



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

03086

2
2 ef.

UNIDAD ACADEMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y
DE POSGRADO DEL COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES
CENTRO DE NEUROBIOLOGIA

DESYODACION HEPATICA DE TIRONINAS EN LA ESPECIE
ENDEMICA *Sceloporus grammicus*. CARACTERIZACION Y
TERMODEPENDENCIA.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS FISIOLÓGICAS
PRESENTA:
M. EN C. BERTHA FENTON NAVARRO

DIRECTOR: CARLOS M. VALVERDE RODRIGUEZ

MEXICO, D. F.

1998.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

263945



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

La presente tesis se realizó en el Centro de Neurobiología UNAM, bajo la asesoría del Dr. Carlos Manuel Valverde -Rodríguez.

Este trabajo fue apoyado en parte por el siguiente donativo: DGAPA - PAPIIT: IN203492 y por la beca de Doctorado DGAPA-UNAM.

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento a mi comité tutorial. Quienes además de su excelencia académica tienen una excelente calidad humana. A lo largo de estos años me han brindado su dirección, sus críticas y en ocasiones me consolaron.

Dr. Carlos Manuel Valverde Rodríguez . Gracias Dr. por la asesoría de ésta tesis, por brindarme su cariño, apoyo y la confianza que siempre me tuvo y que se reflejó en la libertad que me dio para el desarrollo de este trabajo.

Dra. Alejandra Mainero del Paso. Ale, en la licenciatura tuve la suerte de tenerte como maestra, y desde entonces me has brindado tu apoyo incondicional, gracias por el excelente asesoramiento y por tu genuino interés en mi desarrollo académico y personal.

Dr. Fausto R. Méndez de la Cruz. Fausto gracias por tus sugerencias y asesoría, por tu apoyo y por iniciarme en el fascinante mundo de la Herpetología.

Así mismo, quiero agradecer a cada uno de los miembros del jurado por el interés brindado y la minuciosa revisión, ya que con sus sugerencias, comentarios y críticas se mejoró notablemente la presentación de ésta tesis:

Dra. Adela Rodríguez Romero

Dra. Verónica Guarner Lans

Dr. Jaime Mas Oliva

Dr. Roberto Arreguín Espinosa de los Monteros

- Al Dr. Carlos Romero R. por su apoyo y por permitirme utilizar las cámaras de aclimatación en la UAM Iztapalapa.
- Al M. en C. Felipe Rodríguez Romero por invaluable ayuda en la colecta de los animales, por sus comentarios y sugerencias.
- A la Dra Carmen Aceves Velazco. Gracias Tana por tu ayuda, tus sugerencias y tu amistad.
- A la Dra. María de la Luz Navarro Angulo por la asesoría en los análisis estadísticos.
- A la pasante de Doctorado Brenda Anguiano Serrano. Brenda te agradezco toda tu ayuda, tu apoyo y sobre todo por tu amistad.
- Al Dr. Gonzalo Martínez de la Escalera, Dra. Carmen Clapp Jimenez, Dr. Flavio Mena Jara y Dr. Carlos Arámburo de la Hoz por su apoyo y por permitirme utilizar su equipo de laboratorio.
- Al Sr. José Aviles Garduño por el material fotográfico.
- A mis amigos y compañeros del laboratorio por su apoyo y amistad: Brenda, Martha, Luz, Aurea, Maricela, Gustavo, Hilda.
- A mis amigos por su cariño, apoyo y confianza de siempre.

- A mis queridos Padres por su amor, apoyo y comprensión durante toda mi vida.
- A mis Hermanos y Sobrinos por su amor y alegrías que me han dado.

ABREVIATURAS

α GDPH	α Glicerol fosfato dehidrogenasa
aa	Aminoácidos
AChE	Acetilcolinesterasa
ADP	Difosfato de adenosina
AG	Aparato de Golgi
Alb	Albúmina
AMP	Monofosfato de adenosina
ANOVA	Análisis de varianza
ATP	Trifosfato de adenosina
BAT	Tejido adiposo café
cAMP	Adenilato cíclico
cDNA	Acido Desoxiribonucleico complementario
CGH	Gonadotropina Coriónica
Cys	Cisteina
DNA	Acido Desoxiribonucleico
DEP	Dietilpirocarbonato
DI	Desyodasa tipo I
DII	Desyodasa tipo II
DIII	Desyodasa tipo III
DIT	Diyodotirosina
DTT	Ditiotreitol
FFA	Acidos grasos libres
FSH	Hormona foliculo estimulante
GH	Hormona de crecimiento
GTG	Tioglucona aurica
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrógeno
HIS	Histidina
HTs	Hormonas Tiroideas
I ⁻	Yoduro
I	Yodo
IRD	Desyodación del anillo interno
Km	Constante cinética de afinidad (Michaelis-Menten)
LDH	Lactato Dehidrogenasa
LH	Hormona Luteinizante

