y DII hepática en la trucha. Todas las muestras se trabajaron, para cada enzima, en dos ensayos empleando ~ 100 µg de proteína/tubo, e incubados 1 h a 24 °C. DI se ensayó usando una solución isotópica (200 nM) de rT₃ y 5 mM de DTT. DII se ensayó con 1 nM de ¹²⁵I-T₄, 25 mM de DTT y 1 mM PTU. Los resultados corresponden al promedio ± EE (la n para cada grupo varió de 11 a 19 animales como se indica en el CUADRO 8). Los análisis estadísticos (ANOVA de una vía) mostraron diferencias significativas entre los grupos.

3. Reto Osmótico y actividad desyodativa hepática.

Reto hiperosmótico. Las truchas fueron transferidas a 14 % de AS y sacrificadas a los tiempos que se indican en la FIGURA 24. Utilizando las condiciones óptimas de ensayo se prosiguió a realizar la medición de la actividad DI y DII. Los resultados mostraron un decremento en la actividad DI a las 12 h post-traslado (PT). Este decremento fue transitorio ya que la actividad recuperó sus niveles basales a las 24 h PT (FIGURA 24, panel superior). En contraste, la DII mostró decrementos significativos (ANOVA de una vía) a las 8 horas PT que se sostuvieron hasta las 24 h PT. La recuperación total de la actividad se observó a las 48 h PT.

Reto hiposmótico. Los fundulus se transfirieron de 100 % AS a 50 % AD-AS y se sacrificaron a los tiempos que se indican en la FIGURA 25. Mientras que la actividad DI no mostró cambios significativos (panel superior), la DII hepática se elevó significativamente (ANOVA de una vía) a las 12 h PT, incremento que se sostuvo hasta las 48 h PT.

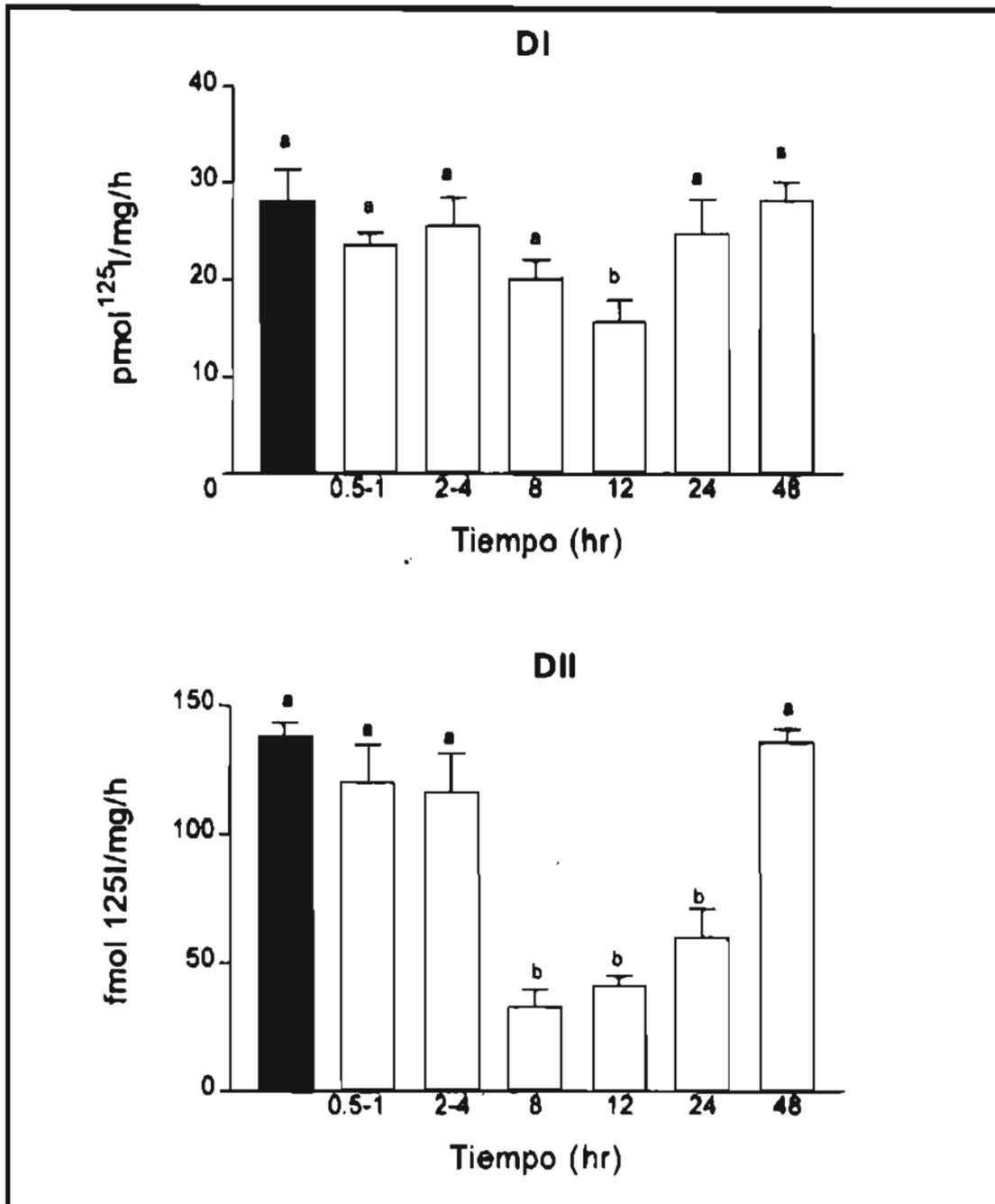


Figura 24. Efecto del reto hiperoamótico sobre la actividad DI y DII hepática. Las truchas fueron transferidas a 14 % de AS y sacrificadas a los tiempos que aquí se indican. La DI muestra un decremento transitorio a las 12 h post-transferido (PT) (panel superior), mientras que DII (panel inferior) mostró decrementos significativos (ANOVA de una vía) a las 8 horas (PT). La recuperación total de la actividad se observó a las 48 h PT. Los ensayos se realizaron con ~ 70 µg de proteína/tubo, incubando 1 h a 24 °C. DI se ensayó usando una solución isotópica (200 nM) de rT₃ y 5 mM de DTT. DII se ensayó con 1 nM de ¹²⁵I-T₄, 25 mM de DTT y 1 mM PTU. Los resultados corresponden al promedio ± EE (n=5).

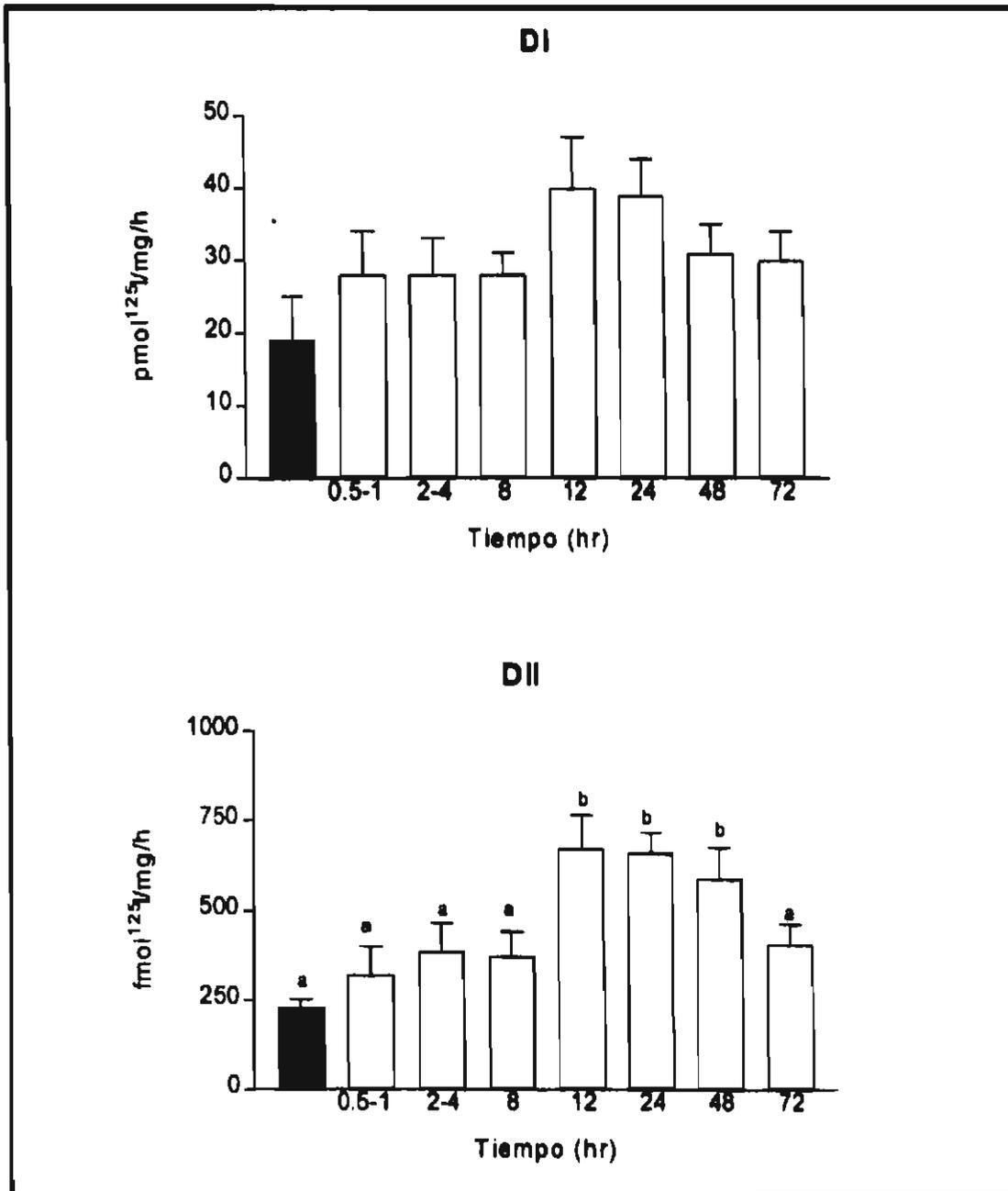


Figura 25. Efecto del reto hiperosmótico sobre la actividad DI y DII hepática. Los fundulus fueron transferidas de 100% AS a 50% AD- AS y sacrificadas a los tiempos que aquí se indican. La DI no se modificó con el traslado (panel superior), mientras que DII (panel inferior) mostró incrementos significativos (ANOVA de una vía) a las 12 horas PT que se sostuvieron hasta las 48 h PT. Los resultados corresponden al promedio \pm EE de dos experimentos realizados en dos diferentes años (Agosto de 1995 y 1996), (n=11). Los ensayos se realizaron con $\sim 30 \mu\text{g}$ de proteína/tubo, incubando 1 h a 37°C . DI se ensayó usando una solución isotónica (200 nM) de rT_3 y 5 mM de DTT. DII se ensayó con 1 nM de $^{125}\text{I}-T_4$, 25 mM de DTT y 1 mM PTU.

DISCUSION.

1. Caracterización Cinética de la Actividad 5'D Hepática.

La presencia de dos enzimas que catalizan la vía 5'D o de activación en el hígado de teleosteos fue sugerida en 1992 (MacLachy y Eales); sin embargo, en esos estudios únicamente se utilizó T_4 como sustrato. Este es el primer trabajo en el cual se utiliza rT_3 en la caracterización cinética de la vía 5'D en el hígado de los teleosteos y se muestra claramente la presencia de dos enzimas que catalizan esta vía. Los resultados muestran que desde el punto de vista operacional, estas enzimas exhiben características cinéticas semejantes a las de sus contrapartes DI y DII de mamífero y del resto de los vertebrados. Así, el hígado de la trucha y el fundulus contienen una enzima cuyo sustrato preferencial *in vitro* es la rT_3 con K_m alta (180 y 93 nM, respectivamente). Esta enzima es relativamente sensible a inhibición por PTU, tiene un requerimiento bajo (5 mM) de cofactor y presenta una V_{max} de 28 y 36 $\text{pmol}^{125} \text{I} / \text{mg/hr}$ en la trucha, y el fundulus, respectivamente. Todas estas características cinéticas son comparables a las descritas para la DI de mamíferos (St Germain, 1994). Además, el hígado de la trucha y el fundulus también contienen otra enzima que, al igual que la DII de mamíferos y otros vertebrados, tiene como sustrato preferencial a la T_4 con una K_m baja (0.63 y 1 nM respectivamente). Esta otra enzima es resistente a inhibición por PTU, tiene un requerimiento alto (25 mM) de cofactor y tiene una V_{max} de 200 $\text{fmol}^{125} \text{I} / \text{mg/hr}$ en la trucha y de 860 $\text{fmol}^{125} \text{I} / \text{mg/hr}$ en el fundulus. Es importante notar que la actividad DII hepática es significativamente mayor (~3 veces) en la especie marina (fundulus) que en la de agua dulce (trucha), y que su presencia en el hígado de estos teleosteos resulta de gran interés ya que se trata del único grupo de vertebrados que contiene a esta enzima en el hígado adulto. En este mismo contexto y como se discute más adelante, también es importante destacar que hasta la fecha los únicos tejidos de vertebrado adulto que contienen ambas enzimas son la corteza cerebral y la hipófisis (Köerle y col, 1991).

Aunque la DI descrita en mamífero y la que aquí se reporta son esencialmente similares, la enzima de teleosteo presenta algunas características propias que seguramente son de importancia fisiológica. Así, la DI de pez es un orden de magnitud más eficiente para desyodar rT_3 que T_4 . Esta peculiaridad muestra que el uso exclusivo de T_4 no permite evaluar la presencia de una enzima con K_m alta de manera confiable, y ofrece una explicación parcial para la actividad total baja (Vijayan y col, 1988; Morin y col, 1993) y ultra baja (Mac Latchy y Eales, 1992) previamente descritas en el hígado de estos organismos.

Otra característica particular de la DI de teleosteos consiste en su menor sensibilidad para ser inhibida por PTU. Se sabe que 1 mM de este agente es suficiente para bloquear por completo la actividad DI en mamíferos (Köerle y col, 1991), sin embargo, esta concentración solo inhibió alrededor del 45% de la actividad en el hígado de pez. Esta resistencia se ha documentado previamente en otros teleosteos (Shields y Eales, 1986; Byamungu y col, 1992; Mac Latchy y Eales, 1992; Mol y col, 1992) y posiblemente refleja diferencias estructurales en la proteína. Esta posibilidad encuentra mayor apoyo por resultados en nuestro laboratorio en los cuales no se encontró hibridación de la sonda de cDNA de la DI de hígado de rata con RNA total de hígado de trucha (Orozco et al, observaciones no publicadas).

Con las reservas del caso puesto que no conocemos la concentración real de la enzima, los resultados muestran que a concentraciones óptimas de sustrato y cofactor el nivel de enzima funcional (V_{max}) para la DI de trucha y de fundulus, es menor que el reportado en el hígado de rata (~ de 40 y 30 veces, respectivamente). Más aún, la tasa V_{max}/K_m , que es un reflejo de la eficiencia catalítica, resultó en 0.1, 0.4 y 5 para la DI hepática en trucha, fundulus y rata respectivamente. Esto sugiere que con una afinidad similar para el sustrato (K_m), la DI de peces es menos eficiente.

En contraste, la V_{max} y la tasa V_{max}/K_m para la DII de hígado de trucha es 6 y 20 veces mayor que la reportada en el cerebro de la rata, sugiriendo que la DII presente en el hígado de la trucha es una enzima muy abundante y/o muy eficiente. Especialmente singular es la DII hepática de *fundulus*, cuya V_{max} y tasa V_{max}/K_m resultaron 4 y 3 más altas que las de la enzima hepática de trucha, y 24 y 54 más altas que las reportadas para cerebro de rata. En base en lo anterior, posteriormente utilizamos hígado de ésta especie para la clonación y expresión exitosa de un cDNA que codifica para la DII (ver Anexo 2)

Todo lo anterior indica que a diferencia del resto de vertebrados hasta ahora estudiados, el hígado de los peces contiene cantidades relativamente pequeñas de DI y muy abundantes de DII. Además, mientras que la eficiencia catalítica de la DI de pez es 10 veces menor que la de la rata, la de la DII es 50 veces mayor. Así, y no obstante que en condiciones fisiológicas normales la glándula tiroidea de los teleosteos prácticamente no secreta T_3 (Eales, 1985; Milne y Leatherlan; 1980; Swanson y col, 1988; Inui y col, 1989; Kühn, 1993), la elevada actividad específica de la DII hepática puede estar relacionada a las altas concentraciones circulantes de T_3 características de los teleosteos (Eales, 1985; Weirich y col, 1987; Orozco y col, 1992). Más aún, esta abundancia de la DII hepática podría estar relacionada a la también peculiar cinética de T_3 en el hígado de la trucha. En efecto, mientras que en la rata las concentraciones circulantes e intrahepáticas de T_3 se equilibran rápidamente, en el hígado de la trucha parecen haber dos compartimentos, uno rápido y uno lento (Weirich y col, 1987). El compartimento lento no se ha explicado, pero su cinética de intercambio con el plasma es similar a la de la hipófisis (Silva y Larsen, 1978), corteza cerebral (Silva y Mathews, 1984) y tejido graso café (Bianco y Silva, 1987) en la rata, tejidos en los cuales el sistema desyodativo predominante es la DII. En este contexto, los cálculos de la T_3 libre presente en el nucleoplasma de cerebro y en general de todos los tejidos que contienen DII, son muy elevados (Oppenheimer y Schwartz, 1985). Estos datos son congruentes con la presencia de un compartimento perinuclear con altas concentraciones de T_3 que son dependientes de actividad DII, como se postula para la

corteza cerebral (Bianco y Silva, 1987). Así, es posible especular que la abundancia relativa de DII en el hígado de los peces, tenga relación con las cinéticas peculiares de intercambio/equilibrio plasma/hígado de la T_3 en este órgano.

2. Perfil ontogenético de la 5'D hepática en la trucha .

Hasta donde sabemos, este es el primer estudio ontogenético en el cual se cuantifica la actividad 5'D hepática en peces. Los resultados muestran un comportamiento bifásico de las dos enzimas que catalizan esta vía en la trucha. Aunque por el momento el descenso inicial (semanas 14 a 36) de ambas enzimas resulta difícil de explicar, su perfil temporal posterior puede asociarse a los procesos de crecimiento y maduración del organismo. En efecto, estudios previos de nuestro laboratorio y otros (Saunders y col, 1985; Orozco, 1992) han mostrado que a partir de las semanas 38 a 40, las concentraciones circulantes de T_3 aumentan y correlacionan positivamente con el crecimiento de los individuos (Orozco y col, 1992). En este mismo sentido apuntan los resultados recientes de nuestro laboratorio que muestran una correlación inversa entre el crecimiento del pez y la actividad DIII en la piel y los niveles circulantes de rT_3 (Fenton y col, 1997). Estos resultados y los hallazgos de la presente tesis fortalecen la noción de que las tironinas participan en el crecimiento, la diferenciación y los procesos de desarrollo en los vertebrados, con T_3 como su principal molécula activa.

Específicamente, en el caso de la trucha, el incremento inicial que ambas enzimas hepáticas exhiben durante las semanas 38 a 40, podría estar asociado a procesos de diferenciación sexual, ya que en este lapso las truchas presentaron órganos reproductores diferenciados. Por otra parte, el segundo incremento en la actividad DI (semanas 65 a 84) podría estar asociado a procesos de maduración sexual, ya que en este periodo los organismos presentaron estructuras sexuales diferenciadas, maduras y con gametos en etapa de maduración. La información referente a la participación de las hormonas tiroideas en los procesos de diferenciación

y maduración gonadal en los peces es muy escasa y se limita a estudios realizados en salmones migratorios. En efecto y como se muestra en la FIGURA 26, en el ciclo de vida del salmón se han documentado dos incrementos significativos de HT: el primero antes de la migración al océano, y el segundo antes de la migración al río. Como ya se ha mencionado en esta tesis, justo antes de la primera migración (AS), ocurre una metamorfosis que se ha denominado esmoltificación y a través de la cual los salmones juveniles sufren una serie de cambios morfo-funcionales que les van a permitir sobrevivir en el nuevo medio. Es también en este periodo cuando se inicia la diferenciación gonadal. Durante este periodo y antes de la esmoltificación y posterior migración "río abajo", se ha observado la activación del eje hipotálamo-hipófisis-tiroides con la consecuente elevación de las concentraciones circulantes de HT y de GH (Prunet y col, 1989; Young y col, 1989). La segunda migración, ahora "río arriba" se asocia a los cambios morfológicos y funcionales que le van a permitir al pez madurar sexualmente. Durante esta migración y en ambos sexos, ocurre nuevamente un aumento significativo y transitorio de HT. Posteriormente, cuando el animal entra al agua dulce, las HT alcanzan niveles muy elevados que decrecen paulatinamente conforme progresa la maduración de los gametos y hasta el desove o espermiación (Norris, 1980; Grau y col, 1981; Sower y Schreck, 1982; Biddiscombe e Idler, 1893;). Así, el mayor aporte de hormona activa requerida para participar en los procesos de diferenciación y maduración gonadal en la trucha necesariamente dependería de una elevación en la actividad DI, ya que se sabe que esta enzima aporta a la tironina activa (T_3) que se encuentra en la circulación.

La actividad DII hepática se elevó de manera sostenida a partir de que se iniciaron los procesos de diferenciación gonadal hasta que ocurrió la maduración de gametos. Se piensa que la DII provee en este caso al hígado de hormona activa para su propia utilización y que éste órgano es fundamental principalmente durante la maduración gonadal. En efecto, se sabe que las HT participan en la vitelogénesis aumentando la estabilidad del mRNA de las vitelogeninas durante su síntesis en el hígado (Benfey y col, 1989). Además, las HT sinergizan la acción de las

gonadotropinas y estrógenos en la incorporación de estas vitelogeninas como lipovitellinas y fosfovítina (lipoproteínas y fosfopéptidos) al vitelo en la ovogénesis (Wallace, 1985; Benfey y col, 1989; Redding y Patiño, 1993). Finalmente, se conoce que las vitelogeninas acarrean al interior del huevo tironinas, principalmente T4, que son utilizadas durante los primeros estadios de la embriogénesis (Wallace, 1985).

Por todo lo anterior el incremento en la vía de activación de HT para la producción de T₃ activa tanto para uso local del hígado (DII) como para el uso de otros órganos (DI) parecería un paso necesario para la diferenciación y maduración gonadal y la vitelogénesis.

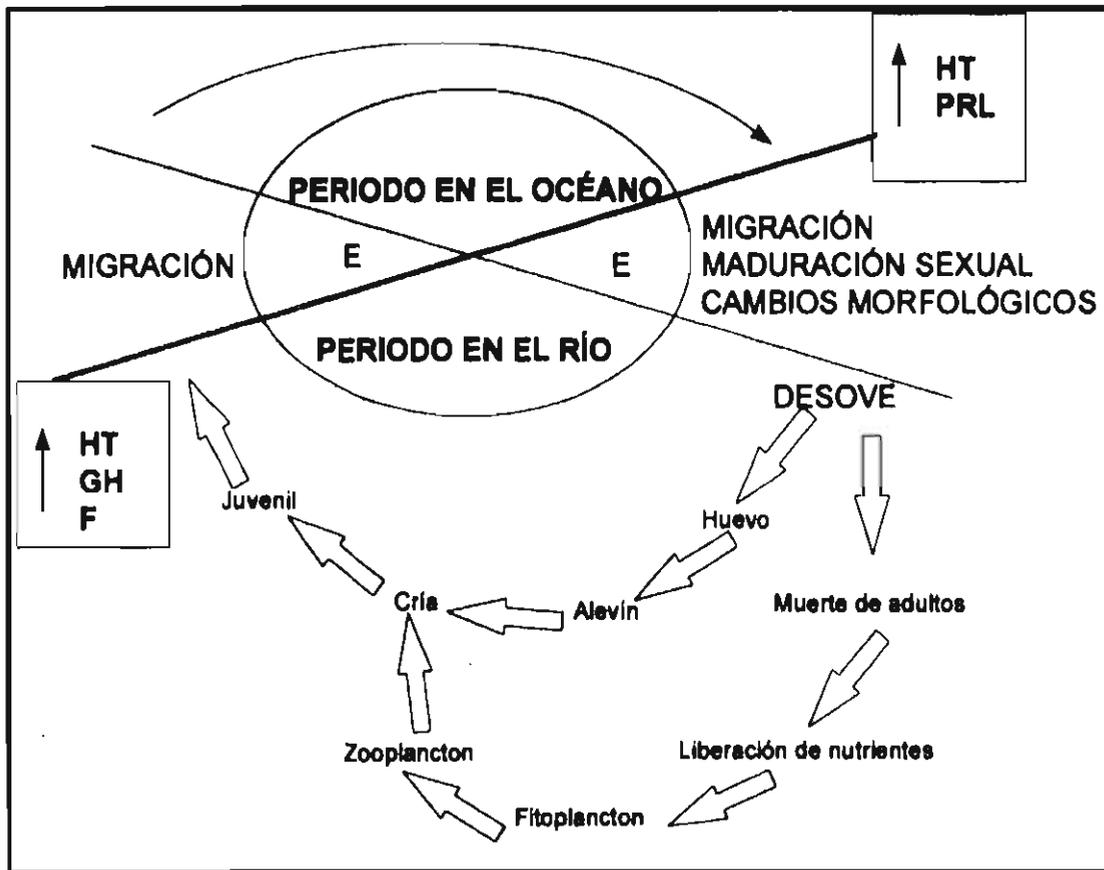


Figura 26. Ciclo de vida en los salmones migratorios. E, estuario; F, cortisol.

3. Reto Osmótico y actividad desyodativa hepática.

Una vez más, es pertinente destacar que hasta donde sabemos, este es el primer estudio en el cual bajo condiciones de experimentación controladas, se analiza la actividad 5'D hepática en teleosteos no migratorios que enfrentan de manera aguda demandas de osmoregulación.

Es importante recordar que en términos generales la osmolaridad plasmática de los teleosteos (principalmente [NaCl]) es ~1/3 mayor o menor que la del AD o del AS respectivamente; es decir, estos peces son hiperosmóticos con respecto al AD e hiposmóticos con respecto al AS. Así, en su hábitat natural y por lo tanto en equilibrio, los teleosteos de AD son hiperreguladores pues enfrentan el reto de la hipervolemia y la pérdida pasiva de iones, mientras que los marinos son hiporreguladores y enfrentan el reto de la hipovolemia y la concentración o sobrecarga de sales.

Uno de los hallazgos más importantes de los estudios de reto osmótico en la presente tesis, consiste en los cambios diferenciales y opuestos que las enzimas de la vía 5'D hepática muestran cuando los peces son sometidos a uno u otro reto. Así, en el caso de la trucha, el cambio de AD a AS (reto hiperosmótico) reduce significativamente (~ de 3 veces) la actividad DII hepática a las 8 h de exposición y este decremento se sostiene y no se recupera hasta las 48 h post-translado. En contraste, el reto hiposmótico aumenta significativamente (~ 2 veces) y con un curso temporal semejante, la actividad DII en el hígado de la especie marina. (fundulus).

Aunque escasa e incompleta pues se ha circunscrito principalmente al estudio de especies migratorias (ver anexo 1), se reconoce que en los peces, la demanda osmorregulatoria impuesta por uno u otro reto osmótico implica, entre otros, la operación de mecanismos adaptativos de naturaleza neuroendócrina y que las principales hormonas involucradas son el cortisol y la prolactina. En este contexto y a manera de un ejercicio especulativo razonablemente validado por los estudios hasta

ahora realizados, a continuación discutimos los posibles modelos y/o mecanismos que podrían estar participando en la respuesta tiroidea durante ambos retos.

Los peces que habitan el AD son hiperreguladores que en equilibrio eliminan el exceso de agua y retienen iones. Como se revisa con mayor detalle en el anexo 1, este equilibrio se caracteriza por una elevada tasa de filtración glomerular acompañada de reabsorción activa de NaCl en los tubulos distal y colector del riñón primitivo de estas especies (Evans, 1993). Además, disminuye la permeabilidad de los epitelios y tegumentos (piel, Intestino, branquias) a la salida de iones (Wendelaar, 1993). Diversos estudios han mostrado que la PRL es la principal hormona que participa en la regulación de estos mecanismos adaptativos. Las concentraciones circulantes de esta hormona así como el número y volumen de las células hipofisarias que la sintetizan y secretan, están inversamente relacionados a la permeabilidad de los epitelios (Loretz y Bern, 1982; Prunet y col, 1985; Hirano y col, 1987; Wendelaar, 1993).

Durante la respuesta adaptativa que se dispara al cambiar a un medio con mayor salinidad se ponen en marcha mecanismos homeostáticos encaminados primordialmente a retener agua y mantener así el volumen circulante. Es decir, la trucha que en el AD es un organismo hiperregulador, requiere de manera inmediata ingresar y retener agua para evitar la hipovolemia que resultaría del cambio al medio hiperosmótico. Posteriormente, resulta primordial excretar el exceso de iones, principalmente NaCl, que están ingresando junto con la ingestión del agua. Se sabe que en esta respuesta adaptativa se deprime la síntesis y secreción de PRL, y que es ahora el cortisol el mensajero que juega un papel central activando la bomba Na^+/K^+ dependiente de ATP, principalmente en las branquias (Redding y col 1984a; Barton y col, 1985; Langhorne y Simpson, 1986; Patiño y col, 1987; Young y col, 1989; Redding y col, 1991).

Así, el decremento significativo en la actividad DII hepática que ocurre en truchas expuestas a un medio hipertónico, podría estar relacionado al bien documentado

decremento de PRL circulante que ocurre durante esta respuesta adaptativa en los peces migratorios que inician la esmoltificación (Hasegawa y col, 1987; Prunet y col, 1989; Potts y col, 1989); o bien, en aquellos que son transferidos a un medio hipertónico (Prunet y col, 1985; Avellay col, 1987). De la misma manera, el aumento en la DII hepática que resulta de la transferencia del fundulus a un medio hipotónico podría asociarse al también bien documentado aumento en la síntesis y secreción de PRL disparado por la disminución en la salinidad del medio (Henderson y col, 1970; Oliverau y Ball, 1970; Norris, 1980). Es decir, estas evidencias indirectas, nos permiten proponer que la PRL podría ejercer un efecto estimulador sobre la actividad DII hepática. En este contexto, nuestra propuesta es congruente con estudios previos en los cuales se demuestra que la PRL estimula la actividad 5'D total hepática en diferentes especies, incluyendo algunos teleosteos (DeLuze y col, 1989).

Como ya se mencionó, otro mensajero importante en la regulación hidroosmótica es el cortisol. Esta hormona participa principalmente en el control de la hipoosmorregulación. Además, recientemente se ha descrito que al igual que cortisol, la GH participa en el balance hipoosmótico también aumentando la actividad de la bomba Na⁺-K⁺-ATP-asa en la branquia y el número de células de cloro. Se ha observado que la administración de GH aumenta el número de receptores a cortisol en las branquias, por lo que se ha propuesto que el efecto de GH es sinérgico con cortisol (McCormick, 1996). El efecto que éstas dos hormona ejercen sobre la actividad desyodativa no es aún clara, pero en términos generales hay evidencia de que en mamíferos, el cortisol (Kaplan y Utiger, 1978; Kaplan y Yaskloski, 1982) disminuye la actividad DI hepática mientras que la GH inhibe la actividad DII en tejidos como el BAT (Silva y Larsen, 1986). Sin embargo, la GH estimula la actividad 5'D total hepática en los peces (MacLatchy y Eales, 1990). Aún cuando la actividad DI hepática no se modificó significativamente durante el reto hiper- o hipoosmótico, los cambios observados en la actividad DII podrían ser secundarios a los cambios en las concentraciones circulantes de cortisol y GH resultantes de ambos retos.

Recientemente se han descrito los "sistemas endócrinos simples", los cuales incluyen a algunas células endócrinas que tienen la habilidad de directamente "sensar" estímulos medioambientales, tales como la luz, la temperatura y la salinidad. Esto se ha demostrado en algunos teleosteos, en los cuales la localización anatómica de sus lactotrofos es tal, que éstos son capaces de responder a cambios en la osmolaridad del medio, ya sea estimulando o inhibiendo la síntesis de PRL (Bern, 1980). Los folículos tiroideos en los peces se encuentran dispersos en la región peri-aórtica y peribranquial, lo que posiblemente también les permitiría responder directamente a estímulos osmóticos. Así, el reto hiperosmótico provocaría una hipersecreción de T_4 , mientras que el reto hipoosmótico podría provocar una hiposecreción de esta hormona. Leatherland (1985) describió que en efecto, el cambio hiperosmótico resulta en un aumento en las concentraciones circulantes de T_4 . Esto podría ofrecer también una explicación a los cambios en la actividad DII hepática que se observan en este estudio. Como se ha mencionado, el aporte de sustrato es uno de los factores que de manera más importante regulan la actividad desyodativa. Así, la actividad DII disminuye durante el hipertiroidismo y se incrementa durante el hipotiroidismo. La respuesta de la DI es opuesta, por lo menos en el hígado. En este contexto la disminución en la DII hepática durante el reto hiperosmótico podría estar asociado a una hipersecreción de sustrato (T_4) mientras que en el reto hipoosmótico la respuesta sería opuesta.

La confirmación experimental de estas propuestas son plausibles y actualmente se han iniciado estudios en nuestro laboratorio con este propósito. Además, se ha iniciado tanto la caracterización de las enzimas que catalizan la vía de activación de las HT (DI y DII) en órganos efectores durante la osmorregulación, así como estudios acerca del efecto de los retos osmóticos en éstos órganos. Esto con el propósito de obtener un panorama más integral tanto de la regulación diferencial de éstas enzimas como del efecto que las hormonas tiroideas tienen en los procesos de osmorregulación.

CONCLUSIONES

1. Se caracterizó la cinética de la vía 5'desyodasa en el hígado de la trucha y el fundulus:

- En contraste con el resto de vertebrados adultos, el hígado de ambos teleosteos expresa además de la actividad DI, actividad DII.
- Las características cinéticas de ambas enzimas son, en términos generales, similares a las descritas para sus respectivas contrapartes en mamíferos. Sin embargo,

la DI es menos eficiente para desyodar al sustrato secundario (T_4), y menos sensible para ser inhibida por PTU.

la DII presenta valores de V_{max} 6 (trucha) y 10 (fundulus) veces mayores que los reportados para el cerebro de rata.

2. Se cuantificó la actividad 5'D hepática durante un periodo de 70 semanas de la ontogenia de la trucha:

- Las dos enzimas muestran un comportamiento bifásico, y su perfil temporal puede asociarse a procesos de crecimiento, diferenciación y maduración de los organismos.

3. Se analizó el efecto del reto osmótico sobre la actividad 5'D hepática en la trucha y el fundulus.

- La DI y DII hepáticas muestran cambios diferenciales y opuestos cuando los peces son sometidos a un reto hiper- o hipoosmótico con un curso temporal semejante en ambos casos.
- El reto hiperosmótico reduce significativamente (~ 3 veces) la actividad DII hepática.
- El reto hipoosmótico la aumenta significativamente (~ 2 veces).

BIBLIOGRAFIA

- Aceves C., Legarreta F.G. y Valverde-R C. (1982). Importancia del radioinmunoanálisis homólogo de tiroxina en el suero de bovinos y caprinos. Veterinaria Mex: 13: 207-212
- Aceves C., Navarro L., Ramirez del Angel A., Luna M y Valverde-R. C. (1994). Lactation selectively modifies 5'-deiodinative responses to glucose overfeeding. Endocrine 2:547-551
- Anguiano B., Aceves C., Navarro L., Ramirez del Angel A., Luna M., Perera G. y Valverde-R C. (1991). Neuroendocrine regulation of adrenal 5'-monodeiodination during acute cold exposure in the rat I. Effects of hypophysectomy. Endocrinology 128: 504-508
- Assem H., y W. Hanke. (1981). Cortisol and osmotic adjustment of the eurihaline teleost, *Sarotheron mossambicus*. Gen Comp Endocrinol 43: 370-380.
- Avella M., Young G., Prunet P., Schreck C. (1989). Plasma prolactin and cortisol levels during salinity challenge in juvenile Coho salmon. Submitted
- Balsam A., Sexton F., Ingbar S.H. (1978). The effect of thyroidectomy, hypophysectomy and hormone replacement on the formation of triiodothyronine from thyroxine in rat liver and kidney. Endocrinology 103: 1759-1767.
- Barrington E.J.W. (1959). Some endocrinological aspects of the Protochordata. In: Comparative Endocrinology. (A Gorbman, De). Wiley, New York.
- Barrington E.J.W., y A. Thorpe. (1965). An autoradiographic study of the binding of ¹²⁵iodine in the endostyle and pharynx of the ascidean, *Ciona intestinalis*. Gen Comp Endocrinol 5: 375-385.
- Barrington E.J.W. (1975). Introducción a la Endocrinología General y Comparada. Editorial Blume. Madrid, España.
- Baxter J. y Funder J. (1979). Hormone receptors. N Engl J Med 301: 1149-1156
- Behne D., Kryriakopoulos A., Meinhold H. y Köhrle J. (1990). Identification of type I iodothyronine 5'-deiodinase as a selenoenzyme. Biochem Biophys Res Commun 173: 1143
- Bergman L., Darras V.H., Huybrechts L.M., Decuypere E., Vandesande F. y Kühn E.R. (1989). Evidence for chicken GH as the only hypophyseal factor responsible for the stimulation of the hepatic 5'-monodeiodination activity in the chick embryo. Repr Nut Develop 29: 197-202

Bern H.A. (1980). Primitive control of endocrine systems. En: Hormones, adaptation and evolution. Ishii S., Hirano T. y Wada M. (Eds). Japan Scientific Societies Press, Tokyo nas Springer-Verlag, Berlin. Pp. 25-33

Berry M.J., Kieffer J.D., Hamey J.W. y Larsen P.R. (1991). Selenocysteine confers the biochemical properties of the type I iodothyronine deiodinase. J Biol Chem 266: 14155-14158.

Berry M.L., y Larsen R. (1992). The role of selenium in thyroid hormone action. Endocrine Rev 13: 207-219

Bianco A.C. y Silva J.E. (1987). Nuclear T3 in brown adipose tissue. Receptor occupancy and sources of T3 as determined by *in vivo* techniques. Endocrinology 120: 55-62

Biddiscombe S. y Idler D.R. (1983). Plasma levels of thyroid hormones in sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*). Decrease before spawning. Gen Comp Endocrinol 52: 467-470

Braverman L.E., Ingbar S.H. y Sterling. (1970). Conversion of thyroxine (T4) to triiodothyronine (T3) in athyreotic human subjects. J Clin Invest 49: 855-864

Brown S.B., Fedoruk K., y Eales J.G. (1978). Physical injury due to injection of blood removal causes transitory elevations of plasma thyroxine in rainbow trout *Salmo gairdneri*. Canad J Zool 56: 1998-2003

Brown S.B., MaLatchy D.L., Hara T.J. y Eales J.G. (1991). Effects of cortisol on aspects of 3,5,3'-triiodo-L-thyronine metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Gen Comp Endocrinol 81: 207-216

Burger A.G. (1986). Nondeiodinative pathways of thyroid hormone metabolism. En: Thyroid Hormone Metabolism. Hennemann G. (De.), Marcel Dekker Inc, New York. Pp 255-276

Byamungu N., Mol K. y E.R. Kuhn. (1992). Evidence for the kidney as an important source of 5'-monodeiodinase activity and stimulation by somatostatin in *Oreochromis niloticus*. Gen Comp Endocrinol 88: 199-208

Capuco A.V. y Keys E.E. (1989). Somatotrophin increases thyroxine 5'-monodeiodinase activity in lactating mammary tissue of the cow. J Endocrinol 121: 205-211

Chan H.H. y Eales J.G. (1975). Identification of iodoamino acids in the plasma and bile of brook trout, *Salvelinus fontinalis* (Mitchill). Can J Zool 53: 97-101.

Chan H.H. y Eales J.G. (1976). Influence of bovine TSH on plasma thyroxine levels and thyroid function in brook trout, *Salvelinus fontinalis* (Mitchill). Gen Comp Endocrinol 28: 461-472.

Chopra I.J., Solomon D.H., Chopra V., Yung Wy S., Fisher D.A. y Nakamura Y. (1978). Pathways of metabolism of thyroid hormones. Rec Prog Horm Res 34: 521-532

Clements-Merlini M. (1962a). Altered metabolism of I^{131} by the endostyle and notocord of ammocoetes larvae I. Effects of treatment with thyrotropic stimulating hormone. Gen Comp Endocrinol 2: 354-360.

Clements-Merlini M. (1962b). Altered metabolism of I^{131} by the endostyle and notocord of ammocoetes larvae II. Effects of treatment with thiourea of potassium thiocyanate. Gen Comp Endocrinol 2: 361-368.

Coutin F., Pelletier G. y Walker P. (1985). Subcellular localization of thyroxine 5'-deiodinase activity in bovine anterior pituitary. Endocrinology 117: 2527-2533

Cyr D.G., MacLatchy D.L., y Eales J.G. (1988). The influence of short-term 17β estradiol treatment on plasma T3 levels and in vitro hepatic T4 5'-monodeiodinase activity in immature rainbow trout, *Salmo gairdneri*. Gen Comp Endocrinol 69: 431-438

Davey J.C., Becker K.B., Schneider M.J., St Germain D.L., y Galton V.A. (1995). Cloning of a cDNA for the type II iodothyronine deiodinase. J.B.C 270: 26786-26789

Davis P.J., Davis F.B. y Blas S.D. (1982). Studies on the mechanisms of thyroid hormone stimulation in vitro of human red cells Ca^{2+} -ATPase activity. Life Sci 30: 675

DeGroot L. (1979). Thyroid hormone action and thyroid physiology: endocrine and neural relationships. En: DeGroot et al, Endocrinology Vol 2, Grune Stratton (Eds) pp 357-364.

DeGroot L. y Taurog A. (1979). Secretion of thyroid hormone. En: DeGroot et al, Endocrinology Vol 2, Grune Stratton (Eds) pp 343-346

De Luze A., Leloup J., Papkoff H., Kikuyama S. y Kawauchi H. (1989). Effects of vertebrate prolactins and growth hormones on thyroxine 5'-monodeiodination in the eel (*Anguilla anguilla*). A potential bioassay for growth hormone. Gen Comp Endocrinol 73: 186-193.