MDH	Malato Dehidrogenasa
μmol/L	Micromolar
MIT	Monoyodotirosina
NAD	Dinucleótido de adenina y nicotinamida
NADPH	Fosfato del dinucleótido de adenina y nicotinamida.
ORD	Desyodación del anillo externo
pH	-log [H ⁺]
PostAlb	Postalbúmina
PRL	Prolactina
PTU	Propiltiouracilo
PyK	Piruvato-cinasa
RBC	Eritrocitos
RER	Retículo endoplásmico rugoso
rT3	Triyodotironina reversa
RXR	Receptor al retinoide X
Se	Selenio
SECIS	Secuencia de inserción para Se-Cys
Se-cys	selenio cisteína
SH	Grupo sulfidrilo
SMR	Tasa metabólica estándar
T1	Monoyodotironina
T2	Diyodotironina
T3	Triyodotironina
T4	Tiroxina
TBG	α-Globulina
TCA	Acido tricloroacético
TETRAC	Acido Tetrayodoacético
TG	Triacilglicéridos
TgB	Tiroglobulina
THR _s	Receptores de las Tironinas
TH _s	Hormonas tiroideas
TPO	Tiroperoxidasa
TRE _s	Elementos de respuesta a tironinas
TRH	Tiroliberina (Hormona liberadora de la Tirotropina)
TRIAC	Acido Triyodoacético
TSH	Tirotropina (Hormona estimulante de la Tiroides)

TT

Transtiretina

Tx

Tiroidectomía

UCP

Termogenina

V-erb-A

Oncogen de la eritroblastosis aviaria

V_{máx}

Velocidad Máxima

RESUMEN

En ésta tesis se reporta la identificación y caracterización de la vía ORD hepática en machos, hembras y hembras preñadas de una lagartija endémica (*Sceloporus grammicus*) y la respuesta fisiológica de ésta actividad enzimática durante la aclimatación. Los resultados mostraron que la vía ORD, no presenta actividad DII y esta catalizada exclusivamente por la desyodasa DI. El hígado de esta especie de lagartijas expresa la actividad DI mas alta reportada hasta la fecha en vertebrados. Esta actividad es dimórfica siendo los machos los que presentan la mayor actividad enzimática. El análisis cinético se realizó con tres diferentes temperaturas. Los resultados, exhibieron una relación directa entre la Km y la temperatura, que claramente representa una compensación térmica inmediata, de tipo modulación térmica positiva (Hochachka y Somero, 1969, 1984). Las características operacionales de ésta enzima i.e. sustrato preferencial, requerimientos del cofactor y susceptibilidad a inhibidores, son similares a los reportados para una típica enzima tipo I en otros vertebrados (Leonard y Visser 1986; Galton 1988, Köhrle *et al*, 1992; McNabb 1992). Así, el sustrato preferencial *in vitro* fue rT3 con valores de Km en el intervalo micromolar, y la cinética de la reacción correspondió a un típico patrón de "ping-pong". La actividad se inhibió con propiltiouracilo (PTU) y tioglucosa aurica (GTG), además presentó parámetros cinéticos aparentes en el mismo intervalo que los reportados para ésta enzima en el hígado de rata. Sin considerar el método y la especie utilizada, nuestros resultados son congruentes con la noción de que la actividad desyodativa total (T4-ORD) en hígado de serpientes (*Elaphe taeniura*) esta catalizada por una desyodasa parecida a la de mamíferos (Wong *et al* 1993). De la misma manera, los resultados muestran que el hígado de lagartijas expresa la actividad DI mas alta reportada en vertebrados, están de acuerdo con una comunicación corta en un congreso (Darras *et al*, 1994), e indican la abundancia relativa de esta enzima en el hígado de lagartijas. En conjunto, estos resultados apoyan la noción de que excluyendo a los teleósteos (Orozco *et al*, 1997) y anfibios (Becker *et al*, 1997), en el hígado del resto de los vertebrados adultos, la vía ORD esta catalizada exclusivamente por una desyodasa tipo I (McNabb, 1992). Un hallazgo muy importante del presente trabajo consistió en la sorprendente estabilidad catalítica que la enzima exhibe en un amplio intervalo de temperatura y pH. Esta estabilidad se explica primero por un sistema de amortiguación en el sitio activo de la enzima, que responde a cambios de pH-temperatura, los cuales permiten que un mismo tipo enzimático actúe bajo condiciones microambientales diferentes, manteniendo una estabilidad catalítica. El amplio intervalo de termo-estabilidad encontrado se puede explicar por la participación de diferentes formas y/o variantes enzimáticas, cada una con diferente estabilidad térmica.