Dickhoff W.W., Folmar L.C., y Gorbman A. (1978). Changes in plasma thyroxine during smoltification of coho salmon. *Oncorhynchus Kisutch*. Gen Comp Endocrinol 36: 229-232

- Dratman M.D. y Crutchfield F.L. (1979). Symaptosomal [125-I] triiodothyronine after intravenous thyroxine. Am Physiol 235: E638,
- Eales J.G. (1979). Comparison of L-thyroxine and 3,5,3'-triiodo-L-thyronine kinetics in fed and starved rainbow trout, *Salmo gairdneri*. Comp Biochem Physiol 62A: 295-300
- Eales J.G., Hughes M., y Uin L. (1981). Effects of food intake on diel variations in plasma thyroid hormone levels in rainbow trout *Salmo gairdneri*. Gen Comp Endocrinol 45: 167-174
- Eales J.G., Chang J.P., Van der Kraak G., Omeljanuk R.J. y Uin L. (1982). Effects of temperature on plasma thyroxine and iodine kinetics in rainbow trout *Salmo gairdneri*. Gen Comp Endocrinol 47: 295-307
- Eales J.G., Omeljanuk R.J. y Shostak S. (1985). Reverse T₃ in rainbow trout *Salmo gairdneri*. Gen Comp Endocrinol 50: 395-406
- Eales J.G. (1985). The peripheral metabolism of thyroid hormones and regulation of thyroidal status in poikilotherms. Can J Zool 63: 1217-1231
- Eales J.G., y Finsson K.R. (1991). Response of hepatic thyroxine 5'-deiodinase of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, to chronic ingestion of 3,5,3'-triiodo-L-thyronine. J Exp Zool 257:230-235
- Eales J.G., Morin P.P., Tsang T.J., Hara T.J. (1993). Thyroid hormone deiodination in brain, liver, gill, heart and muscle of Atlantic *Salmo (Salmo salar)* during photoperiodically-induced parr smolt transformation. II Outer and inner-ring 3,5,3'-triiodo-L-thyronine and 3,3',5-triiodo-L-thyronine (reverse T₃) deiodination. Gen Comp Endocrinol 90: 157-167
- Engler D. y Burger A.G. (1984). The deiodination of the iodothyronines and their derivatives in man. Endocr Rev 5: 151-184
- Epstein F.H., Katz A.I. y Pickford G.E. (1967). Sodium and potassium activated ATPase of gills: role in adaptation of teleosts to saltwater. Science, Wash. 156: 1245-1247
- Erickson V.J., Cavalieri R.R. y Rosenberg L.L. (1982). Thyroxine 5'-deiodinase of rat thyroid, but not that of liver, is dependant on thyrotropin. Endocrinology 11: 434-440
- Escobar F., Escobar H. y Morreale G. (1992). Fisiologia del tiroides. En: Fisiologia Humana. Tresguerres J.A.F. (Ed) Interamericana Mcgrow Hill. Pp 947-970.
- Etkin W. (1978). The thyroid gland- A gland in search of a function. Perspectives in Biology and Medicine:

Evans D.H. (1993). Osmotic and ionic regulation. En: The Physiology of Fishes. David H. Evans (Ed). CRC Press, Inc. USA. Pp 315-339

Farwell A.P. y Leonard J.L. (1989). Identification of a 27 kD protein with the properties of type II iodothyronine 5' deiodinase in dibutyryl cyclic AMP-stimulated glial cell. J Biol Chem 264: 20561-20567

Farwell A.P., DiBenedetto D.J. y Leonard J.L. (1993). Thyroxine targets different pathways of internalization of type II iodothyronine 5'-deiodinase in astrocytes. J Biol Chem 268: 5055-5062

Fekkes D., Van Overmeeren-Kapteijn E., Docter R., Hennemann G. y Visser T.J. (1979). Location of rat liver iodothyronine deiodinating enzymes in the endoplasmic reticulum. Biochem Biophys Acta 587: 12-19

Fekkes D., Hennemann G. y Visser T.J. (1983). Properties of detergent dispersed iodothyronines 5 and 5' deiodinase activities from rat liver. Biochem Biophys Acta 742: 324-333

Fenton B., Orozco A., Navarro L., Valverde-R C. y Aceves C. (1991). Triyodotironina reversa (rT3) en la trucha arcoiris. Su perfil temporal en suero durante su desarrollo. XXXIV Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas. Colima Col, México. Resumen C-118

Fenton B. (1994). Triyodotironina reversa (rT3) en la trucha arcoiris y su posible fuente de origen. Tesis de Maestría. UNAM

Fenton B., Orozco A. y Valverde-R C. (1997). Kinetic characterization of skin inner-ring deiodinative pathway and its correlation with circulating levels of reverse t3 (rt3) in developing rainbow trout. J Endocrinol. En prensa

Finsson K.W. y Eales J.G. (1996). Identification of thyroid hormone conjugates produced by isolated hepatocytes and excreted in bile of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Gen Comp Endocrinol 101: 145-154.

Flood C.G. y Eales J.G. (1983). Effects of starvation and refeeding on plasma T4 and T3 levels and T3 deiodination in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. Can J Zool 61: 1949-1953

Flores L.F. y Cabeza F.A. (1984). Endocrinología. Editorian Francisco Méndez Cervantes. México. pp 409-479.

- Folmar L.C., y Dickhoff W.W. (1979). Plasma thyroxine and gill $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ changes during seawater acclimation of coho salmon *Oncorhynchus Kisutch*. Comp Biochem Physiol 63A: 329-332
- Gaveret J.M., Nunez J., Cahnmann H.J. (1980). Formation of dehydroalanine residues during thyroid hormone synthesis in thyroglobuline. J Biol Chem 255: 5281-5285
- Gavin L.A., Mac Mahon F.A. y Moeller M. (1981). Carbohydrate in contrast to protein feeding increase the hepatic content of active thyroxine 5'-deiodinase in the rat. Endocrinology 109: 530-536
- Gavin L.A., Cavalieri R.R. y Moeller M. (1987). Glucose and insuline reverse the effects of fasting on 3, 5, 3'-triiodothyronine neogenesis in primary cultures of rat hepatocytes. Endocrinology 121: 858-864
- Gavin L.A., Moeller M. Mac Mahon F.A Gulli Y. y Cavalieri R.R. (1989). Carbohydrate reactivation of thyroxine 5'-deiodinase (type II) in cultured mouse neuroblastoma cells is dependent upon new protein synthesis. Endocrinology 124: 635-641
- Gavin L.A., Moeller M. Mac Mahon F.A Gulli Y. y Cavalieri R.R. (1990). Cyclic adenosine 3'5'-monophosphate and glucose stimulate thyroxine 5'-deiodinase (type II) in cultured mouse neuroblastoma cells. Metabolism 39: 474-480
- Giralt M., Villarroya F., Mapel T. y Iglesias R. (1986). Impared basal and noradrenaline-induced iodothyronine 5'-deiodinase activity in brown adipose tissue from pregnant and lactating rats. Biochem Biophys Res Comm 138: 1315-1321
- Gómez V.E., Bolaños F. y Valverde-R C. (1990). Tiroides. En: Fundamentos de Endocrinología. J.M. Malacara, García V. M. y Valverde-R C. (Eds) Salvat, México
- Gorbman A., M. Clements y R. O'Brien. (1954). Utilization of radioiodine by invertebrates, with special study of several Annelida and Mollusca. J Exp Zool 127:75-92.
- Gorbman A. (1955). Some aspects of the comparative biochemistry of iodine utilization and the evolution of thyroid function. Physiol Rev 35: 336-344.
- Gorbman A. (1969). Thyroid Function and its Control in Fishes. En: Fish Physiology. Vol II. Academic Press, New York. pp241-271.
- Gorbman A. (1978). Evolution of thyroid function. En: Hormonal Proteins and Peptides. (C.H. Li, Ed). Academic Press. Vol VI pp 273-369.

Goswami V.A. y Rosenberg I.N. (1988). Effects of glutathione on iodothyronine 5'-deiodinase activity. Endocrinology 123: 192-202

Grau G.E., Dickhoff W.W., Bern H.A. y Folmar L.C. (1981). Lunar phasing of the thyroxine surge preparatory to the seaward migration of salmonid fish. Science 211: 607-609

Grau G.E., Helms L.M., Shimoda S.K., Ford C.A., LeGrand J. Y Yamauchi K. (1986). The thyroid gland of the Hawaiian parrot-fish and its use as an *in vitro* model system. Gen Comp Endocrinol 61: 100-108

Guyton C.A. Tratado de Fisiología Médica. De. Interamericana, México. pp 1083-1146

Harris A.R.C., Vagenakis A.G. y Braverman L.E. (1979). Sex-related differences in outer monodeiodination of thyroxine and 3, 3', 5', -triiodothyronine by rat liver homogenates. Endocrinology 104: 645-652

Hasegawa S., Hirano T., Ogasawara T., Iwata M., Akiyama T., Arai S. (1987). Osmoregulatory ability of chum salmon *Oncorhynchus nerka*, reared in fresh water for prolonged periods. Fish Physiol Biochem 4: 101-110

Hashizume K., Miyamoto., Ichikawa K., Yamauchi A., Sakurai H., Ohtsuka H., Kobayashi M., Nishii Y. y Yamada T. (1989). Evidence for the presence of two active forms of cytosolic 3, 5, 3'-triiodo-thyronine (T3) binding protein (CTBP) in the rat kidney. J Biol Chem 264: 4864-4871

Henderson, I.W., Chan D.K.O., Sandor T., y C. Jones. (1970). The adrenal cortex and osmoregulation in teleosts. In: Hormones and Environment. Memoirs of the Society for Endocrinology. G.K. Benson y J.G. Phillips (Editores)

Heyma P. y Larkins R.G. (1982). Glucocorticoids decrease the conversion of thyroxine into 3, 5, 3'-triiodothyronine by isolated rat renal tubules. Clin Sci 62: 215-220

Higgs D.A. y Eales J.G. (1977). Influence of food deprivation on radioiodothyronine and radiolodine kinetics in yearling brook trout, *Salvelinus fontinalis* (Mitchill) with a consideration of the extent of L-thyroxine conversion to 3,5,3'-triiodo-L-thyronine. Gen Comp Endocrinol 32: 29-40

Higgs D.A. y Eales J.G. (1979). The influence of diet composition on radiothyroxine kinetics in brook trout, *Salvelinus fontinalis* (Mitchill). Can J Zool 57: 396-402

Hirano T., Ogasawara T., Bolton J.P., Colle N.L., Hasegawa S. y Iwata M. (1987). Osmoregulatory role of PRL in lower vertebrates. In: Kirsch R., Lahlou B. (eds) "Comparative Physiology of Environmental Adaptations", Basel: Karger. pp112-124

Hoar, W.S., (1979). Fisiología Animal Comparada. Capítulos 8 y 11. Segunda Edición. Editorial Omega. Barcelona

Inui Y., Tagawa M., Miwa S., y Hirano T. (1989). Effects of bovine TSH on the tissue thyroxine level and metamorphosis in prometamorphic flounder larvae. Gen Comp Endocrinol 74: 68-76.

Jennings A.S., Crutchfield F.I. y Dratman M.B. (1984). Effects of hypothyroidism and hyperthyroidism on triiodothyronine production in perfused rat liver. Endocrinology 144: 992-997

Kaplan M.M. y Utiger R.D. (1978). Iodothyronine metabolism in rat liver homogenates. J Clin Invest 61: 459-471

Kaplan M.M. (1980). Thyroxine 5'-monodeiodination in rat anterior pituitary homogenates. Endocrinology 106: 567-576

Kaplan M.M. y Yaskiski K.A. (1980). Phenolic and tyrosil ring deiodination of iodothyronines in rat brain homogenates. J Clin Invest 66: 551-562

Kaplan M.M. y Yaskoiski K.A. (1982). Effects of congenital hypothyroidism and partial and complete food deprivation on phenolic and tyrosil ring iodothyronine deiodination in the rat brain. Endocrinology 110: 761-767

Kaplan M.M., Visser T.J., Yaskioski K.A. y Leonard J.L. (1983). Characteristics of iodothyronine tyrosil ring deiodination by rat cerebral cortical microsomes. Endocrinology 112: 35-42

Kaplan M.M. (1984). The role of thyroid hormone deiodination in the regulation of hypothalamus-pituitary function. Neuroendocrinology 38: 254-260

Kaplan M.M. (1986). Regulatory influences on iodothyronine deiodination in animal tissue. En: Thyroid Hormone Metabolism. G. Hennemann (De). pp. 231-253. Dekker Inc. New York. Basel.

Kato H., Fukuda T., Parkinson C., McPhile P y cheng S.Y. (1989). Cytosolic thyroid hormone-binding protein is a monomer of pyruvate kinase. Proc Natl Acad Sci USA 86:

Kennedy G.R. (1966). The distribution and nature of iodine compounds in ascidians. Gen Comp Endocrinol 7: 500-511.

Koenig R.J., Leonard J.L., Senator D., Rappaport N., Watson A. y Larsen P.R. (1984). Regulation of thyroxine 5'-deiodinase activity by 3, 5, 3'-triiodothyronine in cultured anterior pituitary cells. Endocrinology 115: 324-329

Knöeppel S.J., Atkins D.L., y Packer R.K. (1982). The role of the thyroid gland in osmotic and ionic regulation in *Fundulus heteroclitus* acclimated to freshwater and seawater. Comp Biochem Physiol 73A: 25-29

Köhrlé J., Hesch R. D. y Leonard J.L. (1991). Intracellular pathways of iodothyronine metabolism. En: The Thyroid: A Fundamental and Clinical Text, Braverman L.E., Utiger R.D. Editores. Lippincott Co Philadelphia. pp 143-189

Köhrlé J. (1994). Thyroid hormone, deiodination in target tissues - a regulatory role for the trace element selenium? Exp Clin Endocrinol 102: 63-89

Kühn E.R., Mol K.A., y Darras V.M. (1993). Control strategies of thyroid hormone monodeiodination in vertebrates. Zoological Sci (Tokyo) 10 (6): 873-885

Lagler K., Bardach J.E., Miller R.R., Passino M. (1977). Ichthyology. John Wiley & Sons. New York. pp 343-344.

Lam T.J. (1972). Prolactin and hydromineral regulation in fish. Gen Comp Endocrinol Supplement 3: 328-338

Larsen P.R. (1989). Regulation of thyroid hormone metabolism in the brain. En: Iodine and the brain. DeLog G.R., Robbins J., Condliffe P.G. (Eds). Plenum Press, New York, pp 5-18

Larsen P.R. y Ingar S.H. (1992). The thyroid gland. En Williams Textbook of Endocrinology, Wilson J. D. y Foster D.W. (Editores). W.B. Saunders Co.

Leatherland J.F. y K.J. Farbridge. (1992). Chronic fasting reduces the response of the thyroid to growth hormone and TSH, and alters the growth hormone-related changes in hepatic 5'-monodeiodinase activity in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Gen Comp Endocrinol 87: 342-353

Leatherland J.F. (1985). Studies of the correlation between stress-response, osmoregulation and thyroid physiology in rainbow trout, *Salmo gairdneri* (Richardson). Comp Biochem Physiol 80A: 523-531

Lehman P.A. (1982). Las hormonas tiroideas. Ciencia 33: 145-153

Leonard J.L., y Rosemberg I.N. (1980). Iodothyronine 5'-deiodinase from rat kidney: substrate specificity and 5'-deiodination of reverse triiodothyronine. Endocrinol 107: 1376-1383

Leonard J.L. y Visser T.J. (1986). Biochemistry of deiodination. En: Thyroid Hormone Metabolism. G. Hennemann (Ed). Marcel Dekker Inc. New York and Basel. pp 189-229

Leonard J.L. (1991). Identification and structure analysis of iodothyronine deiodinases. En: The Thyroid Gland. Dreer M (Ed). Raven Press, New York, pp 285

Limpel L.E., y J.E. Casida (1957). Iodine metabolism in insects. J Exp Zool 135: 19-25.

Loretz C.A. y Bern H.A. (1982). Prolactin and osmoregulation in vertebrates. Neuroendocrinology 35: 292-304

Luna Muñoz M., Romero Ramírez C.M y Valverde-R C. (1990). Ensayo por competencia de unión a proteínas para cuantificar sin purificación previa cortisol ó corticosterona en el suero de algunas especies animales. Vet Mex 21: 115-122

Luna M., Guzman G., Navarro L., Sanchez de la Peña y Valverde-R C. (1995). Circadian rhythm of type II 5' deiodinase activity in the rat hypothalamic-pituitary-adrenal axis. Endocrine 3: 597-601

McLatchy D.L., y Eales J.G. (1990). Growth hormone stimulates hepatic thyroxine 5'-monodeiodinase activity and 3,5,3'- triiodothyronine levels in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) Gen Comp Endocrinol 78: 164-172

MacLatchy D.L., y Eales J.G. (1992). Properties of T4 5' deiodinating systems in various tissues of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Gen Comp Endocrinol 86 313-322

McCormick S.D. (1996). Effects of growth hormone and insuline-like growth factor I on salinity tolerance and gill Na⁺, K⁺-ATPase in Atlantic salmon (*Salmo salar*): Interaction with cortisol. Gen Comp Endocrinol 101: 3-11

McNabb F.M. (1992). Thyroid Hormones. McNabb (Ed.). Prentice Hall. New Jersey

Maetz J. (1970). Mechanisms of salt and water transfer across membranes in teleosts in relation to aquatic enviroment. In: Hormones and Environment. Memoirs of the Society for Endocrinology. G.K. Benson y J.G. Phillips (Editores)

Maia A.L., Berry M.J., Sabbag R., Hamey J.W. y Larsen P.R. (1995). Structural and functional differences in the dio1 gene in mice with inherited type I deiodinase deficiency. Mol Endo 9: 969-980

Malacara J.M., M.V. García y Valverde-R. (1979). Fundamentos de Endocrinología Clínica. La Prensa Médica. México.

Matty A.J. (1985). The Thyroid Gland. In: Fish Endocrinology. Crom Helm. Australia. pp54-83.

- Milne R.S. y Leatherland J.F. (1980). Studies on The relationship between osmotic or ionic regulation and thyroid gland activity in two salmonid fishes, *Salmo gairdneri* (Richardson) and *Oncorhynchus kisutch* Walbaum. J Fish Biol 16:349-360.
- Morin P.P., Hara T.J., y Eales J.G. (1993). Thyroid hormone deiodination in brain, liver, gill, heart and muscle of Atlantic salmon (*Salmo salar*) during photoperiodically-induced parr smolt transformation. I. Outer and inner-ring thyroxine deiodination. Gen Comp Endocrinol 90: 142-156
- Mol K., Kaptein E., Darras V.M., deGreef W.J., Kühn E.R., y Visser T.J. (1993). Different thyroid hormone deiodinating enzymes in tilapia (*Oreochromis niloticus*) liver and kidney. Federation of European Biochemical Societies 321: 140-144
- Ng T.B., Idler D.R., y Eales J.G. (1982). Pituitary hormones distinct from gonadotropins that stimulate the thyroidal system in teleost fishes. Gen Comp Endocrinol 48: 372-389.
- Norris D.O. (1980). Vertebrate Endocrinology. Capítulos 8 y 16. Lea & Febiger. USA
- Olivereau M. y Ball J.N. (1970). Pituitary influences on osmoregulation in teleosts. In: Hormones and Environment. Memoirs of the Society for Endocrinology. G.K. Benson y J.G. Phillips (Editores)
- Omeljaniuk R.J. y Eales J.G. (1988). The effect of 3, 5, 3'-triodo-L-thyronine on gill Na⁺ - K⁺-ATPase of rainbow trout *Salmo gairdneri*, in fresh water. Comp Biochem Physiol 84A: 427-429
- Oppenheimer J.H., Schwarts H.L., Mariach C.N., Kinlaw W.B., Wong N.C. y Freak H.K. (1987). Advances in our understanding of thyroid hormone action at the cellular level. Endocr Rev 8: 288-298
- Orozco R. A. (1989). Radioinmunoanálisis de hormonas tiroideas en una especie de teleosteo. Estandarización del método y valores de referencia. ENEP - UNAM Iztacala.
- Orozco R. A., Ruiz-Juvera A. y Valverde-R. C. (1992). The importance of employing homologous serum free of thyronines in radioimmunoassays to assess circulating thyroid hormones in rainbow trout. Bol Estud Med y Biol 1-4: 41-49
- Osborn R.H., Simpson T.H. y Youngson A.F. (1978). Seasonal and diurnal rhythms of thyroidal status in the rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. J Fish Biol 12: 531-540
- Pickford G.E. y Phillips J.G. (1959). Prolactin a factor promoting survival of hypophysectimized killifish in fresh water. Science 130: 454-455
- Pimlott, N.J. y Eales J.G. (1983). in vitro study of hepatic iodothyronine deiodination in

rainbow trout *Salmo gairdneri*. Can. J Zool 61: 547-552

Pittman C. (1979). Hormone metabolism En: Handbook of Endocrinology Vol 2. De Groot y col.(Ed). Grune Stratton. pp 365-371

Potts W.T.W., Talbot C., Eddy F.B., Primmitt D., Prunet P., y Williams M. (1989). Sodium balance in adult Atlantic salmon (*Salmo salar*) during migration into neutral and acid fresh water. Comp Biochem Physiol 92A: 247-453.

Prunet P. y Boeuf G. (1985). Plasma prolactin levels during transfer of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) and Atlantic salmon (*Salmo salar*) from fresh water to sea water. Aquaculture 45: 167-176.

Prunet P., Boeuf G., Houdebine L.M. (1985). Plasma prolactin levels in rainbow trout during the adaptation to different salinities. J Exp Zool 235: 187-196.

Prunet P., Boeuf G., Bolton J.P., y Young G. (1989). Smoltification and sea water adaptation in Atlantic salmon (*Salmo salar*): plasma prolactin, growth hormone and thyroid hormones. Gen Comp Endocrinol 74: 355-364.

Prunet P., Avella M., Fostier A., Björnsson B.T., Boeuf G., y Haux C. (1990). Roles of prolactin in salmonids. In: Progress in Comparative Endocrinology. Eppler, Scanes and Stetson (eds). Wiley-Liss Inc Publications pp 547-552

Redding M.J. y Patiño R. (1993). Reproductive Physiology. En: The Physiology of Fishes. David H. Evans (Ed). CRC Press, Inc. USA. pp 503-534

Refetoff S., Robin N.I. y Fang V.S. (1970). Parameters of thyroid function in serum of 16 selected vertebrate species: A study of PBI, serum T4 and the patterns of T4 and T3 binding serum proteins. Endocrinology 86: 793-805

Robbins J. (1978). Thyroxine transport proteins of plasma. Molecular properties and biosynthesis. Rec Prog Horm Res 34: 477-520

Robbins J. y Bartalena L. (1986). Plasma transport of thyroid hormones En: Hennemann G. (Ed.) Thyroid hormone metabolism. Marcel Dekker, Inc. New York.

Robbins J. (1991). Thyroid hormone transport proteins and the physiology of hormone binding. En: The Thyroid. A Fundamental and Clinical Text. Braverman L.E. y Utiger R.D. (Ed). J.B. Lippincott Co. New York. pp 111-125

Roche J. y Y. Yagi. (1952). Fixation de l'iode radioactif par les algues et sur les constituants iodés des Laminaires. Compt Rend Soc de Bio 146: 642-654.

Roti E., Fang S.L., Green K., Emerson C.H. y Bravermann L.E. (1981). Human placenta is an active site of thyroxine and 3, 3', 5 -triiodothyronine tyrosil ring deiodination. J Clin Endocrinol Metab 53: 498-501

Safran M. y Leonard J.L. (1991). Comparison of the physicochemical properties of type I and type II iodothyronine 5' deiodinase. J Biol Chem 266: 3233-3238

Sato K. Y Robbins J. (1981). Thyroid hormone metabolism in primary cultured rat hepatocytes. J Clin Invest 68: 475-483

Saunders R.L., MacCormick S.D., Henderson E.B., Eales J.G. y Johnston C.E. (1985). The effect of orally administered 3, 5, 3'-triiodo-L-thyronine on growth and salinity tolerance of Atlantic salmon *Salmo salar*. Aquaculture 45: 143-156

Sawada K., Hummel B. C. W. Y Walfish P.G. (1986). Intermediate Mr cytosolic components potentiate hepatic 5'-deiodinase activation by thiols. Biochem J 238: 787-791

Sefkow A.J., DiStephano J.J., Himmick B.A., Brown S.B. y Eales J.G. (1996). Kinetic analysis of thyroid hormone secretion and interconversion in the 5-day-fasted rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Gen Comp Endocrinol 101: 123-138

Segal J. y Ingbar S.H. (1990). 3, 5, 3' -triiodothyronine enhances sugar transport in the rat thymocytes by increasing the intrinsic activity of the plasma membrane sugar transport. J Endocrinol 124: 133-

Shields C.A. y Eales J.E. (1986). Thyroxine 5'-monodeiodinase activity in hepatocytes of rainbow trout, *Salmo gairdneri*: distribution, effects of starvation and exogenous inhibitors. Gen Comp Endocrinol 63: 334-343

Schupnik M.A. y Ridgway C.E. (1987). Thyroid hormone control of thyrotropin gene expression in the rat anterior pituitary cells. Endocrinology 121: 619-624

Silva J.E. y Larsen P.R. (1978). Contribution of plasma triiodothyronine and local thyroxine monodeiodination to triiodothyronine and nuclear triiodothyronine receptor saturation in pituitary, liver and kidney of hypothyroid rats. Further evidence relating saturation of pituitary nuclear triiodothyronine receptors and the acute inhibition of thyroid-stimulating hormone release. J Clin Invest 61: 1247-1259

Silva J.E., Leonard J.L., Crantz F.R. y Larsen P.R. (1982). Evidence for two tissue-specific pathways for in vitro thyroxine 5'deiodination in the rat. J Clin Invest 69: 1176

Silva J.E. y Mathews P.S. (1984). Production rates and turnover of triiodothyronine in rat-developing-cerebral cortex and cerebellum: responses to hypothyroidism. J Clin Invest 74: 1035-1049

Silva J.E. y Larse P.R. (1986). Interrelationships among thyroxine, growth hormone and the sympathetic nervous system in the regulation of 5'-iodothyronine deiodinase in rat brown adipose tissue. J Clin Invest 77: 1214-1223

Sinclair D.A.R. y Eales J.G. (1972). Iodothyronine-glucuronide conjugates in the bile of brook trout, *Salvelinus fontinalis* and other freshwater teleosts. Gen Comp Endocrinol 19: 552-559

Sower S.A. y Schreck E.B. (1982). Steroid and thyroid hormones during sexual maturation of coho salmon *Oncorhynchus kisutch* in seawater or freshwater. Gen Comp Endocrinol 47: 42-53

Sower S.A., Sullivan C.V. y Gorbman A. (1984). Changes in plasma estradiol and effects of T3 on plasma estradiol during smoltification of coho salmon *Oncorhynchus kisutch*. Gen Comp Endocrinol 54: 486-492

Sterling K. Y Lazarus J. (1977). The thyroid and its control. Ann Rev Physiol 39: 349-372

St Germain D.L. (1986). Hormonal control of low Km (type II) iodothyronine 5'-deiodinase in euthyroid NB41A3 mouse neuroblastoma cells. Endocrinology 199: 840-846

St Germain D.L., Dittrich W., Morganelli C.M., y Cryns V. (1990). Molecular cloning by hybrid arrest of translation in *Xenopus laevis* oocytes. J Biol Chem 262: 20087-

St Germain D.L. (1994). Iodothyronine deiodinases. Trends Endocrinol Metab 5: 36-42

St Germain D.L., Schwartzman R.A., Croteau W., Kanamori A., Wang Z., Brown D.D. y Galton V.A. (1994 b). A thyroid hormone-regulated gene in *Xenopus laevis* encodes type III iodothyronine 5'-deiodinase. Proc Natl Acad Sci 91: 7767-7771. Correction Proc Natl Acad Sci 91: 11282

Swanson P., Grau E.G., Helms L.M. y Dickhoff W.W. (1988). Thyrotropic activity of salmon pituitary glycoprotein hormones in the Hawaiian parrotfish thyroid *in vitro*. J Exp Zool 245: 194-199

Sweeting R.M. y J.G. Eales (1992a). The acute influence of ingested thyroid hormones on hepatic deiodination pathways in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Gen Comp Endocrinol 85: 376-384

Sweeting R.M., y J.G. Eales (1992b). Thyroxin 5'-monodeiodinase activity in microsomes from isolated hepatocytes of rainbow trout: Effect of growth hormone and 3, 5, 3'-triiodothyronine. Gen Comp Endocrinol 88: 169-177

Tata J.R. (1980). The action of growth and developmental hormones. Biol Rev 55: 285-319

Taurog A. (1979). Hormone synthesis. En: DeGroot et al, Endocrinology Vol 2, Grune Stratton (Eds) pp 331-342

Taurog A. (1991). Thyroid iodine metabolism. En: The Thyroid. A Fundamental and Clinical Text. Braverman L.E. y Utiger R.D. (Ed). J.B. Lippincott Co. New York. pp 51-97

Tanabe Y., Taodo I., y Yoshinori T. (1989). Comparison of thyroxine-binding proteins of various vertebrates and their evolutionary aspects. Gen Comp Endocrinol 13: 14-21

Thomas A.L., Krane E.J. y Nathanielsz P.W. (1978). Changes in the fetal thyroid axis after induction of premature partuition by low dose continous intravascular cortisol infusion to the fetal sheep at 130 days of gestation. Endocrinology 102: 17-23

Tibaldí J. y Surks M. (1985). Animal model of nonthyroidal disease.6: 87-102

Toyoda N., Zavacki A.M., Maia A.L., Harney J.W. y Larsen P.R. (1995). A novel retinoid X receptor independent thyroid hormone response element is present in the human type 1 deiodinase gene. Mol Cell Biol 15: 5100-5112

Trayhurn P., Duuouglas J.B. y McGucki M.M. (1982). Brown adipose tissue thermogenesis is "suppressed" during lactation in mice. Nature 298: 59-60

Valverde-R C. (1983). Control y regulación neuroendócrina de la función tiroidea. En: Tiroides, Fisiología y Patología. J. Maisterrera (Ed.) Asanca.

Valverde-R. C. (1993). Comunicación intercelular o la armonía de la irregularidad. En: Comunicación Neuroendócrina. Soc Mex C Fisiol y CoNaCyT

Valverde-R. C., Orozco R.A., Aceves C. y Romero R.C. (1994). Control y regulación de la función tiroidea. En: Texto de Fisiología. Soc Mex C Fisiol y PRONFOPAB-SEP.

Vijayan M.M., Flett P.A., y Leatherland J.F. (1988). Effect of cortisol on the *in vitro* hepatic conversion of thyroxine to triiodothyronine in brook trout charr (*Salvelinus fontinalis Mitchill*). Gen Comp Endocrinol 70: 312-318

Vinogradov A.P. (1935). Chemical composition of marine organisms. Trav de Lab Bio L'acad Sci de L'ESSR 3

Visser T.J., Van der Does-Tobe I., Docter R. y Hennemann G. (1976). Subcellular localization in rat liver of an enzyme converting T4 to T3 and possible involvement of essential thiol groups. Biochem J 157: 479-482

- Visser T.J., Fekkes D., Docter R. y Hennemann G. (1978). Sequential deiodination of thyroxine in rat liver homogenates. Biochem J 174: 221-229
- Visser T.J., Leonard J.L., Kaplan M.M. y Larsen P.R. (1982). Kinetic evidences suggesting two mechanisms for iodothyronine 5'-deiodination in the rat cerebral cortex. Proc Natl Acad Sci, USA 79: 5080,
- Visser T.J., Kaplan M.M., Leonard J.L. y Larsen P.R. (1983). Evidence for two pathways of iodothyronine 5'-deiodination in rat pituitary that differ in kinetic propylthiouracil sensitivity, and response to hypothyroidism. J Clin Invest 71: 992-1002
- Visser T.J., van Buren J.C.J., Rutgers M., Eelkman Rooda S.J. y de Haerder W.W. (1991). The role of sulfatation in the thyroid hormone metabolism. Trends Endocrinol Metab 1:211
- Wallace R.A., Selman K., Greeley M.S., Begovac P.C., Lin Y.W.P. y McPherson R. (1987). Current status of oocyte growth. En: Proc. Third Int Symp Reprod Physiol Fish. Idler D.R., Crim L.W. y Walsh J.M.(Eds). Memorial University of Newfoundland, St. John's, 167
- Wartofski L. y Burman K. (1982). Alterations in thyroid function in patients with systemic illness: "The Euthyroid Sick Syndrome". Endocr Rev 3: 164-217
- Weinberg C., Thompson C.C., Ong E.S., Lebo R., Groul D.J. y Evans R.M. (1986). The *c-erb-A* gene encodes a thyroid hormone receptor. Nature 324: 641-646
- Wendelaar Bonga S.E. (1993). Endocrinology. En: The Physiology of Fishes. David H. Evans (Ed). CRC Press, Inc. USA. Pp 469-502
- Weirich R.T., Schwartz H.L y Oppenheimer J.H. (1987). An analysis of the interrelationship of nuclear and plasma triiodothyronine in the sea lamprey, lake trout and rat: evolutionary considerations. Endocrinology.120: 664-667
- Wolff J. (1964). Transport of iodide and other anions in the thyroid gland. Physiol rev 44: 45-90.
- Young G., Björnsson B.T., Prunet P., Lin R.J., Bern H.A. (1989). Smoltification and seawater adaptation in Coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*): Plasma prolactin, growth hormone, thyroid hormones and cortisol. Gen Comp Endocrinol 74: 335-345.
- Young J.Z. (1981). The life of vertebrates. Third Edition. Clarendon Press Oxford

ANEXO 1

BALANCE HIDROSMÓTICO EN PECES.

Excluyendo a la lamprea cuya concentración de NaCl es prácticamente igual a la del agua de mar, en el resto de los peces de agua salada (AS) y de agua dulce (AD), la concentración plasmática de NaCl es de alrededor de 1/3 con respecto a la del AS, o bien, alrededor de 300 veces más elevada que la del AD respectivamente. La conservación de esta homeostasis hidrosmótica implica la continua operación de mecanismos de osmorregulación que permitan, en el caso de los organismos marinos, enfrentar la catastrófica hipovolemia e hipematremia que dicho ambiente impondría, o bien, en los organismos de AD, la hipervolemia e hiponatremia que resulta del medio acuático correspondiente.

Los animales acuáticos que son capaces de vivir únicamente en un estrecho intervalo de salinidad del medio exterior se denominan **estenohalinos** y presentan mecanismos de osmorregulación diferentes si habitan en AD o en AS. Como se resume en el CUADRO 1, en los peces estenohalinos de AD que continuamente introducen agua a su organismo por la piel, los riñones están especializados en excretar el excedente de agua produciendo orina abundante y diluida, y el intestino no participa en la absorción de agua y sales. En estos peces, la branquia es el órgano osmorregulador más importante y excreta amonio (NH_3) y carbonatos (HCO_3^-), intercambiándolos por sodio (Na^+) y cloro (Cl^-) respectivamente. Se ha propuesto que este mecanismo de osmoregulación está mediado por proteínas de la membrana plasmática que acarrearán y/o intercambian dichos iones de manera activa y específica. En contraste, los peces estenohalinos que habitan en los océanos pierden continuamente agua por la piel; tienen un riñón muy poco desarrollado que excreta principalmente iones bivalentes (Mg^{++} , Ca^{++}), y el intestino participa absorbiendo agua y sales. Al igual que en los peces de AD, las branquias excretan NH_3^+ pero con la diferencia de que en lugar de

introducir sales, las excretan. Esta excreción está mediada por la actividad de la bomba de sodio-potasio dependiente de ATP ($\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPasa}$) (Maetz y col, 1970; Hoar, 1979).

A diferencia de los organismos estenohalinos, existe un numeroso grupo de peces eurihalinos que son capaces de tolerar una amplia gama de salinidad del medio acuático. Sorprendentemente, los riñones y las branquias de estos organismos cambian de función al cambiar la salinidad del medio. En el caso concreto de las branquias, esto significa que tienen la capacidad de introducir o eliminar Na^+ utilizando mecanismos totalmente distintos, de tal manera que en uno de ellos no se requiere de energía, mientras que el otro implica un gasto importante de ATP.

CUADRO 1. BALANCE HIDROOSMOTICO. ORGANOS EFECTORES Y MECANISMOS

	AGUA DULCE	AGUA SALADA		AGUA SALADA	AGUA DULCE	
	<i>Equilibrio</i>	<i>Compensación aguda</i>	<i>Adaptación-Equilibrio</i>	<i>Equilibrio</i>	<i>Compensación aguda</i>	<i>Adaptación-Equilibrio</i>
META	ELIMINAR EXCESO DE AGUA RETENER SALES	RETENER AGUA	ELIMINAR EXCESO DE SALES	EVITAR PERDIDA DE AGUA ELIMINAR EXCESO DE SALES	ELIMINAR EXCESO DE AGUA	RETENER SALES
ORGANOS EFECTORES Y MECANISMOS		↑ ingesta de agua		ingesta de agua		
	<i>Riñón</i>	<i>Riñón</i>		<i>Riñón</i>	<i>Riñón</i>	
	↑FG : ↑excreción de agua por la orina reabsorción de NaCl en segmento distal y tubo colector	↓FG se elimina la reabsorción de NaCl		FG baja	↑FG : ↑excreción de agua por la orina ↑ reabsorción de NaCl en segmento distal y tubo colector	
	<i>Vejiga</i>				<i>Vejiga</i>	
	reabsorción de Na baja permeabilidad al agua				reabsorción de Na baja permeabilidad al agua	
	<i>Branquia</i>		<i>Branquia</i>	<i>Branquia</i>		<i>Branquia</i>
	captura de Na ⁺ (Na ⁺ /H ⁺) captura de Cl ⁻ (Cl ⁻ /HCO ₃)		↑excreción de sales	excreción de sales		↑ captura de Na ⁺ (Na ⁺ /H ⁺) ↑ captura de Cl ⁻ (Cl ⁻ /HCO ₃)
			<i>Intestino</i>	<i>Intestino</i>		
			↑ cotransportador Na ⁺ /K ⁺ /Cl ⁻	cotransportador Na ⁺ /K ⁺ /Cl ⁻		

Regulación Hormonal

Es bien sabido que en todos los vertebrados los mecanismos de osmorregulación están finamente regulados por el sistema neuroendocrino. En los peces, la mayor parte de los estudios a este respecto se han llevado a cabo en especies eurihalinas migratorias como sería el caso de algunas especies de salmónidos y anguilas. Aunque se sabe que la arginina-vasotocina (AVT), los factores natriureticos, las catecolaminas, la hormona de crecimiento (GH) y las hormonas tiroideas (HT) participan de manera importante, se ha sugerido que la PRL y el cortisol son los principales reguladores endocrinos de la osmorregulación (Maetz y col, 1970; Hoar, 1979; Norris, 1980; Richman III y Zaugg, 1987). Por esta razón, a continuación se revisará la información relevante sobre la participación de estas hormonas en los procesos de osmorregulación.

En los salmónidos migratorios ocurre un complejo proceso premigratorio que incluye cambios bioquímicos, morfológicos, funcionales y conductuales. Este proceso se ha denominado **smoltificación** y les permite la adaptación al cambio osmótico que enfrentaran una vez que migren. Durante la etapa juvenil estos organismos migran del AD al AS donde completaran su desarrollo y maduración. Esta migración se denomina **anadroma** y es precedida/determinada por una importante elevación en los niveles circulantes de HT y cortisol (Redding y col, 1984; 1991). Por otra parte, durante la migración reproductiva, los salmonidos viajan del océano a los lagos. Esta migración denominada **catadroma**, se acompaña de un incremento en las concentraciones circulantes de PRL.

Cortisol

El cortisol es el principal mineralocorticoide en los peces. Este esteroide es sintetizado y secretado por el tejido interrenal y regulado por la adrenocorticotropina (ACTH). Desde hace un par de décadas, los hallazgos pioneros de Henderson y col (1970) y Maetz y col (1970) entre otros, mostraron que el cortisol promueve la

excreción de electrolitos en peces que habitan en un medio hipertónico (AS), y su conservación en aquellos que habitan en un medio hipotónico (AD). Aunque numerosos trabajos han analizado la participación del cortisol en la osmorregulación (Butler y Carmichael, 1972; Assem y Hanke, 1981; Redding y col, 1984 a,b; Eib y Hossner, 1985; Barton y col, 1985; Langhorne y Simpson, 1986; Richman III y Zaugg, 1987; Richman III y col, 1987; Björnsson y col, 1987; Patiño y col, 1987; Weisbart y col, 1987; Björnsson y col, 1989; Young y col, 1989; entre otros), el papel que juega esta hormona no es aún del todo claro. Esto se debe en parte a que el modelo experimental mejor estudiado es el de los salmónidos migratorios, los cuales, como ya se mencionó, sufren numerosos cambios morfo-funcionales y conductuales asociados a la esmoltificación. Esto ha dificultado la interpretación de los resultados ya que no es claro si los cambios que exhiben los niveles circulantes del esteroide, ocurren en respuesta a la demanda de osmorregulación, o si son secundarios a una respuesta inespecífica de estrés a un nuevo habitat. Además y dependiendo de la especie, los resultados difieren, lo que dificulta aún más su interpretación.

Así, se han observado incrementos en las concentraciones circulantes de cortisol en especies eurihalinas no migratorias transferidas a diferente salinidad (Assen y Hanke, 1981), así como en especies migratorias transferidas del AD al AS (Redding y col 1984a; Barton y col, 1985; Langhorne y Simpson, 1986; Patiño y col, 1987; Young y col, 1989; Redding y col, 1991). Además, este incremento se acompaña de un aumento en la actividad de la bomba de $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -ATPasa en las branquias (Redding y col, 1984a; Langhorne y Simpson, 1986; Richman III y Zaugg, 1987; Björnsson y col, 1987; Redding y col, 1991). Para algunos autores estos resultados indican la participación del cortisol como un estimulador en el intercambio de electrolitos. Sin embargo, para otros autores, el esteroide solo es indispensable y participa durante la primera parte de la respuesta osmorregulatoria, que es cuando se secretan cantidades elevadas de esta hormona al torrente sanguíneo. Estos últimos autores argumentan que el cortisol por si solo no es capaz de intercambiar un mecanismo que retiene Na^+ por uno que lo

excreta (Assem y Hanke, 1981). Redding y col (1984a; 1991) también consideran que es el traslado al nuevo medio más que el incremento en la salinidad que ocasiona el aumento en las concentraciones de cortisol en el salmón *Oncorhynchus kisutch*. En apoyo a lo anterior, Barton y col (1985) encontraron un incremento en la respuesta interrenal al estrés durante la esmoltificación en *Oncorhynchus kisutch*.

La administración de cortisol a salmones *Oncorhynchus kisutch* en proceso de esmoltificación y transferidos a AS, deprime la actividad de la $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPasa}$ branquial sin modificar la concentración de electrolitos en sangre (Redding y col, 1984a; 1991). En contraste, en la misma especie, Richman III y Zaugg (1987) encuentran un incremento en la actividad de esta enzima branquial inducido por la administración de cortisol. Por otra parte, Eib y Hossner (1985) reportan que el tratamiento con esta hormona no modifica la actividad de la bomba de $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPasa}$ en la branquia de trucha arcoiris (AD). Los diferentes efectos del tratamiento con cortisol sobre la actividad $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPasa}$ branquial pudieran atribuirse a diferencias intra-especie y a los diferentes estadios de desarrollo de los individuos estudiados. Richman III y Zaugg (1987) argumentan que debido a los diferentes cambios endócrinos que ocurren durante la esmoltificación, aún diferencias menores en las etapas de desarrollo pueden alterar la respuesta de los animales al cortisol. Además de los anterior, las diferencias pueden estar dadas por las dosis de cortisol utilizadas. Como otras hormonas, el efecto del cortisol es bifásico; teniendo un efecto inhibitorio a dosis altas (200 ng/ml, Redding y col, 1984) y estimulador a dosis bajas (100 ng/ml, Richman III y Zaugg, 1987).

La adrenalectomía aumenta las concentraciones de Na^+ en peces de AS, y las disminuye en los de AD. Ambos efectos son revertidos con inyecciones de cortisol. En hipótesis iniciales se propuso que el cortisol controla la síntesis del transportador o de las enzimas asociadas al transporte de sodio ($\text{Na}^+ - \text{K}^+$ dependiente de ATP) (Henderson y col, 1970; Maetz y col, 1970; Norris, 1980), sin embargo, esto no ha sido probado experimentalmente.

Prolactina

Los estudios pioneros de Pickford y Phillips (1959) demostraron que los *Fundulus heteroclitus* (eurihalinos) hipofisectomizados requerían de PRL para sobrevivir en el AD. Desde entonces se reconoce a la PRL como la principal hormona adaptativa para el AD. Un gran número de estudios han confirmado los efectos osmorregulatorios de esta hormona en branquia, tejido interrenal, intestino, vejiga natatoria y tegumentos (Loretz y Bern, 1982; Hirano y col, 1987), tejidos en los cuales modifica la permeabilidad al agua y a los electrolitos.

La información referente a la participación de la PRL en la osmorregulación se deriva principalmente de estudios en los que se han medido las concentraciones circulantes de esta hormona en peces sometidos a diferentes situaciones osmóticas. En la trucha arcoiris transferida del AD al AS, las concentraciones circulantes de PRL disminuyen mientras que la transferencia inversa induce un aumento en dichas concentraciones (Prunet y col, 1985). Información similar fue obtenida en los salmónidos *Oncorhynchus nerka* (Hasegawa y col, 1987); *Salmo salar* (r.c. Prunet y Boeuf, 1985; Prunet y col, 1989; Potts y col, 1989) y *Oncorhynchus kisutch* (Avella y col, 1989). La preadaptación a la vida oceánica de estas especies migratorias, la cual se desarrolla durante la esmoltificación, también está asociada a decrementos en la PRL plasmática, los cuales coinciden con la habilidad hipoosmótica máxima tanto en *Oncorhynchus kisutch* como en *Salmo salar* (Prunet y col, 1989; Young y col, 1989). Los resultados descritos apoyan la participación de la PRL en la adaptación al AD, así como que la reducción en las concentraciones circulantes de esta hormona participe en el desarrollo de los mecanismos osmorregulatorios al AS (Prunet y col, 1990).