La aclimatación (~1 mes), se realizó utilizando dos intervalos termales uno "frío" (15 a 20°C) y uno "caliente" (32-37°C). Los resultados mostraron una modulación térmica positiva y negativa respectivamente, esto es, variaciones de los resultados cinéticos, con las mismas temperaturas probadas anteriormente. Las diferencias en los valores encontrados, en el análisis cinético *in vitro* e *in vivo*, apoyan la noción de que se trata de la generación de formas y/o variantes enzimáticas térmicamente inducidas (Hochachka y Somero, 1984; Somero, 1995; Fields y Somero, 1997).

La generación de múltiples formas enzimáticas, que puede originarse genética- y/o epigenéticamente, representa mecanismos biológicos por los que los organismos se adaptan a la necesidad de una multiplicidad molecular.

ABSTRACT

The identification and kinetic characterization of the ORD pathway in male, female and pregnant female livers of an endemic lizard (*Sceloporus grammicus*) and the enzymatic response during acclimation is reported in this thesis. The ORD pathway does not present deiodinase 5'DII, it is exclusively catalyzed by 5'DI deiodinase. 5'DI enzymatic activity in lizard liver is the highest so far reported in vertebrates. This activity is dimorphic, males presenting the highest activity. Kinetic analysis was performed at three different temperatures. Male true kinetic constants exhibited a direct correlation of the K_m with temperature, and results are congruent with the installment of an immediate positive thermal compensation, where K_m is correlated with temperature (Hochachka and Somero 1969, 1984). The operational characteristics of this enzyme i.e. preferential substrate specificity, cofactor requirement and susceptibility to inhibitors, are similar to those reported for a typical deiodinase type I in other vertebrates (Leonard y Visser 1986; Galton 1988, Köhrle *et al.*, 1992; McNabb 1992). Thus, the preferential *in vitro* substrate of lizard liver enzyme was rT₃ with K_m values in the micro-molar range, the enzyme reaction kinetics corresponded to a typical "ping-pong" pattern, and its activity was inhibited by PTU (6-propyl-2-thiouracil) and GTG (gold-thiogluucose). It also revealed apparent kinetic parameters in the same range as those described for this enzyme in rat liver. Aside from the differences in methods and the reptile species studied, our results are consistent with the suggestion that total T₄-ORD activity in snake (*Elaphe taeniura*) liver is catalyzed by a mammalian - like type I deiodinase (Wong *et al.* 1993). Similarly, present results demonstrating that lizard liver expresses the highest DI activity so far documented in vertebrates, agree with a previous report (Darras *et al.*, 1994), and suggest that there is relative abundance of this enzyme type in lizard liver. Altogether, these results add further support to the notion that, excluding teleosts (Orozco *et al.* 1997) and amphibians (Becker *et al.*, 1997), in the rest of adult vertebrates, the hepatic ORD pathway is exclusively catalyzed by a type I deiodinase (McNabb 1992). A major finding in the present study consists in the noticeable stability exhibited by hepatic lizard DI along a wide pH and temperature range. This stability is due to a buffer system located in the active site of this enzyme that responds to pH and temperature changes, allowing this enzyme to retain catalytic activity under different microenvironment situations. Thermal stability in the wide range tested suggests the expression of different enzymatic forms and/or variants.