La transferencia de la trucha arcoiris a un medio artificial sin Na^+ reduce las concentraciones circulantes de PRL. La adaptación a este tipo de medio se ha asociado con un aumento en la entrada de Na^+ branquial y en la actividad de la Na^+ - K^+ - ATPasa, junto con la proliferación de las células de cloro en los lamelos

secundarios de las branquias (Avella y col, 1987). Estos resultados y otros obtenidos en experimentos de transferencia al AS han llevado a postular que la PRL tiene un efecto inhibitorio sobre la actividad de la $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPasa}$ branquial y en el desarrollo de células de cloro (Prunet y col, 1990). Esto último parece no aplicarse a los salmones migratorios, en los cuales la PRL parece participar en el control de la permeabilidad epitelial (Clark y Bern, 1980; Loretz y Bern, 1982; Hirano 1986; Potts y col, 1989).

Como una evidencia más de la participación de la PRL en los procesos de osmorregulación, se ha observado un número mayor de células secretoras de PRL y un aumento en su actividad en peces que se transfieren del agua oceánica a la dulce ya sea experimentalmente, o debido a migraciones propias de la especie (Henderson y col, 1970; Olivereau y Ball, 1970; Norris, 1980).

Hormonas tiroideas.

Se ha sugerido que las HT son permisivas en los procesos de osmorregulación, principalmente en las especies eurihalinas. Así, en salmones migratorios, la actividad del eje hipotálamo-hipófisis-tiroides aumenta en los días que anteceden a la migración hacia el mar. El tratamiento con HT induce la preferencia por las aguas más salinas y los fármacos anti-tiroideos revierten esta preferencia (Norris, 1980). Además, se ha postulado que las HT regulan la síntesis de la subunidad Beta de la bomba $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ dependiente de ATP en las branquias de estos organismos (Epstein y col, 1967; Dickhoff y col, 1978; Folmar y Dickhoff, 1979). Aunque los resultados obtenidos hasta la fecha no son concluyentes, existe consenso acerca de que durante el estrés osmótico, las TH interactúan a nivel del órgano blanco con otras hormonas (posiblemente cortisol) y ahí ambas ejercen sus bien conocidos efectos (aumento en el metabolismo) (Leatherland, 1985).

ANEXO 2

Rainbow Trout Liver Expresses Two Iodothyronine Phenolic Ring Deiodinase Pathways with the Characteristics of Mammalian Types I and II 5'-Deiodinases*

AUREA OROZCO, J. ENRIQUE SILVA, AND CARLOS VALVERDE-R

Centro de Neurobiología (A.O., C.V.R.), Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-228, Ciudad Universitaria, México Distrito Federal 04510; and Department of Medicine (J.E.S.), Division of Endocrinology, McGill University, Montreal, Quebec H3T 1E2, Canada

ABSTRACT

Deiodinases are major determinants of thyroid hormone tissue availability and disposal. The knowledge of the expression of these enzymes in lower species is important to understand evolutionary and ontogenetic aspects of thyroid hormone action and metabolism. Here we have studied outer ring deiodination in the trout liver using both reverse T_3 (rT_3) and T_4 as substrates. The use of rT_3 disclosed two enzymatic components with the characteristics of mammalian types I and II 5'-deiodinases. The high rT_3 - K_m type I 5'-deiodinase activity (180 nM) has a low cofactor requirement (5 mM dithiothreitol) and is relatively sensitive to propylthiouracil inhibition, whereas the low rT_3 - K_m activity was akin to the outer ring deiodination of T_4 in these

regards. The use of T_4 exhibited only a single type of activity with a low K_m (0.63 nM), a relatively high cofactor requirement (25 mM dithiothreitol), and propylthiouracil-resistance. Teleosts constitute a unique example of type II activity expression in the liver of an adult vertebrate. Furthermore, the V_{max} of this enzyme is as high as that found in comparable homogenates from hypothyroid mammalian tissues, whereas the V_{max} of the type I activity is lower than that of mammalian liver. These findings are in consonance with the peculiar kinetics of T_3 in trout liver, kinetics remarkably similar to those of the mammalian pituitary, cerebral cortex, and brown adipose tissue, which also preferentially express type II deiodinase. (*Endocrinology* 139: 254-258, 1997)

THE THYROID gland secretes predominantly T_4 , which functions primarily as a prohormone because it is largely converted to T_3 in peripheral tissues. T_3 is about 10 times more active than T_4 and is produced in an organ-specific manner by enzymatic outer ring deiodination (ORD) of its precursor. In mammalian species, ORD is catalyzed by two distinct enzymes, well characterized in operational terms and tissue distribution: the type I and type II 5'-deiodinases (1-3).

The complement of deiodinases present in vertebrate liver varies with the species and developmental stage of the organism. In fetal rats, for example, the liver expresses both type II and type III (an inner ring deiodinase), whereas, after birth, type I activity predominates (Aceves, C., unpublished data from our laboratory). Chicken embryo liver exhibits types I and II (4), whereas, in developing tadpoles, only type III is expressed (5). However variable the expression of deiodinases could be during ontogeny, adult liver of vertebrate species expresses predominantly, if not exclusively, type I deiodinase activity. In fish liver, it seems that two ORD processes are present, but it is not clear whether they correspond to the types I and II mammalian deiodinase activities (6-8). In trout, for example, enzyme kinetic analyses

have demonstrated vastly differing K_m values for hepatic T_4 -ORD. Whereas initial studies reported K_m values of 190 nM (6) and 13 nM (7), a subsequent report by MacLatchy and Eales (8) has suggested that two types of deiodinase activity, with K_m values of 0.098 nM and 10 nM, coexist. Although the latter could correspond to type II ORD, the former, with such a low K_m , is unprecedented. Furthermore, these authors find that the low- K_m ORD is sensitive to inhibition by 6-N-propyl-2-thiouracil (PTU), whereas the higher K_m process is relatively resistant to this agent, exactly the opposite of the observations with mammalian low- and high- K_m 5'-deiodinases. The failure to obtain a consistent pattern of 5'-deiodinase activities in the trout may well be caused by methodological limitations. Thus, only T_4 has been used as substrate, and in a range of concentrations that has not been adequate to detect separate enzymatic pathways such as the mammalian types I and II. Besides, even when tested in a broad range of concentrations, T_4 is not a good substrate to demonstrate mammalian type I in assays that measure iodine release, as we will show here. Likewise, factors such as the temperature dependency of the enzymatic processes and the thiol cofactor concentrations have not been systematically controlled.

The three major iodothyronine deiodinases have recently been cloned (9-12). These enzymes share, in common, having selenocysteine in the active center and a substantial level of homology in seemingly critical domains of the molecules; however, as predicted from studies based on biochemical identification, they differ rather markedly in catalytic properties, tissue distribution, and physiological responses. The

Received April 19, 1996.

Address all correspondence and requests for reprints to: Aurea Orozco, Centro de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70 228, Ciudad Universitaria 04510, D.F., México. E-mail: aurea@servidor.unam.mx.

* This study was supported in part by Grants CoNaCyT: 1981/PN, 4851-N 9406, and Scholarship 85753.

accurate characterization of these enzymes in lower species is important to understand phylo- and ontogenetic aspects of thyroid hormone metabolism. Even though molecular biology could provide invaluable clues in these regards, the establishment of functional correlates among the members of this enzyme family is essential. We have therefore undertaken the systematic study of ORD processes in lower species. The goal of the present studies was to characterize iodothyronine ORD in the trout liver in an effort to clarify the confusion derived from previous studies. Our results demonstrate that this tissue expresses two ORD processes whose characteristics are quite similar to those reported for the mammalian type I and type II. Furthermore, the liver of the adult trout expresses abundant type II activity, a finding which may be relevant to previous observations on the metabolism of iodothyronines in this and related species.

Materials and Methods

Reagents

Nonradioactive iodothyronines were obtained from Henning Co. (Berlin, Germany). PTU was obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Outer ring (^{125}I -labeled T_4 and rT_3 (sp. act. 1200 and 1174 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$, respectively) were purchased from New England Nuclear (Boston, MA). Dithiothreitol (DTT) was obtained from Calbiochem (La Jolla, CA). Bradford reagents for protein determination were from Bio-Rad (Hercules, CA).

Animals

Rainbow trout ranging from 300–600 g were obtained from El Zarcu hatchery located in the State of Mexico, Cb' (w2) (w) ig (semi-climate 5–12 C) (13). Fish were held under natural photoperiod and fed *ad libitum* with commercial trout pellets (Purina). Fish were killed by a blunt blow to the head, and the liver was rapidly removed and frozen in dry ice-acetone until used. Collected livers ($n = 40$) were homogenized in 1:10 (wt/vol) ice-cold homogenizing buffer (10 mM HEPES, 0.25 M sucrose, 10 mM EDTA, pH 7). Aliquots of pooled homogenates were quick-frozen in dry ice-acetone and stored at -70°C until assayed.

Deiodination assay

Enzyme activities in pooled homogenates were measured in triplicate under varying conditions by a modification of the radiolabeled iodide release method (14). The reaction mixture (total vol, 100 μl), containing liver homogenate diluted to the optimal protein concentration, was incubated with approximately 100,000 cpm ^{125}I - T_4 or ^{125}I - rT_3 plus variable concentrations of nonradioactive thyronine, DTT, and PTU as indicated in the corresponding experiment. Also, 1 μM of unlabeled T_3 was added to the mixture to minimize the IRD of the substrates. The reaction was stopped with 50 μl of a cold solution containing 50% normal bovine serum and 10 mM PTU, immediately followed by 350 μl of 10% trichloroacetic acid. After centrifugation (3,000 rpm \times 10 min), the supernatant was decanted onto a 1-ml Dowex-50X2 column equilibrated in acetic acid. The (^{125}I -), product of the deiodination, was eluted with 2 ml of 10% acetic acid and counted in a gamma counter. Data are expressed in femtomoles ^{125}I released per milligram of protein per hour. Protein content was measured by Bradford's method (15). Basic characterization of enzyme activity included the analysis of the effects of protein concentration (15–600 μg), time (15–60 min), and temperature of incubation (12, 24, and 37 C). Subsequent analysis included substrate and cofactor dependency and effect of inhibitors. Analysis of the raw data included Lineweaver-Burk plots, and the graphical resolution of the kinetic data into two components was performed as described by Hofstee (16).

Results

Definition of assay conditions

Because of the limitations inherent in using only one substrate to detect both types of ORD, we have used both, ^{125}I - rT_3

or ^{125}I - T_4 . Protein-, time-, temperature- and pH-dependency were defined with 2 nM of either substrate. Enzyme activity was linear up to 2 mg/ml of protein per reaction mixture and optimal pH was 7 (data not shown). Optimal rates of deiodination were obtained at 23–25 C (Fig. 1), which is within the usual temperature range for this specie (17). Incubation time was fixed at 1 h for convenience.

Enzyme characterization

As shown in Fig. 2, saturability of deiodination occurs at much higher concentrations with rT_3 than with T_4 (1 μM vs. 10 nM, respectively). This suggests fundamental differences in the deiodinative pathways of these two substrates. Based on these results, we examined rT_3 deiodination between 0.5 and 2000 nM at various temperatures (12, 24, and 37 C) and at high DTT concentrations (25 mM) with the idea of distinguishing more than one enzymatic pathway. As shown in Fig. 3A, the enzyme seems to be more efficient around the physiological temperature (24 C). At this temperature, the Eadie-Hofstee analysis of the data (Fig. 3B) clearly shows two components, suggesting indeed the presence of two pathways of rT_3 ORD. One of them has a high rT_3 K_m (180 nM) and a V_{max} of 28 pmol $^{125}\text{I}/\text{mg}\cdot\text{h}$, whereas the other has a lower K_m (8 nM) and a V_{max} value of 2 pmol $^{125}\text{I}/\text{mg}\cdot\text{h}$. In contrast, T_4 -5'-deiodinase generated a single component in the Eadie-Hofstee plot, with K_m and V_{max} of 0.63 nM and 200 fmol $^{125}\text{I}/\text{mg}\cdot\text{h}$, respectively (Fig. 4). This experiment was done at 25 mM DTT (see below and Fig. 5). These results strongly suggest the presence of two pathways of ORD, one that can deiodinate both T_4 and rT_3 at low concentrations, and another that works at higher concentration that is demonstrable only with rT_3 in our assay conditions.

We then examined the effect of DTT on 5'-deiodinase activity at 200 nM rT_3 and 1 nM T_4 . Figure 5 shows that when rT_3 is the substrate, the deiodinating activity is not modified by DTT concentrations above 2.5 mM, whereas T_4 deiodination increases with DTT up to 25 mM. In experiments not

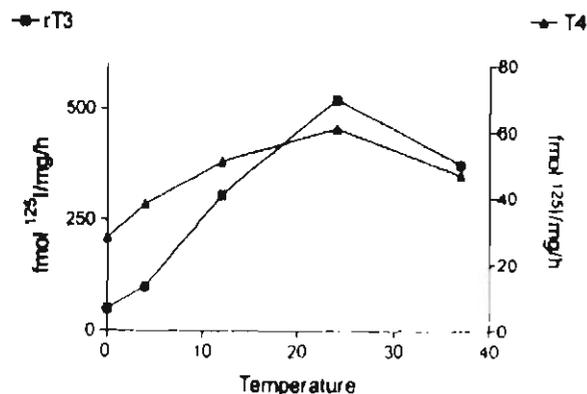


Fig. 1. Effect of assay incubation temperature on hepatic 5'-deiodinase activity. The optimal assay incubation temperature (0–37 C) was tested using 2 nM ^{125}I - rT_3 or ^{125}I - T_4 and 25 mM DTT. For both substrates, enzyme activity was higher at around room temperature. Incubations were done in triplicate for 1 h using 100 μg protein and at pH 7.

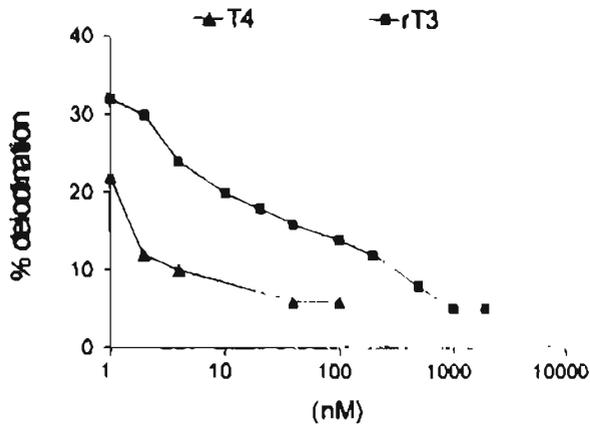


FIG. 2. Effect of substrate concentration on hepatic 5'-deiodination of outer ring-labeled ^{125}I -rT₃ or ^{125}I -T₄ by trout liver homogenates. A wide range of rT₃ and T₄ concentrations (0.5–2000 nM) was tested with 26 mM DTT, at 24°C, and otherwise as indicated in the legend to Fig. 1.

shown, DTT concentration was increased to 35 mM without further increase in activity.

To complete the characterization of the two pathways, we then examined the effect of PTU. Conditions were chosen to see the higher K_m activity with 200 nM rT₃ and 5 mM DTT, and the low K_m activity with 1 nM T₄ and 25 mM DTT. PTU effectively reduced rT₃ deiodination activity, by 50% at 1 mM and by 85–90% at 10 mM, whereas it failed to inhibit T₄ ORD at these two concentrations (Fig. 6). On the other hand, the inhibition by PTU was rT₃ concentration-dependent, because 1 mM PTU inhibited activity by less than 10% at substrate concentrations of 2 nM or less (data not shown), which is consistent with the T₄ deiodinase being the same as the second deiodinase for rT₃.

Discussion

To the best of our knowledge, this is the first study in teleosts in which rT₃ has been used to characterize hepatic 5'-deiodinase activity. Because rT₃ is a good substrate for both type I and type II deiodinases, it was more likely to allow the identification of the two types of deiodinase activities. The Eadie-Hofstee plot of data obtained with a broad range of concentrations of rT₃ shows indeed two components with K_m and V_{max} values in the range reported for mammalian type I and type II deiodinases. Furthermore, at concentrations better reflecting the high K_m component, enzyme activity has a low DTT requirement (Fig. 5) and is sensitive to inhibition by PTU (Fig. 6) in a manner akin to the mammalian type I (1, 2). The two components observed are similar to those found in rat cerebral cortex (18, 19) and in the pituitary (20), tissues that contain both type I and type II deiodinases. In contrast, ORD of ^{125}I -T₄ showed a steeper fall, with increasing T₄ concentrations (Fig. 2), and when analyzed by the Eadie-Hofstee's method, it exhibited only a single component with K_m and V_{max} values comparable with mammalian type II deiodinase. The demonstration of just one component should not be taken as an indication that a putative type I deiodinase in trout liver would not catalyze ORD of T₄. On the contrary, the single component is a re-

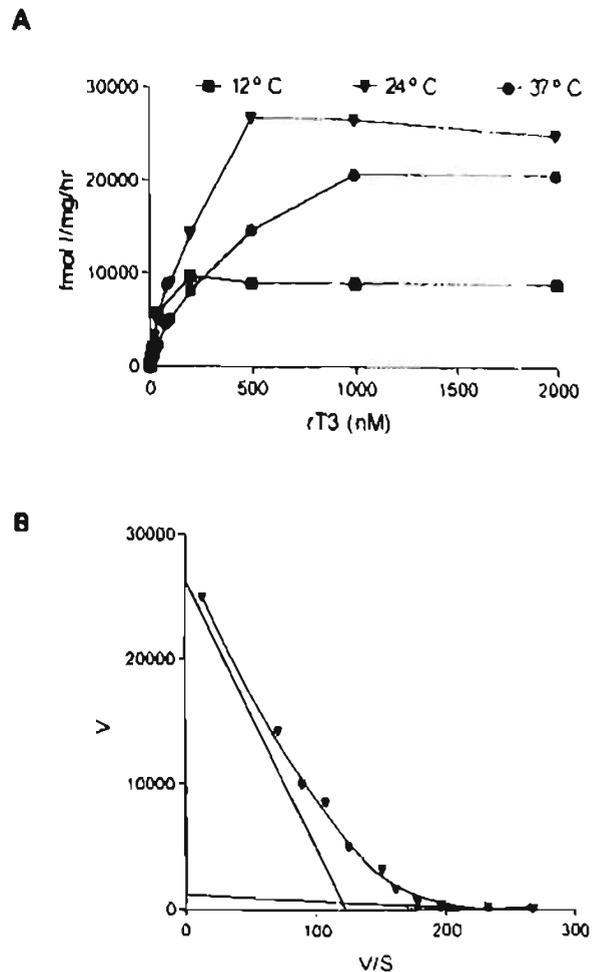


FIG. 3. Kinetics of rT₃ 5'-deiodination by trout liver homogenates. Effect of temperature reaction. Except for temperature and substrate concentrations, other incubation conditions were as indicated in Fig. 2. A, Velocity-substrate concentration plot at the indicated temperatures; B, Eadie-Hofstee analysis of data obtained at 24°C. Two components were obtained with K_m and V_{max} values of 180 and 8 nM and 28 and 2 pmol/mg-h, respectively.

fection of the relatively low type I-mediated T₄ ORD and of the limitations imposed by the specific activity of ^{125}I -T₄ to measure the release of ^{125}I when the predominant pathway of deiodination is the type II. Thus, it has been demonstrated previously that T₄-ORD can be detected in trout liver at higher substrate concentrations if the activity is measured by the production of T₃ by RIA (7, 21, 22), which would not be possible if the activity were measured by the release of ^{125}I , because, at high substrate concentrations, the fractional rate deiodination is very low (Fig. 2). In the rat liver, in contrast, type I-mediated T₄ ORD can be demonstrated both by isotopic 5'-deiodination and by T₃ RIA (23, 24). Nonetheless, as measured here, ORD of T₄ is dependent on DTT and is resistant to PTU, as reported for mammalian type II in pituitary and brain (18–20, 25).

Previous studies regarding hepatic deiodinating systems

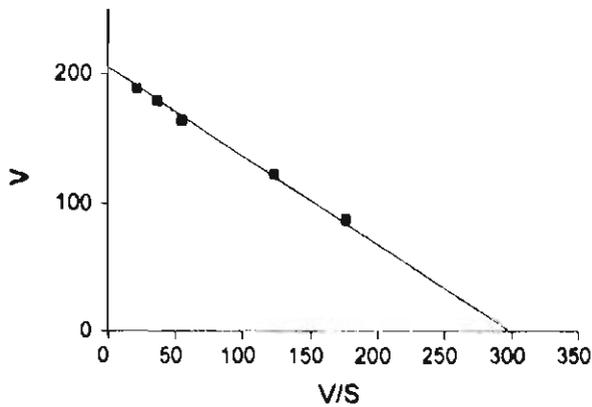


FIG. 4. Kinetics of T_4 -5'-deiodination by trout liver homogenates. Because of the low level of ^{125}I release at higher concentrations (see Fig. 2), maximal ^{125}I - T_4 concentration tested was 9 nM; otherwise, the assay conditions were as in Fig. 2. The Eadie-Hofstee plot shows one component with a K_m value of 0.63 nM and a V_{max} of 0.200 pmol/mg/h.

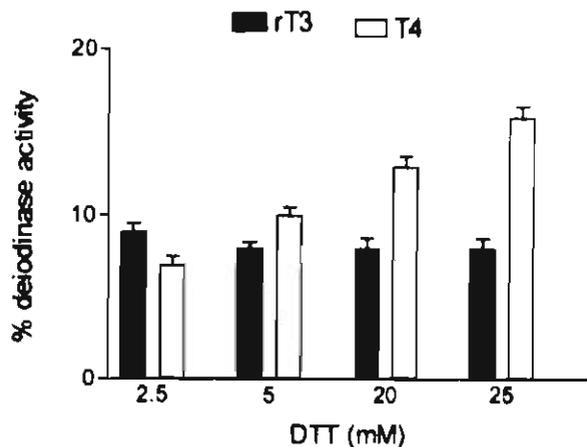


FIG. 5. Effect of DTT on rT_3 and T_4 -5'-deiodination by trout liver homogenates. The assay was performed using an isotopic solution of 200 nM ^{125}I - rT_3 or 1 nM ^{125}I - T_4 at indicated DTT concentrations; otherwise, assay conditions were as in Fig. 2. Each bar represents the mean \pm SE of ^{125}I release as percent of total counts ($n = 3$).

in teleosts have all been conducted using T_4 as substrate (6-8, 21, 22, 25, 26). The fact that total trout liver 5'-deiodinase activity saturates at low T_4 concentrations (10 nM) is probably the explanation for the previous failure to clearly identify type I activity in teleostean liver and for the observation that ORD had a low (7, 26) or ultra-low T_4 - K_m type I activity (8). Nevertheless, present results in trout liver and previous reports in tilapia kidney (22, 25) have clearly shown the presence of rT_3 -ORD activity with the kinetic characteristics of mammalian type I. Of note is the fact that, when used at high substrate concentrations, both rT_3 (present results, 22, 25) and T_4 -ORD (6) consistently exhibit a conspicuous, albeit partial, resistance to PTU.

Present results show that the V_{max} of T_4 -ORD in the euthyroid trout liver is 200 fmol ^{125}I /mg protein-h. This value is comparable with that found in hypothyroid rat pituitary and higher than the values found in hypothyroid rat brain

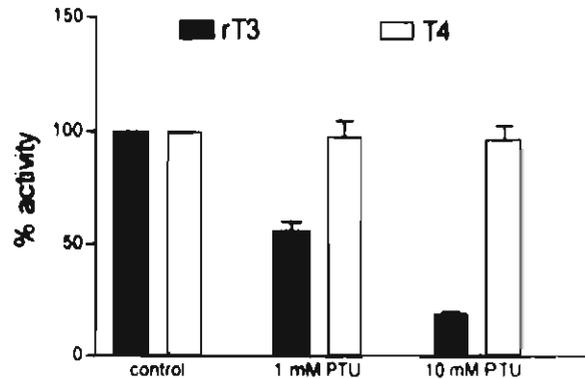


FIG. 6. Effect of PTU on rT_3 and T_4 -5'-deiodination by trout liver homogenates. Assays were performed with 200 nM ^{125}I - rT_3 or 1 nM ^{125}I - T_4 at the indicated PTU concentrations; otherwise, assay conditions were as in Fig. 2. Each bar represents the mean \pm SE of ^{125}I release as percent of total counts ($n = 3$).

(27). Altogether, these data indicate that there is abundant type II deiodinase in the trout liver. Such a high specific activity and the large size of the liver compared with brain or pituitary are likely to be germane to the high T_3 -circulating levels in the trout, despite the lack of thyroidal T_4 secretion, under normal physiological conditions (28-30). It should be noted that thyroidal T_3 secretion is higher in fasted trout (31). Nonetheless, our data do not allow a quantification of the contribution of each liver pathway to the extrathyroidally produced T_3 in the trout. Such analysis would require *in vivo* experiments beyond the scope of this paper. Furthermore, the presence of high quantities of a type II T_4 deiodinase could be relevant to the also-peculiar kinetics of T_3 in trout liver. Whereas rat liver rapidly equilibrates with plasma (32), trout liver seems to have two compartments, a fast one and a slow one (30). This latter compartment has not been explained but its kinetics of exchange with plasma are remarkably similar to the pituitary (33), cerebral cortex (34), and brown adipose tissue (35) in rats. The predominant ORD in these three tissues is type II. Moreover, calculations of free T_3 in the nucleoplasm show that very high quantities of free T_3 exist in the brain and, in general, in tissues with type II (36). These findings are consistent with the presence of a perinuclear compartment of high T_3 concentration that is dependent on the activity of type II as postulated for cerebral cortex (35). Thus, it is tempting to speculate that the peculiar kinetics of exchange of trout liver T_3 from plasma is related to the presence of abundant type II. Whether this internal compartment dilutes the incoming T_3 from plasma or is the reflection of another kind of compartmentation is something that will have to be investigated.

Previous studies have reported the presence of type II activity in embryonic chicken liver (4), as well as in embryonic rat liver (Aceves C, unpublished data from our laboratory). The finding of abundant type II in adult trout liver makes these observations even more interesting because the expression of type II in embryonic bird and mammal livers may be reflecting an evolutionary pattern.

Acknowledgments

We gratefully thank Dr. Donald L. St Germain for his invaluable comments and critical reviews of this manuscript.

References

- Köhrlé J, Hesch RD, Leonard JL 1991 Intracellular pathways of iodothyronine metabolism. In: Braverman LE, Utiger RD (eds) *The Thyroid*, ed. 6. J.B. Lippincott Company, Philadelphia, pp 144-189
- Köhrlé J 1994 Thyroid hormone deiodination in target tissues - a regulatory role for the trace element selenium? Review. *Exp Clin Endocrinol* 102:63-89
- St Germain DL 1994 Iodothyronine deiodinases. *Trends Endocrinol Metab* 5:36-42
- Valverde-R C, Aceves C, Reyes ZE 1993 Ontogenesis of iodothyronine deiodinase activities in brain and liver of the chick embryo. *Endocrinology* 132:867-872
- Gallon VA, Hiebert A 1987 Hepatic iodothyronine 5'-deiodinase activity in *Rana catesbeiana* tadpoles at different stages of the life cycle. *Endocrinology* 121:42-47
- Shields CA, Eales JG 1986 Thyroxine 5'-monodeiodinase activity in hepatocytes of rainbow trout, *Salmo gairdneri*: distribution, effect of starvation, and exogenous inhibitors. *Gen Comp Endocrinol* 63:334-343
- Vijayan MM, Flett PA, Leatherland JF 1988 Effect of cortisol on the *in vitro* hepatic conversion of thyroxine to triiodothyronine in brook charr (*Salvelinus fontinalis* Mitchell). *Gen Comp Endocrinol* 70:312-318
- MacLatchy DL, Eales JG 1992 Properties of T₄ 5'-deiodinating systems in various tissues of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Gen Comp Endocrinol* 86:313-322
- Berry MJ, Banu L, Larsen PR 1991 Type I iodothyronine deiodinase is a selenocysteine-containing enzyme. *Nature* 349:438-440
- St Germain DL, Schwartzman RA, Croteau W, Kanamori A, Wang Z, Brown DD, Gallon VA 1994 A thyroid hormone-regulated gene in *Xenopus laevis* encodes a type III iodothyronine 5-deiodinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:7677-7771. Correction: *ibid* 91:11282
- Croteau W, Whitmore S, Schneider MJ, St Germain DL 1995 Molecular cloning and expression of a cDNA for a mammalian type III iodothyronine deiodinase. *J Biol Chem* 270:16569-16575
- Davey JC, Becker KB, Schneider MJ, St Germain DL, Gallon VA 1995 Cloning of a cDNA for the type II iodothyronine deiodinase. *J Biol Chem* 270:26786-26789
- García E 1988 Modificaciones al sistema Köppen. *Offset Larios S.A. México*, ed. 4, pp 9-18
- Leonard JL, Rosenberg IN 1980 Thyroxine 5'-deiodinase from rat kidney: substrate specificity and 5'-deiodinations of reverse triiodothyronine. *Endocrinology* 107:1376-1383
- Bradford M 1976 A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254
- Hofstee BHJ 1952 On the evaluation of the constants V_{max} and K_m in enzyme reactions. *Science* 116:329-331
- Rosaa Moreno M 1983 *Biología acuática y piscicultura en México*. Editorial Limusa, México, pp 90-257
- Visser TJ, Leonard JL, Kaplan MM, Larsen PR 1981 Different pathways of iodothyronine 5'-deiodination in rat cerebral cortex. *Biochem Biophys Res Commun* 101:1297-1304
- Visser TJ, Leonard JL, Kaplan MM, Larsen PR 1982 Kinetic evidence suggesting two mechanisms for iodothyronine 5'-deiodination in rat cerebral cortex. *Proc Natl Acad Sci USA* 79:5060-5064
- Silva JE, Leonard JL, Cranitz FR, Larsen PR 1982 Evidence for two tissue-specific pathways for *in vitro* thyroxine 5'-deiodination in the rat. *J Clin Invest* 69:1176-1184
- Leatherland JF, Fabridge KJ 1992 Chronic fasting reduces the response of the thyroid to growth hormone and TSH, and alters the growth hormone-related changes in hepatic 5'-monodeiodinase activity in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Gen Comp Endocrinol* 87:342-353
- Byamungu N, Mol K, Kühn ER 1992 Evidence for the kidney as an important source of 5'-monodeiodination activity, and stimulation by somatostatin in *Oreochromis niloticus* L. *Gen Comp Endocrinol* 88:199-208
- Kaplan MM, Utiger RD 1978 Iodothyronine metabolism in rat liver homogenates. *J Clin Invest* 61:459-471
- Chopra IJ 1977 A study of extrathyroidal conversion of thyroxine (T₄) to 3, 3', 5'-triiodothyronine (T₃) *in vitro*. *Endocrinology* 101:453-463
- Mol K, Kaptein E, Darras VM, de Greef WJ, Kühn ER, Visser TJ 1993 Different thyroid hormone-deiodinating enzymes in tilapia (*Oreochromis niloticus*) liver and kidney. *FEBS Lett* 321:140-144
- Motin PP, Hars TJ, Eales JG 1993 Thyroid hormone deiodination in brain, liver, gill, heart and muscle of atlantic salmon (*Salmo salar*) during photoperiodically-induced parr-amolt transformation. I. Outer and inner ring thyroxine deiodination. *Gen Comp Endocrinol* 90:142-156
- Leonard JL, Silva JE, Kaplan MM, Mellen SA, Visser TJ, Larsen PR 1984 Acute posttranscriptional regulation of cerebrocortical and pituitary iodothyronine 5'-deiodinases by thyroid hormone. *Endocrinology* 114:1008-1014
- Eales JG 1985 The peripheral metabolism of thyroid hormones and regulation of thyroidal status in poikilotherms. *Can J Zool* 63:1217-1231
- Orozco A, Ruiz JA, Valverde-R C 1992 The importance of employing homologous serum free of thyronines in radioimmunoassays to assess circulating thyroid hormones in rainbow trout. *Rev Estud Med Biol* 40:41-47
- Weirich RT, Schwartz HL, Oppenheimer JH 1987 An analysis of the interrelationship of nuclear and plasma triiodothyronine in the sea lamprey, lake trout and rat: evolutionary considerations. *Endocrinology* 120:664-677
- Selkow AJ, DiStefano JJ, Himmick BA, Bruwn SB, Eales JG 1986 Kinetic analysis of thyroid hormone secretion and interconversion in the 5-day-fasted rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Gen Comp Endocrinol* 101:123-138
- Oppenheimer JH, Schwartz HL, Surks MI 1974 Tissue differences in the concentration of triiodothyronine nuclear binding sites in the rat: liver, kidney, pituitary, heart, brain, spleen and testis. *Endocrinology* 95:897-903
- Silva JE, Larsen PR 1978 Contributions of plasma triiodothyronine and local thyroxine monodeiodination to triiodothyronine and nuclear triiodothyronine receptor saturation in pituitary, liver and kidney of hypothyroid rats: further evidence relating saturation of pituitary nuclear triiodothyronine receptors and the acute inhibition of thyroid-stimulating hormone release. *J Clin Invest* 61:1247-1259
- Silva JE, Matthews PS 1984 Production rates and turnover of triiodothyronine in rat-developing-cerebral cortex and cerebellum: responses to hypothyroidism. *J Clin Invest* 74:1035-1049
- Bianco AC, Silva JE 1987 Nuclear T₃ in brown adipose tissue: Receptor occupancy and sources of T₃ as determined by *in vitro* techniques. *Endocrinology* 120:55-62
- Oppenheimer JH, Schwartz HL 1985 Stereospecific transport of triiodothyronine from plasma to cytosol and from cytosol to nucleus in rat liver, kidney, brain, and heart. *J Clin Invest* 75:147-154

Cloning and Expression of a 5'-Iodothyronine Deiodinase from the Liver of *Fundulus heteroclitus**

CARLOS VALVERDE-R, WALBURGA CROTEAU, GARY J. LAFLEUR, JR.,
AUREA OROZCO, AND DONALD L. ST. GERMAIN

Universidad Nacional Autonoma de Mexico (C.V.R., A.O.), Mexico 04510 D. F.; Departments of
Medicine and Physiology (W.C., D.L.S.), Dartmouth Medical School, Lebanon, New Hampshire 03756;
and The Whitney Laboratory (G.J.L.), University of Florida, St. Augustine, Florida 32086

ABSTRACT

Recent molecular cloning studies in mammals and amphibians have demonstrated that the types I, II, and III deiodinases constitute a family of selenoproteins of critical importance in metabolizing T_4 to active (*i.e.* T_3) and inactive (*i.e.* rT_3) metabolites. In several tissues of teleost fish, various deiodinase precursors have been described, but the structural and functional characteristics of these enzymes and their relationship to the deiodinases present in higher vertebrates remains uncertain. Using a complementary DNA library derived from the liver of the teleost *Fundulus heteroclitus*, we have identified a complemen-

tary DNA that codes for a deiodinase with functional characteristics virtually identical to those of the mammalian and amphibian type II deiodinase. Sequence analysis demonstrates a high degree of homology at both the nucleotide and predicted amino acid levels between the *Fundulus* clone and those previously characterized type II enzymes, including the presence of an in-frame TGA codon that codes for selenocysteine. These findings demonstrate that the deiodinase family of selenoproteins has been highly conserved during vertebrate evolution and underscores their importance in the regulation of thyroid hormone action. (*Endocrinology* 138: 642-648, 1997)

THE THYROID axis in fish is similar in many respects to that in higher vertebrates. Such similarities extend to certain actions of thyroid hormones involved in the regulation of development, growth, and reproduction in this species (1-4). Furthermore, thyroid hormone receptors in fish are highly homologous to those present in mammals and share the same preferential affinity for T_3 as compared with other iodothyronines (5, 6). However, there is evidence that the thyroid follicles in trout and other teleosts secrete predominantly, if not exclusively, T_4 (5, 7), implying that circulating and tissue levels of the metabolically more active compound T_3 are derived primarily in these species from the 5'-deiodination of T_4 in extrathyroidal tissues.

The deiodination of iodothyronines is catalyzed by a family of selenoenzymes that have differing catalytic properties and are expressed in both tissue-specific and developmentally-specific fashions (8). Information concerning the biochemical properties of these enzymes are derived primarily from studies in mammals and amphibians. Two deiodinases, the types I (DI) and II (DII), serve an activating role by converting T_4 to T_3 by 5'-deiodination, whereas the type III deiodinase (DIII) facilitates 5-deiodination, which converts T_4 and T_3 to inactive metabolites (rT_3 and 3, 3'-diiodothyronine (T_2), respectively). Similar processes of deiodination have also been reported in fish (5, 9). In particular, both DI- and DII-like activity have recently been reported in certain teleost species [Orozco, A., J. Silva, and C. Valverde-R, submitted for publication and (10)]. For example, our recent

studies in *Fundulus heteroclitus*, a small estuarine teleost native to North America (11), have shown that the liver of this species contains high levels of DII-like activity (10).

Complementary DNAs (cDNAs) for the DI, DII, and DIII from several mammalian and amphibian species have recently been identified (12-20). To date, however, little is known of the structural and molecular features of the enzymes catalyzing deiodination in fish. Given the apparent primacy in fish of extrathyroidal 5'-deiodination in the generation of circulating and tissue T_3 , we sought to identify a cDNA that codes for a fish 5'-deiodinase. We report herein the successful identification and expression of such a cDNA from a *F. heteroclitus* liver cDNA library.

Materials and Methods

cDNA library screening

A λ gt10 cDNA library was prepared using poly(A)⁺ RNA derived from a pool of five livers from male *F. heteroclitus* treated with estradiol-17 β . The preparation of this library has previously been described (21) and used tissue from estrogen-treated animals so as to enhance the representation of vitellogenin cDNAs. The library was screened by plaque hybridization under low stringency conditions according to the methods of Ivers *et al.* (22). The first 305 nucleotides of the coding region of an amphibian DII cDNA (RC5'DII) and a 714-nucleotide rat DI cDNA (6b-short) that encompasses 92% of the coding region of that enzyme were used together as probes in the initial screening protocol. Details concerning the isolation and structures of these cDNAs have previously been published (19, 23). Positive plaques were detected by autoradiography and purified by additional rounds of screening using the hybridization conditions described above and either the amphibian DII or rat DI cDNAs separately as probes. cDNA inserts from the positive clones were amplified by PCR using vector-based primers. (PCR amplification was necessitated by the loss of the *Eco*RI restriction enzyme sites in the λ gt10 vector during the library construction process.) The PCR reaction mixture of a selected clone (designated FhDII) was then subjected to agarose gel electrophoresis and the reaction product purified using the QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Chatsworth, CA) and subcloned

Received August 15, 1996.

Address all correspondence and requests for reprints to: Donald L. St. Germain, M.D., Dartmouth Medical School, One Medical Center Drive, Lebanon, New Hampshire 03756. E-mail: stgermain@dartmouth.edu.

* These studies were supported by the NIH in the form of Grants DK-42271 and the Norris Cotton Cancer Center Core Grant CA-23108.

into pBluescript using the pCR-Script Cloning Kit (Stratagene, La Jolla, CA). The cDNA insert was sequenced on both strands using vector-based and gene-specific primers and an automated sequencing system with fluorescent dye terminators (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Radiolabeled cDNA probes for library screening and Northern analysis were prepared as previously described (20).

The hydrophobicity profile of the FhDII protein was performed using the Kyte-Doolittle method with the MacDNASIS Pro computer program (Hitachi Software Engineering, San Bruno, CA), whereas prediction of the transmembrane domain was made using the TopPred II program (24).

Preparation of a chimeric FhDII cDNA

A chimeric cDNA was constructed by splicing part of the 3'-untranslated region of the full length rat DIII cDNA (rNS43-1), which contains an active selenocysteine insertion sequence (SECIS) element, to the 3' end of the coding region of the FhDII cDNA using overlap PCR methods analogous to those previously described (20). The entire coding region of the FhDII cDNA remained intact in this construct. The splice region of the chimeric cDNA was sequenced to ensure the accuracy of the construction method.

Expression studies in COS-7 cells

For expression in COS-7 cells, the FhDII chimera cDNA was subcloned into the pcDNA3 mammalian expression vector (Invitrogen, San Diego, CA). cDNAs for the rat DI (G21, kindly provided by Drs. M. Berry and P. R. Larsen, Boston MA), rat DII (rBAT1-1 chimera), and amphibian DIII (XL-15) were subcloned into the same vector as previously described (20). COS-7 cells were cultured and transfected as previously described (20), then maintained in culture medium for 48 h before harvesting. After aspiration of the medium, cell monolayers were washed twice with PBS, and the cells then scraped from the dish, pelleted, and sonicated in 0.25 M sucrose, 0.02 M Tris/HCl, pH 7.4.

$5'D$ and $5D$ activities were determined in COS-7 cell sonicates according to published methods (25, 26). For the $5'D$ assay, the reaction buffer contained 1 mM EDTA. In kinetic studies using rT_3 and T_4 , $5'D$ activity was determined during a 1-h incubation in a 50 μ l reaction mixture containing 2 μ g of sonicate protein and either 0.5–6 nM ^{125}I - rT_3 or ^{125}I - T_4 as substrate. In these reactions, dithiothreitol at a concentration of 20 mM was used as cofactor. The extent of substrate utilization was less than 52%. To correct for this degree of substrate utilization in kinetic studies, average substrate concentrations during the incubation mixture were used in the analysis as detailed by Lee and Wilson (27). Kinetic constants were determined from double reciprocal or Eadie-Hofstee plots (28).

In other experiments, the $5'$ -deiodinase activity in sonicates from COS-7 cells transfected with the G21 rat DI cDNA (13), the BAT1-1 rat DII cDNA (20) or the FhDII cDNA were determined at different assay incubation temperatures, or in the absence or presence of PTU (10–100 μ M) or aurothioglucose (0.01–10 μ M). In these assays, deiodinase activity was measured during a 1 h (for temperature studies) or 2 h (for PTU and aurothioglucose studies) incubation using 1.5 nM ^{125}I - rT_3 as substrate and 20 mM dithiothreitol as cofactor. Substrate utilization was less than 35% in these studies.

Initial studies employing T_3 as substrate used 1 nM ^{125}I - T_3 , 50 mM dithiothreitol as cofactor, and a 2-h incubation period. For kinetic studies with T_3 , a 1-h incubation period, 25 μ l reaction volume containing 20 μ g of sonicate protein, 20 mM DTT, and 0.5–15 nM or 15–1000 nM ^{125}I - T_3 were used. Substrate utilization was less than 25%.

^{125}I -labeled iodothyronines were obtained from du Pont de Nemours (Boston, MA) and purified by chromatography using Sephadex LH-20 (Sigma, St. Louis, MO) before use. Protein concentrations were determined by the method of Bradford (29) with reagents obtained from Bio-Rad (Richmond, CA).

RNA Preparation and northern analysis

RNA was prepared as previously described (21) from livers of male *F. heteroclitus*. Poly(A)⁺ RNA was isolated by two cycles of chromatography over oligo(dT)-cellulose (Collaborative Biomedical Products, Bedford, MA). RNA gel electrophoresis, transfer to nylon membranes, hy-

bridization and washing of Northern blots were performed as previously described for rat tissues (30) with the final wash performed at 60 C. The FhDII cDNA was used as the probe, and the blots were exposed to x-ray film for 1 week.

Results

The *F. heteroclitus* cDNA library was initially screened at low stringency with radiolabeled probes derived from the coding regions of both a rat DI and a *R. catesbeiana* DII cDNAs. Four positive clones were isolated, all of which hybridized only with the RC5'DII cDNA probe on subsequent screenings. No clones reacting with the rat DI probe were identified. (The effects of estradiol treatment on deiodinase expression in *F. heteroclitus* liver are at present unknown but could have influenced the relative abundance in the library of either the DI- or DII-type cDNAs.) Each of the four positive isolates were demonstrated by PCR amplification to contain a cDNA insert of the same size [\sim 1 kilobase pair (kb)]. The nucleotide sequence of one of these cDNAs (designated FhDII) was determined and is shown in Fig. 1A. An open reading frame, 798 bp in length, extends from nucleotides #132-929 and codes for a protein with a predicted molecular mass of 29.6 kDa. Included in the open reading frame is an in-frame TGA triplet at codon #134 (nucleotide nos. 531-533) that is predicted, like the other deiodinase cDNAs isolated to date (13-20), to code for selenocysteine. A comparison of the FhDII with DII cDNAs isolated from *R. catesbeiana* (19), rat, and human (20) reveals 65–68% nucleotide homology within the coding region and the same percentage of amino acid identity (Fig. 1B). In contrast, homology to DI and DIII cDNAs from several mammalian and amphibian species is considerably lower (less than 50% nucleotide conservation and only 30% amino acid identity). Nonetheless, several structural features of the FhDII protein are common to all types of deiodinases including, the highly conserved region surrounding the selenocysteine residue, two histidine residues at amino acid nos. 166 and 186 (31), and a highly hydrophobic region in the amino terminus that is predicted to form a membrane spanning domain encompassing residue nos. 8–28 (Fig. 1C).