The acclimation was performed using two thermal ranges, one "cold" (15 to 20°C) and one "warm" (32-37°C). Results showed a positive and a negative thermal compensation, respectively. Still, the K_m differences obtained in the *in vitro* and *in vivo* (acclimation) kinetic analyses, suggest the expression of enzymatic thermo-induced forms and/or variants (Hochachka y Somero, 1984, Somero, 1995, Fields y Somero, 1997).

The generation of multiple enzymatic forms, can have genetic and/or non-genetic origin, representing a biologic mechanism allowing organisms to cope with the necessities of molecular multiplicity's.

INTRODUCCION

Este trabajo forma parte de una línea de Investigación encaminada a estudiar la fisiología tiroidea comparada en los vertebrados. En particular, en esta tesis se enfoca a estudiar la fisiología tiroidea en reptiles y su relación con la temperatura. En los vertebrados, las hormonas tiroideas (HTs) ejercen una gran cantidad de acciones y efectos biológicos, como es la bien conocida regulación del gasto metabólico en endotermos. Estas acciones se encuentran mediadas por la unión de HTs a receptores nucleares específicos. La regulación fina de estas acciones dependen de un proceso denominado desyodación extratiroidea de tironinas. Esta biotransformación de las HTs, esta catalizada por enzimas específicas llamadas desyodasas que se localizan en diferentes órganos y tejidos. Estas enzimas remueven un átomo de yodo en el anillo externo o interno de las tironinas, produciendo ya sea la forma activa (T₃, 80%) o inactiva (rT₃, 100%) de las HTs, de esta manera las desyodasas regulan la concentración intracelular de éstas hormonas (Kaplan, 1986; Leonard y Visser, 1986, 1991; Rosenberg, 1991, St. Germain, 1994c, 1995). La selectividad, velocidad y cuantía de este proceso de desyodación determinan la concentración local de tironinas activas o inactivas, regulando así la magnitud de su efecto biológico. De hecho se ha propuesto que estas enzimas, en conjunto con los mecanismos que las regulan, pueden considerarse como una extensión del eje hipotálamo-hipófisis-tiroides (Valverde *et al*, 1993).

Trabajos previos del laboratorio (Fenton *et al* 1997), mostraron que la desyodasa 5DIII (vía de inactivación) de la piel de truchas es termodependiente exhibiendo la mayor actividad (V_{máx}) a 15°C. Este hallazgo es congruente con la temperatura óptima para éstos peces y además, los valores de las constantes cinéticas evaluados con diferentes temperaturas variaron solo en la V_{máx} de la enzima, lo que sugiere la posible expresión de formas enzimáticas termo-dependientes o termo-inducidas.

En el contexto de la aclimatación térmica se sabe que cuando los seres vivos colonizan nuevos hábitats, se ven expuestos a diferentes presiones de selección. La temperatura es quizá el factor ambiental más crítico, ya que al afectar la operación funcional y bioquímica del organismo, ella determina los límites de distribución, los intervalos en que funcionan y la sobrevivencia de los individuos. Los organismos ectotérmicos por lo general modifican sus procesos fisiológicos para compensar los efectos de la temperatura en la función metabólica. Un mecanismo para lograr estos cambios compensatorios en los procesos fisiológicos consiste en alterar la actividad y/o el tipo de enzimas específicas que participan en las principales rutas metabólicas. Estos cambios en la actividad y/o en la expresión enzimática pueden ser alcanzados

por dos formas generales de compensación conocidas como: aclimatación fisiológica y adaptación evolutiva (Hochachka y Somero, 1984; White y Somero, 1982; Somero, 1995).

Este trabajo se enfoca a estudiar la fisiología tiroidea en reptiles. Al igual que en los mamíferos, en los reptiles, las hormonas tiroideas participan en una gran variedad de funciones y procesos fisiológicos. Sin embargo, los reportes de la fisiología tiroidea en reptiles son relativamente escasos, y prácticamente no existen estudios encaminados a analizar el papel fisiológico de las desyodasas en estas especies. Por ésta razón y en el contexto de la compensación enzimática térmica que se mencionó arriba, el trabajo de la presente tesis se diseñó para caracterizar en el hígado de una especie endémica de reptiles, la vía desyodativa de activación o desyodación del anillo externo (ORD), y estudiar la respuesta fisiológica de ésta actividad enzimática durante la aclimatación.

El conocimiento acerca de la función de la glándula tiroidea se ha generado principalmente a partir de los estudios hechos en mamíferos. Así, y no obstante que en esta tesis se utilizó como modelo a un reptil, consideramos necesario revisar en una primera parte la fisiología de la glándula en mamíferos. Posteriormente se revisa la fisiología tiroidea en reptiles y, por último, la fisiología térmica en ectotermos. En una segunda parte de la tesis, se desglosan el planteamiento del problema, la hipótesis, los objetivos y el material y métodos utilizados. Por último la tercera parte, contiene los resultados y la discusión.

I ANTECEDENTES

1 LA GLANDULA TIROIDES EN LOS HOMEOTERMOS

El tejido tiroideo se encuentra presente en todos los protocordados y cordados (Ericson y Fredriksson, 1990). La tiroides deriva del endodermo y está constituida por múltiples folículos. Cada folículo esférico está rodeado por una monocapa de células foliculares o tirocitos y está lleno de un material proteico llamado coloide en el cual la proteína mayoritaria es la tiroglobulina (TgB). Cuando la glándula está inactiva, el coloide es abundante, los folículos son grandes y los tirocitos aparecen aplanados. En cambio, cuando la glándula está activa, los folículos son pequeños, los tirocitos son cuboides o columnares su borde coloidal está festoneado con microvellosidades formando pequeñas "lagunas de absorción", y su retículo endoplásmico es prominente. Los tirocitos descansan en una membrana basal que los separa de los capilares adyacentes cuyas células endoteliales están festoneadas a trechos formando soluciones de continuidad en sus paredes, como ocurre en la mayoría de los órganos endocrinos (Gangong, 1976; Dummont *et al* 1989, Ham, 1975).

1.1 SINTESIS Y SECRECION DE LAS HORMONAS TIROIDEAS (HTs)

Función y Control

La función tiroidea está regulada en 4 niveles: 1) cerebro-hipotálamo, 2) hipófisis, 3) tiroides y 4) órganos efectores (Larsen, *et al*, 1981; Engler y Burger 1984). Los tres primeros constituyen el clásico eje neuroendocrino hipotálamo-hipófisis-tiroides. En el cerebro se integran diversos estímulos endógenos y exógenos, que dependiendo de la especie estimulan (frio, ciclo luz/oscuridad), o inhiben (ayuno) la función tiroidea. Estas señales nerviosas convergen a la región diencefálica denominada hipotálamo en donde se localizan las neuronas secretoras de la tiroliberina o TRH (hormona liberadora de tirotropina).

La acción de la TRH en los tirotrópos hipofisarios es muy rápida y esta mediada por su unión a receptores de membrana específicos. Esta unión despolariza la membrana plasmática lo que permite la entrada de calcio al citosol activando así la cascada de Ca^{+} - fosfatidilinositol y la síntesis y la secreción de la hormona estimulante de la tiroides o tirotropina (TSH) (Deme, *et al* 1985).

La TSH hipofisaria es una glucoproteína con actividad hormonal que pesa 25 Kd y está formada por dos cadenas polipeptídicas. La cadena α de la TSH comparte una similitud estructural del 80 al 90% con las correspondientes de las gonadotropinas hipofisarias (hormona foliculo estimulante o FSH, y hormona luteinizante o LH), así como con la gonadotropina

coriónica (CGH). La cadena β de la TSH, o en su caso la de cualquiera de las otras glucoproteínas hormonales, confiere a la molécula su especificidad funcional (Weintraub, *et al* 1985). La TSH a través de sus receptores de membrana específicos, controla y regula todo el metabolismo y función de los tirocitos (Fisher y Klein, 1981).

La principal función del folículo tiroideo es atrapar yodo de la circulación y utilizarlo en la síntesis de los aminoácidos yodados: mono y diyodotirosina (MIT y DIT, respectivamente) y de las yodotironinas: tiroxina (T₄), triyodotironina (T₃), y triyodotironina reversa (rT₃). El yodo es un oligoelemento que se absorbe a través del tracto gastrointestinal, se convierte a yoduro y se distribuye rápidamente en el compartimiento extracelular (Dummont, *et al* 1989).