Although the 3' end of the FhDII cDNA contains a stretch of 15 adenosines, no upstream polyadenylation signal is present, and hence this may not represent a true poly(A)⁺ tail but rather may have resulted during library construction from the oligo(dT)-priming of first strand synthesis from a region of the messenger RNA (mRNA) rich in adenosines. This is relevant because the 3'-untranslated region of the FhDII clone is only 53 nucleotides in length and does not contain a consensus SECIS element as required for the incorporation of selenocysteine during translation (32). In the absence of such an element, attempts at expression of this clone would be predicted to result in a truncated, inactive protein in that translation would terminate at the TGA codon. This indeed proved to be the case in that transfection of COS-7 cells with the FhDII cDNA failed to induce expression of deiodinase activity. Thus, to express and characterize the full length FhDII protein, a chimeric cDNA was constructed by replacing most of the short 3' untranslated region of the FhDII clone with the corresponding region of the NS43-1 rat DIII cDNA, which contains an active SECIS ele-

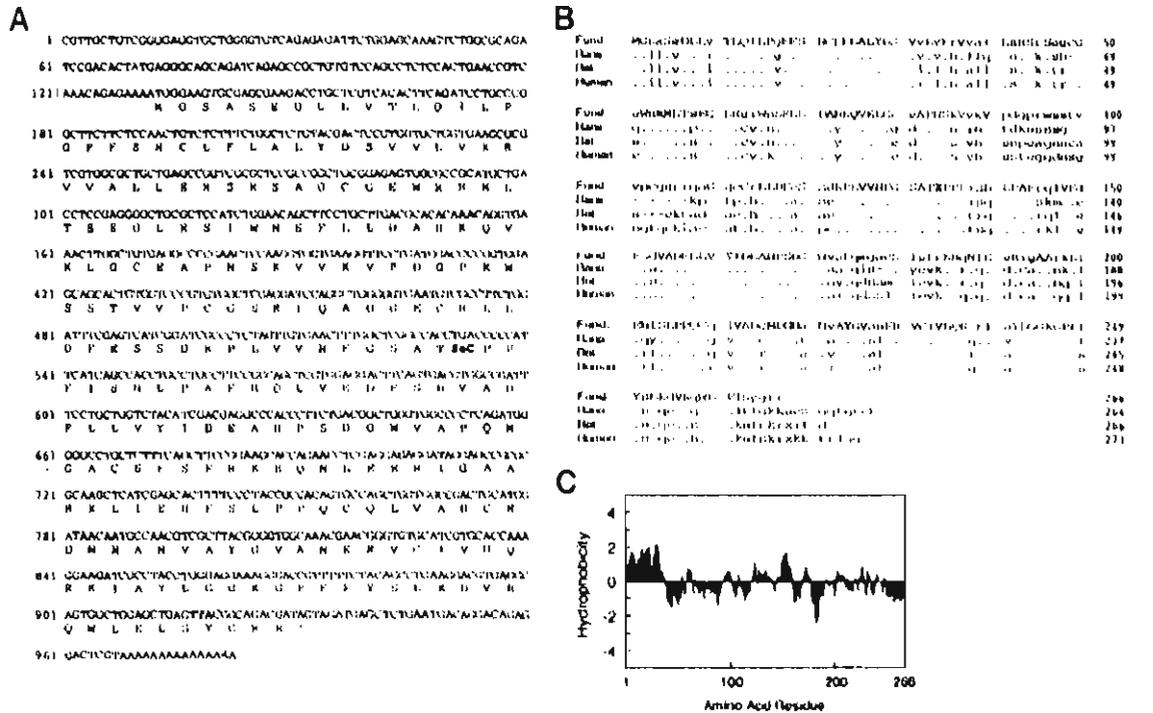


Fig. 1. A, Nucleotide and predicted amino acid sequence for the FhDII cDNA. The in-frame TGA codon is designated as coding for selenocysteine (SeC). B, Comparison of the deduced amino acid sequence of the FhDII protein with the sequence of the *R. catesbeiana* (RC5'DII), rat (rBAT 1-1) and human (h244085) DII proteins. X = selenocysteine. *Dots* indicate identical residues, whereas *dashes* indicate gaps in the sequence. C, Hydrophobicity plot of the FhDII protein.

ment. The chimeric cDNA was then transfected into COS-7 cells for functional studies.

Initial studies in COS-7 cell sonicates demonstrated that transfection with the FhDII chimeric cDNA induced significant levels of 5'-deiodination (52% deiodination of 1 nM radiolabeled rT_3 during a 2-h incubation at 37°C; velocity = 29 fmol/min/mg protein). In comparison, expression and assay of the G21 rat DI cDNA in the same experiment induced a considerably higher level of activity (velocity = 283 fmol/min/mg protein), a finding consistent with previous activity comparisons between other DII cDNAs and the G21 clone (20). [We have shown previously that COS-7 cells transfected with the empty pcDNA3 vector contain undetectable levels of 5'-deiodinase activity (20).]

Kinetic analysis of the FhDII-induced 5'-deiodinase activity using T_4 and rT_3 as substrates demonstrated low K_m values (0.5 and 1.0 nM, respectively) typical of a DII (Fig. 2). The V_{max} value using rT_3 as substrate was approximately twice the value observed with T_4 , resulting in V_{max}/K_m ratios that were equivalent for both substrates. Thus, the FhDII enzyme appears to catalyze the 5'-deiodination of T_4 and rT_3 with equal efficiency.

The ability of the FhDII deiodinase to catalyze 5-deiodination was investigated using 3H -labeled on the outer ring at the 3'- or chemically equivalent 5'-position, as substrate and an ascending paper chromatography method for the quantitation of reaction products (33). No radiolabeled T_2 was detected as a product in these reactions indicating that

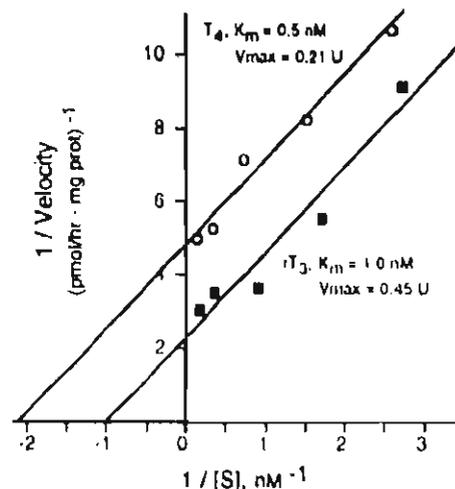


Fig. 2. Kinetic analysis of the expressed FhDII chimeric deiodinase activity. Analysis by double reciprocal plot using T_4 or rT_3 as substrates in COS-7 cell sonicates. V_{max} values are expressed in units of activity where 1 U = 1 pmol/min · mg protein.

catalysis at the 5-position is not a feature of this enzyme (Fig. 3). Such results are again consistent with the properties of a DII. As a positive control, abundant T_2 formation (~90% conversion of T_3 to T_2) was obtained in COS-7 cell sonicates

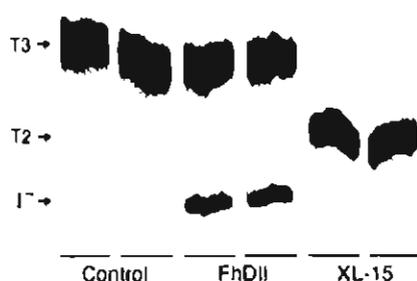


FIG. 3. Diiodinase reaction products formed during a 2-h incubation with ^{125}I - T_3 (1 nM) as substrate and dithiothreitol (50 mM) as co-factor in sonicates of transfected COS-7 cells. Shown is an autoradiograph of the ascending paper chromatography strips used for the product analysis (33). Duplicate strips are shown for each sonicate. Control, tissue-free reaction mixtures; FhDII, sonicates of COS-7 cells transfected with the FhDII chimera; XL-15, sonicates of COS-7 cells transfected with the XL-15 amphibian DIII cDNA. The location of T_3 , T_2 and iodide peaks are shown in the margin.

expressing the XL-15 amphibian DIII cDNA. An unexpected finding in these studies was that considerable iodide (representing 18% of the radioactive T_3 substrate added) was formed in the FhDII assay mixture indicating that outer ring, or 5', deiodination of T_3 was occurring (Fig. 3). In contrast, no iodide formation occurred in the XL-15 sonicate mixture.

Confirmation of the ability of the FhDII enzyme to 5'-deiodinate T_3 was sought by using ion exchange chromatography to separate the reaction products (25). As shown in Fig. 4, 40% of the T_3 added as substrate was deiodinated at the 5'-position by the *Fundulus* enzyme, whereas minimal or no iodide formation was noted in sonicates from cells transfected with cDNAs for the rat DI (G21), the rat DII (rBAT1-1 chimera), or an amphibian DIII (XL-15). (As noted above, and previously (20), these sonicates demonstrated very high levels of 5'-deiodinase activity (rat DI and rat DII) when $r\text{T}_3$ was used as substrate, or 5'-deiodinase activity (XL-15) when assayed using T_3 , indicating that the relevant deiodinases were expressed in these sonicates.)

The results of a kinetic analysis of 5'-deiodinase activity with T_3 as substrate is shown using an Eadie-Hofstee plot in Fig. 5 and compared with the kinetic data for T_4 cited above. The K_m for T_3 was considerably higher (340 nM) than for T_4 or $r\text{T}_3$, and although a higher V_{max} value was observed, the V_{max}/K_m ratio was markedly lower than for the other two substrates (0.005 for T_3 vs. 0.4 for T_4 and $r\text{T}_3$).

The sensitivity of the FhDII deiodinase to inhibition by 6*n*-propyl-2-thiouracil (PTU) and aurothioglucose (ATHG) is shown in Fig. 6. Analogous to amphibian and mammalian DIIs (19, 20), the *Fundulus* enzyme, when compared with the expressed rat DI (G21), was markedly resistant to inhibition by PTU and 10-fold less sensitive to the effects of ATHG.

Because *F. heteroclitus* is a poikilotherm, the temperature sensitivity of the FhDII deiodinase was determined *in vitro*. As shown in Fig. 7, maximal 5'-deiodinase activity was observed at 37°C, similar to the pattern observed with the expressed rat DI and DII enzymes.

A Northern blot of total and poly(A)⁺ RNA derived from *F. heteroclitus* liver was probed with the FhDII cDNA (Fig. 8). In the lane containing total RNA, hybridization occurred

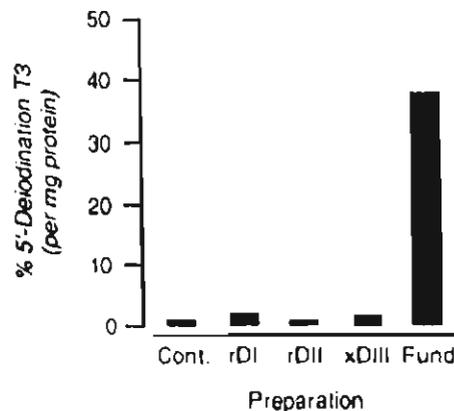


FIG. 4. 5'-Deiodinase activity determined during a 2-h incubation using ^{125}I - T_3 (1 nM) as substrate and dithiothreitol (50 mM) as cofactor. Iodide formation was quantified using ion exchange chromatography (25) of reaction mixtures utilizing sonicates of COS-7 cell transfected with empty pcDNA3 vector (Cont.), G21 rat DI, rBAT1-1 chimera rat DII, XL-15 amphibian DIII, or FhDII chimera cDNAs. Values represent the means of closely agreeing duplicate assay determinations and are expressed as the percentage of the substrate T_3 deiodinated. Values are normalized for the differing amounts of protein in the sonicate preparations.

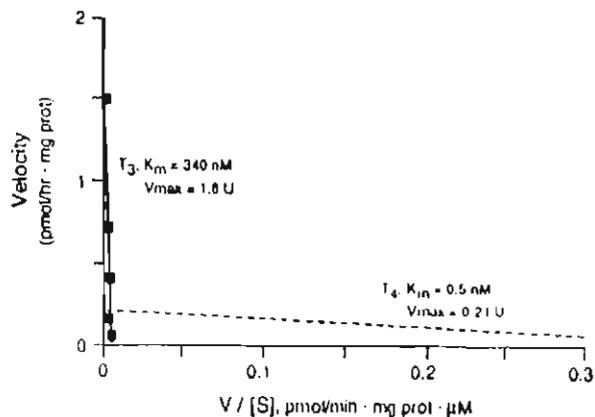


FIG. 5. Kinetic data of the expressed FhDII chimera deiodinase activity using T_3 as substrate and analyzed by Eadie-Hofstee plot. The same COS-7 cell sonicate preparation used in the experiments shown in Fig. 2 was used in this study. For comparison, the kinetic data derived using T_4 as substrate, and previously shown in Fig. 2, is plotted on this figure as a dashed line. V_{max} values are expressed in units of activity where 1 U = 1 pmol/min/mg protein.

predominantly to a 1.3-kb RNA species, with a fainter band at 6 kb noted. In the poly(A)⁺ lane, hybridization occurred only to the larger RNA species.

Discussion

Using a cDNA library prepared from *F. heteroclitus* liver RNA, we have isolated the first cDNA coding for a fish deiodinase and have demonstrated using a chimeric cDNA construct that the catalytic properties of the expressed enzyme are remarkably similar to the previously characterized amphibian and mammalian DII enzymes (19, 20). Further-

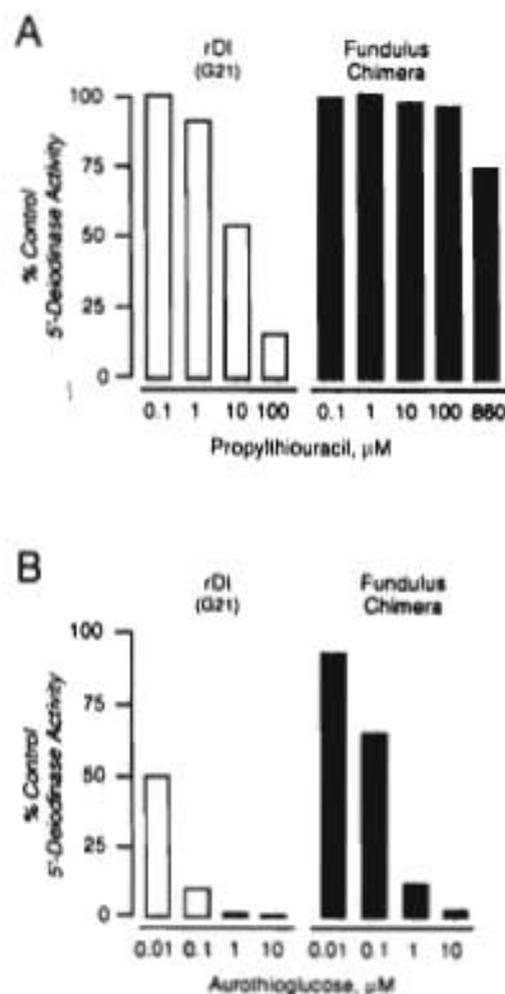


FIG. 6. Sensitivity of the G21 rat DI and FhDI chimera deiodinases to the inhibitory effects of (A) PTU and (B) aurothioglucose. COS-7 cells were transfected with either the G21 or the FhDI chimera cDNA and assays performed in cell aliquots in the absence or presence of the concentrations of inhibitors shown. Values of 100% represent the results of control incubations performed in aliquots of the same aliquot preparations in the absence of inhibitors.

more, the FhDI cDNA and protein are highly homologous to these DI enzymes from other species.

The *F. heteroclitus* is an excellent model for conducting these studies in that it poses many features typical of teleosts (21). In addition, thyroid function has been studied in this species and a marked seasonal variation in T_4 secretion has been noted (34), as is true of many fish species (35, 36). In addition, we have recently characterized the deiodinase activity in the *F. heteroclitus* liver and have demonstrated the presence of both DI and DII-like activity (10). Studies of 5'-deiodination in liver homogenates of other fish species by different investigators have yielded somewhat conflicting data on the characteristics of the deiodinase activities present in this tissue. However, Eales and colleagues (37, 38) have consistently demonstrated a low K_m DII-like activity in the

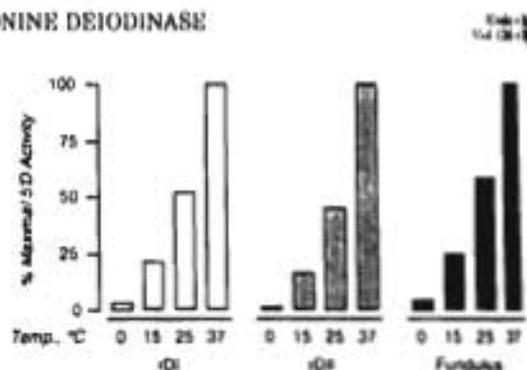


FIG. 7. A comparison of the thermal activation profiles of the rat DI (G21), rat DII (rBAT1-1 chimera) and FhDI chimera deiodinases. 5'-Deiodinase activity was determined *in vitro* in aliquots of transfected COS-7 cells at the temperatures indicated. Results represent the mean of closely agreeing duplicate assay determinations. Values of 100% represent the maximally observed rates of deiodination that occurred at 37 $^{\circ}\text{C}$ for each of the aliquot preparations and amounted to 20–30% of the substrate present in the assay mixture. Activities at other temperatures are expressed as a percentage of this maximal value for each aliquot.

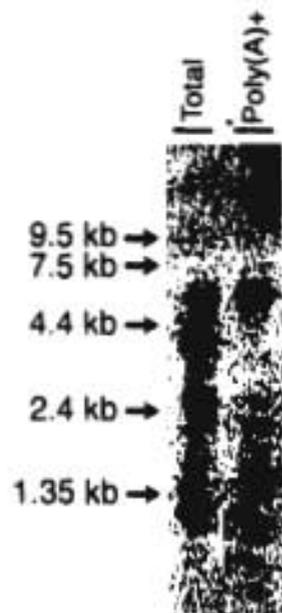


FIG. 8. Northern analysis using the FhDI cDNA as a probe of total (20 μg) and poly(A)⁺ RNA (2 μg) derived from male *F. heteroclitus* liver.

liver of rainbow trout, and we have recently confirmed this finding and also demonstrated the presence of DI-like activity in this tissue (Orozco, A., J. Silva, and C. Valverde-R, submitted for publication). It is notable that the functional characteristics of the FhDI deiodinase match closely with the DI-like activities defined in *Fundulus* and trout liver and other tissues, suggesting that this cDNA, and its homologues, which are presumably present in other teleost species, indeed code for these enzymes.

The functional activity of the FhDI as expressed in COS-7 cells is typical of a DII (39). Thus, this enzyme demonstrates a K_m value for T_4 and rT_4 in the nanomolar range when using

DTI as the thiol cofactor, and it catalyzes the 5'-deiodination of both these substrates with approximately equal efficiency. Furthermore, the FhDII deiodinase is resistant to inhibition by high concentrations of PTU and demonstrates diminished sensitivity to AThG as compared with the mammalian DI. The structural features of the FhDII correlate well with these functional characteristics in that the cDNA and predicted amino acid sequences are most homologous to the DII subfamily of deiodinases. In particular, the FhDII cDNA contains an alanine at amino acid no. 132, which is two residues toward the amino terminus from the selenocysteine. The presence of an alanine at this position has been a feature of all of the DII proteins characterized to date (19, 20). In contrast, the DI and DIII enzymes contain a cysteine in this location. The functional significance of this difference in structure is as yet uncertain.

An unexpected structural feature of the rat and human DII cDNAs is the presence of a second in-frame TGA codon located just 5' to an unambiguous TAG (rat) or TAA (human) stop codon (20). Whether this TGA codes for a second selenocysteine residue in these proteins is uncertain, and could depend on the selenium status of the cell. This downstream TGA codon is not present in the FhDII cDNA, however. In this respect, the FhDII more closely resembles the *R. catesbeianus* DII, which also contains only a single TGA codon (19). This suggests that incorporation of a second selenocysteine is not essential for DII activity, a finding that we have recently confirmed by demonstrating that mutagenesis of the second TGA codon to TAA in the rat DII cDNA does not alter the functional activity of this enzyme (Croteau and St. Germain, unpublished data). However, the essential nature of the first selenocysteine to the catalytic activity of this family of enzymes has clearly been demonstrated by us (15, 16, 19) and other investigators (13, 40); mutagenesis of this residue to cysteine either renders the enzyme inactive or reduces the catalytic efficiency by 1000-fold. The presence of selenocysteine in the FhDII enzyme demonstrates its conservation through vertebrate evolution, and thus further emphasizes the requirement of this rare amino acid for efficient catalysis of the reductive deiodination reaction.

Incorporation of selenocysteine into proteins occurs during translation and requires the presence of a specific stem loop structure (the SECIS element) in the 3'-untranslated region of the mRNA (41). The 1-kb FhDII cDNA is shorter than the corresponding 1.3- and 6-kb RNA species identified in *Fundulus* liver by Northern analysis and appears to have a truncated 3'-untranslated region that lacks such a SECIS element. Thus the relative efficiency of translation of the FhDII when utilizing its native SECIS element is unknown and may differ from that of the chimeric cDNA construct used in these studies.

The hybridizing 1.3-kb RNA seen in the total RNA sample was not present when poly(A)⁺ RNA was used indicating that this short RNA lacks a poly(A)⁺ tail. Its presence suggests that alternative mRNA processing may be involved in regulating the expression of DII in this tissue. The 6-kb species, however, is similar in size to the predominant DII RNA species identified in samples of poly(A)⁺ RNA prepared from several mammalian tissues (20) but is larger than the predominant 1.5-kb mRNA present in *R. catesbeianus* (19). In

contrast, the mRNAs coding for the DI and DIII enzymes are approximately 2 kb in size (12, 16).