Síntesis de HTs

Como se ilustra en la FIGURA 1, una vez captado por los tirocitos, el yoduro es convertido a yodo mediante un proceso enzimático catalizado por la tiroperoxidasa (TPO). Esta enzima es una hemoproteína glucosilada unida a la membrana apical de los tirocitos, cuyo dominio catalítico está orientado hacia la luz del folículo tiroideo (Nunez y Pommimer, 1982). La TPO exhibe una rara especificidad; es activa sólo en presencia de H₂O₂, pero el exceso de éste la inhibe. La enzima cataliza la yodación de tirosinas libres o unidas a la TgB. Esta proteína específica de la glándula tiroidea es secretada por el tirocito al lumen del folículo tiroideo donde sirve como un sustrato para la serie de reacciones catalizadas por la TPO (Nunez y Pommimer, 1982, Virion *et al* 1985). Así, para la formación de las tironinas, se requiere de: TgB, TPO, yodo y H₂O₂ (Dupy *et al*, 1986). La yodación tiene lugar en la molécula de TgB que está en contacto con la membrana apical y está determinada por la secuencia de aminoácidos de la molécula, en la cual se reconocen cuatro sitios hormogénicos en proporción 3:1 para T₄:T₃ respectivamente (Nunez y Pommimer, 1982). El primer residuo de tirosina localizado en la posición 5 de la TgB, tiene un papel muy importante en la jerarquía de los residuos hormogénicos, porque será el primero en ser convertido a T₄. Esta tironina se forma por la unión de dos residuos de DIT, y la T₃ por la unión de un residuo de MIT con uno de DIT. También se producen pequeñas cantidades de rT₃ y 3,3'diyodotironina. Como el nivel de yodación de la tiroglobulina varía dependiendo del suplemento dietético de yodo, esta proteína puede tener un número variable de residuos de MIT y de DIT y por lo tanto diferente contenido de T₃ y de T₄ (Edelhoch, 1965; Ohmaya *et al*, 1987).

Secreción de HTs

Una vez yodada, la molécula de TgB se almacena en la luz del folículo tiroideo, lo que provee un reservorio de hormonas disponibles para ser secretadas por medio de la endocitosis del coloide. Mediante mecanismos de macro y micropinocitosis y bajo la estimulación aguda de la TSH, en cuestión de minutos se forman pseudópodos en el borde apical de las células foliculares cuyo tamaño y número dependen de los niveles de TSH. Los bordes laterales y apicales de los pseudópodos se fusionan englobando al coloide indiscriminadamente en un proceso similar a la fagocitosis. La tubulina y la actina participan en el proceso, los microfilamentos de actina predominan en las membranas apicales y los filamentos intermedios predominan en la parte media y basal del citoplasma, y este arreglo determina la polaridad de los tirocitos (Takasu *et al*, 1992). Las gotas del coloide se internalizan y posteriormente se fusionan con lisosomas para después formar vacuolas fagolisosomales en las que se lleva a cabo la hidrólisis. Las HTs ($T_4 > T_3 \gg rT_3$) son secretadas por difusión pasiva y/o por transporte mediado (Van Herle *et al* 1979; Erickson, 1981; Seljelid *et al* 1970; Vandenhove y Vandemboucke, 1980), (FIGURA 1).