The FhDII deiodinase demonstrates a unique functional activity: namely, its ability to catalyze, albeit with relatively low efficiency, the 5'-deiodination of T₃. Such activity has not previously been noted in any of the deiodinases characterized to date, including the amphibian RCDII cDNA (V. A. Galton, personal communication). Thus, comparative studies with deiodinases from other species may provide interesting insights into the structure-function correlates of this unique catalytic activity. Notably, 5'-deiodination of T₃ has been observed in teleost tissue homogenates; Pimlott and Eales (37) have described "weak" 5'-deiodination of T₃ in rainbow trout liver homogenates incubated at 20°C, the highest temperature at which they performed their assays. The physiological significance of this catalytic activity, however, may be relatively minor given the marked preference of the FhDII to utilize T₄ and rT₃ as substrates.

Early studies conducted by Leatherland (42) in trout liver homogenates suggested that the optimal temperature for 5'-deiodination in this tissue was 20°C. In these studies, no thiol co-factors were included in the trout liver reaction mixtures and the substrate concentration was so high (1.4 μM T₃) as to preclude distinguishing between DI and DII activity. Thus, a comparison of these data with ours is problematic. However, more recent data from our laboratory have demonstrated that DII activity as determined *in vitro* in trout liver homogenates is maximal at 25°C (Orozco, A., J. Silva, and C. Valverde-R, submitted for publication). It was, therefore, somewhat surprising to find that the thermal activity profile of the FhDII deiodinase was the same as that of the mammalian DI and DII enzymes with maximal activity noted at 37°C. Such differences between the temperature sensitivities of the trout and *Fundulus* enzymes could reflect their different habitats in that the latter species tends to reside in warmer waters. Similar observations showing maximal activity of an amphibian DII at 37°C have been made in tissue homogenates from *R. catesbeianus* (V. A. Galton, personal communication).

In summary, although previous studies have documented that there are important species differences in the tissue and developmental patterns of expression of the DII, the present study demonstrates that the structural and functional characteristics of the DII protein have been highly conserved during evolution. This provides additional evidence that this enzyme serves an important physiological role. The availability of the FhDII cDNA should facilitate further investigations into the role of thyroid hormones and their metabolic fate in fish.

Acknowledgments

The authors wish to thank M. Marion Byrne for providing the *F. heteroclitus* liver cDNA library and Jennifer Davey, Mark Schneider, Kathryn Becker, and Valerie Anne Galton for their interest and helpful discussions during the course of these studies.

References

1. Barrington EJW 1975 An Introduction to General and Comparative Endocrinology, ed 2. Clarendon Press, Oxford, pp 176-178
2. McNabb FMA 1992 Thyroid Hormones. Plenary Hall, Inc.
3. Leatherland JF 1987 Thyroid hormones and reproduction. In Norris (Ed) Jones

- RE (eds) Hormones and Reproduction in Fishes, Amphibians, and Reptiles. Plenum Press, New York, pp 411-431
- Higgs DA, Fagerlund UHM, Eales JG, McBride JR 1982 Application of thyroid and steroid hormones as anabolic agents in fish culture. *Comp Biochem Physiol* 73B:143-176
 - Eales JG 1985 The peripheral metabolism of thyroid hormones and regulation of thyroidal status in poikilotherms. *Can J Zool* 63:1217-1231
 - Weirich RT, Schwartz HB, Oppenheimer JJ 1987 An analysis of the interrelationships of nuclear and plasma triiodothyronine in the sea lamprey, lake trout, and rat: evolutionary considerations. *Endocrinology* 120:664-677
 - Grau EC, Helms LHM, Shimoda SK, Foud CA, LeGrand J, Yamanski K 1986 The thyroid gland of the Hawaiian parrotfish as its uses as an *in vitro* model system. *Gen Comp Endocrinol* 61:100-108
 - St. Germain DL 1994 Iodothyronine deiodinases. *Trends Endocrinol Metab* 5:36-42
 - Moi K, Kaptein E, Darras VM, de Greef WJ, Kühn ER, Visser TJ 1993 Different thyroid hormone-deiodinating enzymes in tilapia (*Oreochromis niloticus*) liver and kidney. *FBBS Lett* 321:140-144
 - Orozco A, Linares PJ, Valverde-RC Solubility modulates hepatic outer ring deiodination (ORD) activity in *Fundulus heteroclitus*. Program of the 18th Conference of Comparative Endocrinologists Rouen France 1996 (Abstract)
 - Nelson JS 1994 Fishes of the World, vol 3. John Wiley & Sons, Inc., New York, pp 269-272
 - St. Germain DL, Dittreich W, Murganelli CM, Cryan V 1990 Molecular cloning by hybrid arrest of translation in *Xenopus laevis* oocytes: identification of a cDNA encoding the type I iodothyronine 5'-deiodinase from rat liver. *J Biol Chem* 265:20087-20090
 - Berry MJ, Banu L, Larsen PR 1991 Type I iodothyronine deiodinase is a selenocysteine-containing enzyme. *Nature* 349:438-440
 - Mandel SJ, Berry MJ, Kieffer JD, Harney JW, Warner RL, Larsen PR 1992 Cloning and *in vitro* expression of the human selenoprotein, type I iodothyronine deiodinase. *J Clin Endocrinol Metab* 75:1132-1139
 - St. Germain DL, Schwartzman R, Croteau W, Kanamori A, Wang Z, Brown DD, Galton VA 1994 A thyroid hormone regulated gene in *Xenopus laevis* encodes a type III iodothyronine 5-deiodinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:7767-7771. Correction. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:11282, 1994
 - Croteau W, Whittemore SL, Schneider MJ, St. Germain DL 1995 Cloning and expression of a cDNA for a mammalian type III iodothyronine deiodinase. *J Biol Chem* 270:16569-16575
 - Becker KB, Schneider MJ, Davey JC, Galton VA 1995 The type III 5-deiodinase in *Rana catesbeiana* tadpoles is encoded by a thyroid hormone-responsive gene. *Endocrinology* 136:4424-4431
 - Salvatore D, Low SC, Berry M, Mala AI, Harney JW, Croteau W, St. Germain DL, Larsen PR 1995 Type 3 iodothyronine deiodinase: cloning, *in vitro* expression, and functional analysis of the placental selenoprotein. *J Clin Invest* 96:2421-2430
 - Davey JC, Becker KB, Schneider MJ, St. Germain DL, Galton VA 1995 Cloning of a cDNA for the type II iodothyronine deiodinase. *J Biol Chem* 270:26786-26789
 - Croteau W, JC D, Galton VA, St Germain DL 1996 Cloning of the mammalian type II iodothyronine deiodinase: a selenoprotein differentially expressed and regulated in the human brain and other tissues. *J Clin Invest* 98:305-317
 - LaFleur Jr. GJ, Byrne BM, Kamungo J, Nelson LD, Greenberg RM, Wallace RA 1995 Fundulus heteroclitus vitellogenin: the deduced primary structure of a piscine precursor to noncrystalline, liquid phase yolk protein. *J Mol Evol* 41:505-521
 - Lees JA, Saito M, Vidal M, Valentine M, Luok T, Harlow E, Dyson N, Hella K 1993 The retinoblastoma protein binds to a family of E2F transcription factors. *Mol Cell Biol* 13:7813-7825
 - O'Mara BA, Dittreich W, Lauterio TJ, St. Germain DL 1993 Pretranslational regulation of type I 5'-deiodinase by thyroid hormones and in fasted diabetic rats. *Endocrinology* 133:1715-1723
 - Clarke MG, von Heijne G 1994 TopPred II: an improved software for membrane protein structure predictions. *Computer applications in the biosciences* CABIOS 10:685-686
 - Sharif J, St. Germain DL 1992 The cDNA for the type I iodothyronine 5'-deiodinase encodes an enzyme manifesting both high K_m and low k_{cat} activity. *J Biol Chem* 267:12539-12544
 - St. Germain DL, Croteau W 1989 Expression of phenolic and tyrosyl iodothyronine deiodinases in *Xenopus laevis* oocytes is dependent on the location of injected poly(A)⁺ RNA. *Mol Endocrinol* 3:2049-2053
 - Lee H-Y, Wilson III 1971 Enzymatic parameters: measurement of V_m and K_m . *Biochem Biophys Acta* 242:519-522
 - Hofstee BHJ 1952 On the evaluation of the constants V_m and K_m in enzymic reactions. *Science* 116:329-331
 - Bradford MM 1976 A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Anal Biochem* 72:248-254
 - DeFalu D, Kinlaw WB, Zhou C, Engelberg-Kulka H, St. Germain DL 1990 Effect of selenium deficiency on type I 5'-deiodinase. *J Biol Chem* 265:16223-16228
 - Berry M 1992 Identification of essential histidine residues in rat type I iodothyronine deiodinase. *J Biol Chem* 267:18055-18059
 - Low SC, Berry MJ 1996 Knowing when not to stop: selenocysteine incorporation in eukaryotes. *Trends Biochem Sci* 21:203-208
 - Galton VA, Hiebert A 1987 The ontogeny of the enzymic systems for the 5- and 5-deiodination of thyroid hormones in duck embryo liver. *Endocrinology* 120:2604-2610
 - Berg O, Gorbman A, Kobayashi H 1959 The thyroid hormones in invertebrates and lower vertebrates. In: Gorbman A (ed) *Comparative Endocrinology*. John Wiley & Sons, Inc., New York, pp 302-319
 - Odumori RO, Simpson TH, Youngson AF 1978 Seasonal and diurnal rhythms in thyroidal status in the rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *J Fish Biol* 12:531-540
 - Eales JG, Fletcher GI 1982 Circannual cycles of thyroid hormones in plasma of winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus* Walbaum). *Can J Zool* 60:301-309
 - Plimlitt NJ, Eales JG 1983 *In vitro* study of hepatic iodothyronine deiodinase in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Can J Zool* 61:547-552
 - Frith SD, Eales JG 1986 Thyroid hormone deiodination pathways in brain and liver of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Gen Comp Endocrinol* 101:323-332
 - Leonard JL 1991 Biochemical basis of thyroid hormone deiodination. In: Wu S (ed) *Thyroid Hormone Metabolism, Regulation and Clinical Implications*. Blackwell Scientific Publications, Boston, pp 1-28
 - Berry M, Mala AI, Kieffer JD, Harney JW, Larsen PR 1992 Substitution of cysteine for selenocysteine in type I iodothyronine deiodinase reduces the catalytic efficiency of the protein but enhances its translation. *Endocrinology* 131:1848-1852
 - Berry M, Banu L, Chen Y, Mandel SJ, Kieffer JD, Harney JW, Larsen PR 1991 Recognition of UGA as a selenocysteine codon in type I deiodinase requires sequences in the 3' untranslated region. *Nature* 353:273-276
 - Leatherland JF 1981 Conversion of L-thyroxine to triiodo-L-thyronine in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) liver and kidney homogenates. *Comp Biochem Physiol* 69B:311-314

Salinity Modifies Hepatic Outer-Ring Deiodinating (ORD) Activity in *Fundulus heteroclitus*.

Aurora OROZCO,¹ Paul J. LINSEY,² and Carlos VALVERDE-R.¹

¹Centro de Neurobiología, UNAM. A. postal 70 228, México 04510, D.F.; ²Whitney Laboratory, University of Florida 9505 Ocean Shore Blvd, St Augustine FL 32086.

INTRODUCTION

Thyroid hormone (TH) effects are mediated by specific genomic mechanisms triggered by T₃ which derives from extrathyroidal T₄ deiodination through the activating ORD pathway. This deiodinative route is catalyzed by two enzymes known as DI and DII. The inactivating pathway is catalyzed by DIII. Thus, organ-specific thyronine deiodination results fundamental in regulating both: circulating levels and the local intracellular concentration of active and inactive TH. The regulation of the deiodinative pathways is also organ-specific and depends on three major aspects: the supply and availability of TH; the energetic balance of the organism, and the interplay with some neuroendocrine messengers^{1,2}. In contrast to the rest of adult vertebrates, fish constitute a unique example of hepatic DII activity expression. This distinct finding suggests that fish liver plays a dual role contributing to the generation of circulating as well as tissue T₃, thus also suggesting differences in fish hepatic ORD regulation³. An interesting model to study ORD pathway regulation is osmotic challenge. Indeed, osmotic equilibrium is a precise balance in which the coordinated interplay of a mayor portion of the neuroendocrine array plays a pivotal role⁴. The participation of TH in this process is poorly understood, but prolactin (PRL) and cortisol (Ct) are well known key hormones for freshwater (FW) and seawater (SW) survival respectively⁴. We are here analyzing the possible involvement of hepatic ORD during hypo-osmotic demands in an euryhaline specie.

MATERIALS AND METHODS.

Male *F. heteroclitus* (2-8 g) from the Matanzas river (St. Augustine FL) were collected in August 1995 and 1996. Fish were kept in SW tanks and fed *ad libitum* for at least 3 days prior to the experimental procedures. Three different experiments (Exp) were conducted. Exp A, in which a group of fish were transferred from 100 % SW to 50 % FW-SW; Exp B, in which animals were implanted with Ct (coconut oil, 25 µg/g), and Exp C, in which Ct was implanted 48 h prior to transfer to 50 % SW. In all cases, fish were sampled 0.5, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 48 h either post-implant or post-transfer. Hepatic DI and DII activities were assessed by the radioiodine release method as previously described³.

RESULTS AND COMMENTS

Initial kinetic studies showed that, as trout, *Fundulus* liver contains both, DI and DII enzymes with Km and Vmax values of 93 and 1.3 nM and 36 and 2.5 pmol¹²⁵I/mg/h respectively. Furthermore, 12 h under a mild hypo-osmotic challenge (Figure 1, Exp A), resulted in a significant ($p < 0.01$) and sustained increase of DII activity for up to 72 h post-transfer (data not shown). DI activity remained unmodified. On the contrary, in Ct-implanted fish, both enzymes showed a 1.5 fold increase. However, whereas DI exhibited a sustained increase ($41 \pm 7 - 50 \pm 8$ pmol¹²⁵I/mg/h) for up to 72 h post implant, DII showed an initial increase (535 ± 81 fmol¹²⁵I/mg/h) followed by a progressive decrease reaching control levels at 60 h post implant. Hypo-osmotic challenge on previously Ct treated fish (Figure 1, Exp C) resulted in a

significant and sustained decrease on DI activity (2 fold) as compared to controls at 2-4 h post-transfer. In contrast, DII showed a transient peak of activity at 12 h post-transfer.

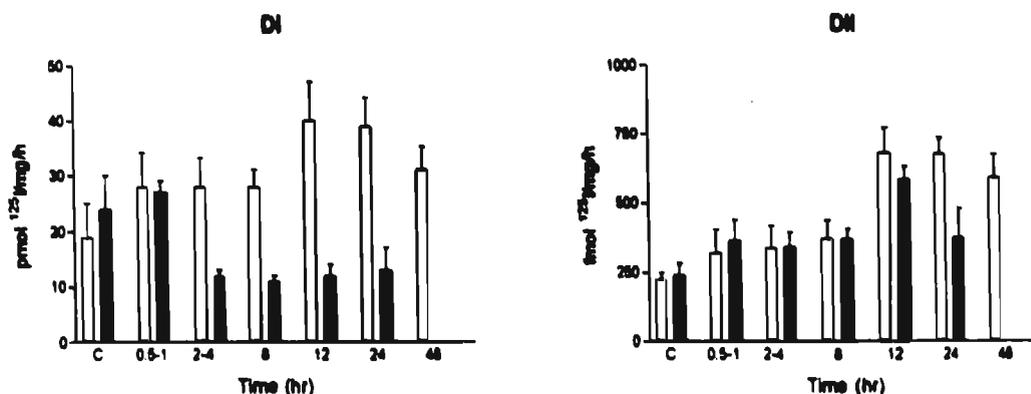


Figure 1. Effect of hypo-osmotic challenge on hepatic *Fundulus* DI and DII activities. Open bars correspond to Exp A and closed bars to Exp C. Each bar represents the mean \pm S.E. from two different experiments ($n=11$) performed in two different years (August 1995 and 1996)

The experiments described above confirm and extend previous studies showing that the liver of euryhaline fish expresses the two enzymes that catalyze the ORD pathway. Of note is the fact that *Fundulus* hepatic DII is ~ 5 times higher than its counterpart in trout³. Furthermore, present results demonstrate that both hepatic enzymes exhibit a conspicuous differential response to Ct and/or to a mild hypo-osmotic challenge. A sound interpretation of these findings is precluded by the paucity of information regarding the physiological role of TH in maintaining hydro-osmotic homeostasis in marine euryhaline species. However, as the time course of the enzymatic change suggest, TH seem not to be instrumental in the installment of the acute initial adaptive response. Furthermore, a number of neuroendocrine messengers involved in hydro-osmotic homeostasis, including PRL, Ct and growth hormone, are known to regulate peripheral thyronine deiodination in other vertebrates^{5,6}. In this context, our results suggest that Ct and other messengers (PRL?) co-participate regulating both the generation of circulating and tissue T₃ in fish. Current studies in our laboratory are aimed to further understand the functional meaning of these observations.

REFERENCES

1. St Germain D.L. 1994. Iodithyronine deiodinases. *Trends Endocrinol Metab* 5: 36-42.
2. Valverde-R.C., Aceves C. y Navarro L. 1993. Hormonas a la medida y para toda ocasión. El caso de las yodotironinas *Ciencia y Desarrollo* 19 (111): 22-33.
3. Orozco A., Silva J.E. & Valverde-R.C. 1997. Rainbow trout liver expresses two phenolic-ring deiodinase pathways with the characteristic of mammalian types I and II deiodinases. *Endocrinology* 138: (in press).
4. Wendelar Bonga S.E. 1993. Endocrinology. In: *The Physiology of Fishes*. Evans D.H. Ed. Pp. 469-502. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida.
5. De Luza A., Leiou J., Papkoff H., Kikuyama S. and Kawauchi H. 1989. Effects of vertebrate prolactins and growth hormones on thyroxine 5'-monodeiodination in eel (*Anguilla anguilla*): A potential bioassay for growth hormone. *Gen Comp Endocrinol* 73: 186-193.
6. Kuhn E.R. 1990. Hormonal control of peripheral monodeiodination in vertebrates. *Progress in Comparative Endocrinology*. Pp. 421-426. Wiley-Liss, Inc.

significant and sustained decrease on DI activity (2 fold) as compared to controls at 2-4 h post-transfer. In contrast, DII showed a transient peak of activity at 12 h post-transfer.

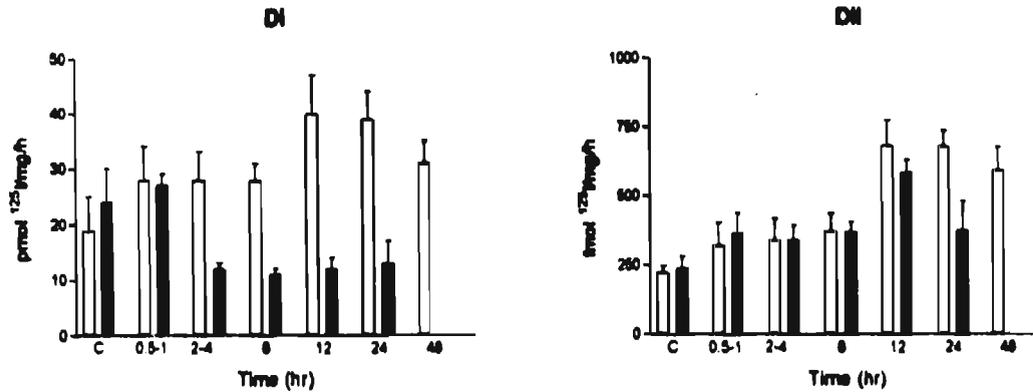


Figure 1. Effect of hypo-osmotic challenge on hepatic *Fundulus* DI and DII activities. Open bars correspond to Exp A and closed bars to Exp C. Each bar represents the mean \pm S.E. from two different experiments ($n=11$) performed in two different years (August 1995 and 1996)

The experiments described above confirm and extend previous studies showing that the liver of euryhaline fish expresses the two enzymes that catalyze the ORD pathway. Of note is the fact that *Fundulus* hepatic DII is \sim 5 times higher than its counterpart in trout³. Furthermore, present results demonstrate that both hepatic enzymes exhibit a conspicuous differential response to Ct and/or to a mild hypo-osmotic challenge. A sound interpretation of these findings is precluded by the paucity of information regarding the physiological role of TH in maintaining hydro-osmotic homeostasis in marine euryhaline species. However, as the time course of the enzymatic change suggest, TH seem not to be instrumental in the installment of the acute initial adaptive response. Furthermore, a number of neuroendocrine messengers involved in hydro-osmotic homeostasis, including PRL, Ct and growth hormone, are known to regulate peripheral thyronine deiodination in other vertebrates^{5,6}. In this context, our results suggest that Ct and other messengers (PRL?) co-participate regulating both the generation of circulating and tissue T_3 in fish. Current studies in our laboratory are aimed to further understand the functional meaning of these observations.

REFERENCES

1. St Germain D.L. 1994. Iodithyronine deiodinases. *Trends Endocrinol Metab* 5: 36-42.
2. Valverde-R.C., Acoves C. y Navarro L. 1993. Hormonas a la medida y para toda ocasi3n. El caso de las yodotironinas. *Ciencia y Desarrollo* 19 (111): 22-33.
3. Orozco A., Silva J.E. & Valverde-R.C. 1997. Rainbow trout liver expresses two phenolic-ring deiodinase pathways with the characteristic of mammalian types I and II deiodinases. *Endocrinology* 138: (in press).
4. Wendler Bonga S.E. 1993. Endocrinology. In: *The Physiology of Fishes*. Evans D.H. Ed. Pp. 469-502. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida.
5. De Luze A., Lekou J., Papkoff H., Kikuyama S. and Kawauchi H. 1989. Effects of vertebrate prolactines and growth hormones on thyroxine 5'-monodeiodination in eel (*Anguilla anguilla*): A potential bioassay for growth hormone. *Gen Comp Endocrinol* 73: 186-193.
6. Kuhn E.R. 1990. Hormonal control of peripheral monodeiodination in vertebrates. *Progress in Comparative Endocrinology*. Pp. 421-426. Wiley-Liss, Inc.