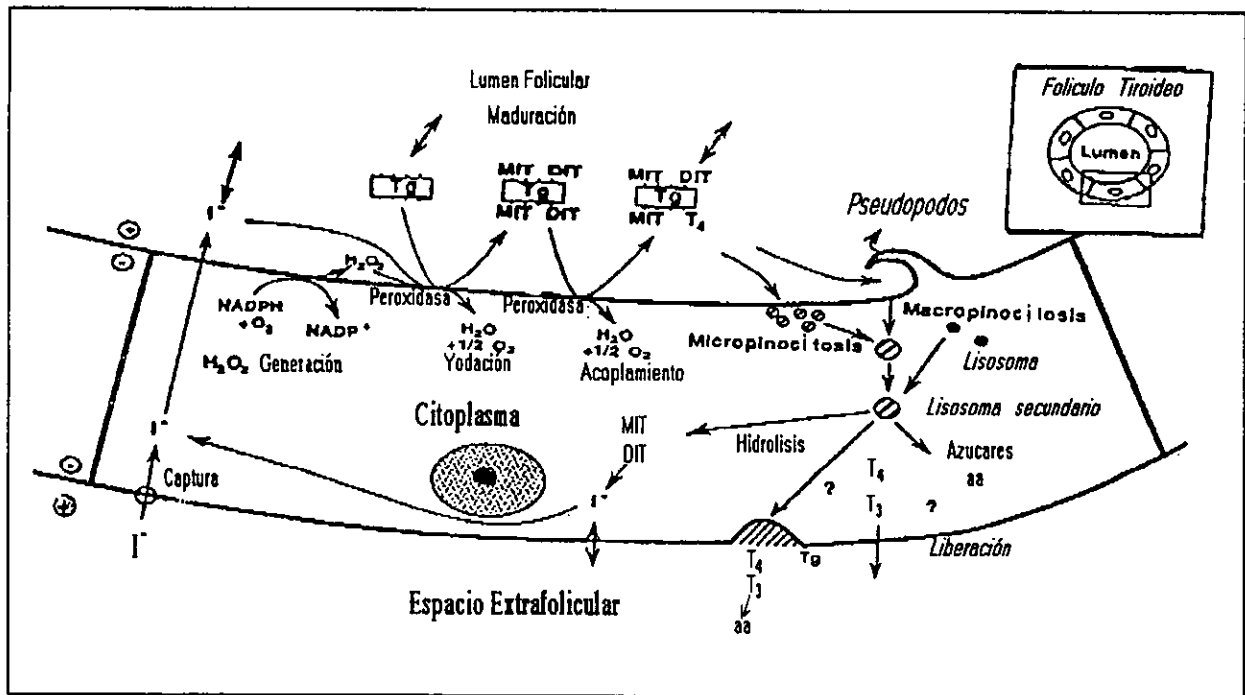


FIGURA 1. FOLÍCULO TIROIDEO. Se ilustran los diferentes mecanismos que participan en la organización del yodo; así como, en la liberación de las HTs a la circulación sistémica. I^- , Yodo; H_2O_2 , peróxido de hidrógeno; NADPH, Dinucleótido de niacina adenina fosfato reducido; NADP Dinucleótido de niacina adenina fosfato; MIT y DIT mono y diyodotirosina; Tg, tiroglobulina; aa aminoácidos; T_4 , Tiroxina; T_3 Triyodotironina; rT_3 Triyodotironina reversa.

1.2 TRANSPORTE DE HTs

Las HTs son relativamente hidrofóbicas y existen en solución acuosa debido a que se encuentran unidas a diferentes proteínas del suero, que hacen las veces de acarreadores. Las características de las principales proteínas transportadoras de tironinas (TBPs) en diferentes vertebrados se resumen en la TABLA 1. Todas las TBPs se sintetizan en el hígado, y la transtiretina (TT) también se sintetiza en los plexos coroideos (Sterling y Lazarous, 1977; Greer 1991; Tanabe *et al*, 1969; Refetoff *et al* 1970, Henneman y Docter 1990). Otras proteínas plasmáticas como α y β lipoproteínas tienen una menor contribución al transporte de HTs (Hoch H, 1974). Las interacciones de las yodotironinas con las TBPs son no-covalentes y reversibles, y obedecen a la ley de acción de masas. Esta unión de las HTs a las TBPs explica que en condiciones normales la concentración de yodotironinas libres sea muy pequeña en relación con el total. En el hombre la concentración de T4 libre oscila al rededor de 0.03% y la de T3 alrededor de 0.3% del total de una y otra respectivamente.

TABLA 1 PROTEÍNAS TRANSPORTADORAS DE TIRONINAS EN VERTEBRADOS

CLASE E	PREALBUMINA (TRANSTIRETINA)	ALBUMINA (ALB)	POSTALBUMINA (POSTALB)	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 esta presente en los mamíferos y que en estos, la rata presenta un menor porcentaje de unión (Tanabe *et al* 1969; Refetoff *et al* 1970, Henneman y Docter 1990).

1.3 CAPTURA DE HTs POR ORGANOS BLANCO

Las hormonas tiroideas penetran al interior de las células blanco en forma activa a través de un mecanismo estereoespecifico denominado potocitosis (del griego, *potos*; beber). Este mecanismo de importación transmembranal de las HTs asemeja a la endocitosis y utiliza regiones y proteínas especializadas de la membrana celular llamadas caveolas. Hasta la fecha se ha propuesto que la potocitosis de las HTs corresponde a la subclase mediada por acarreador;

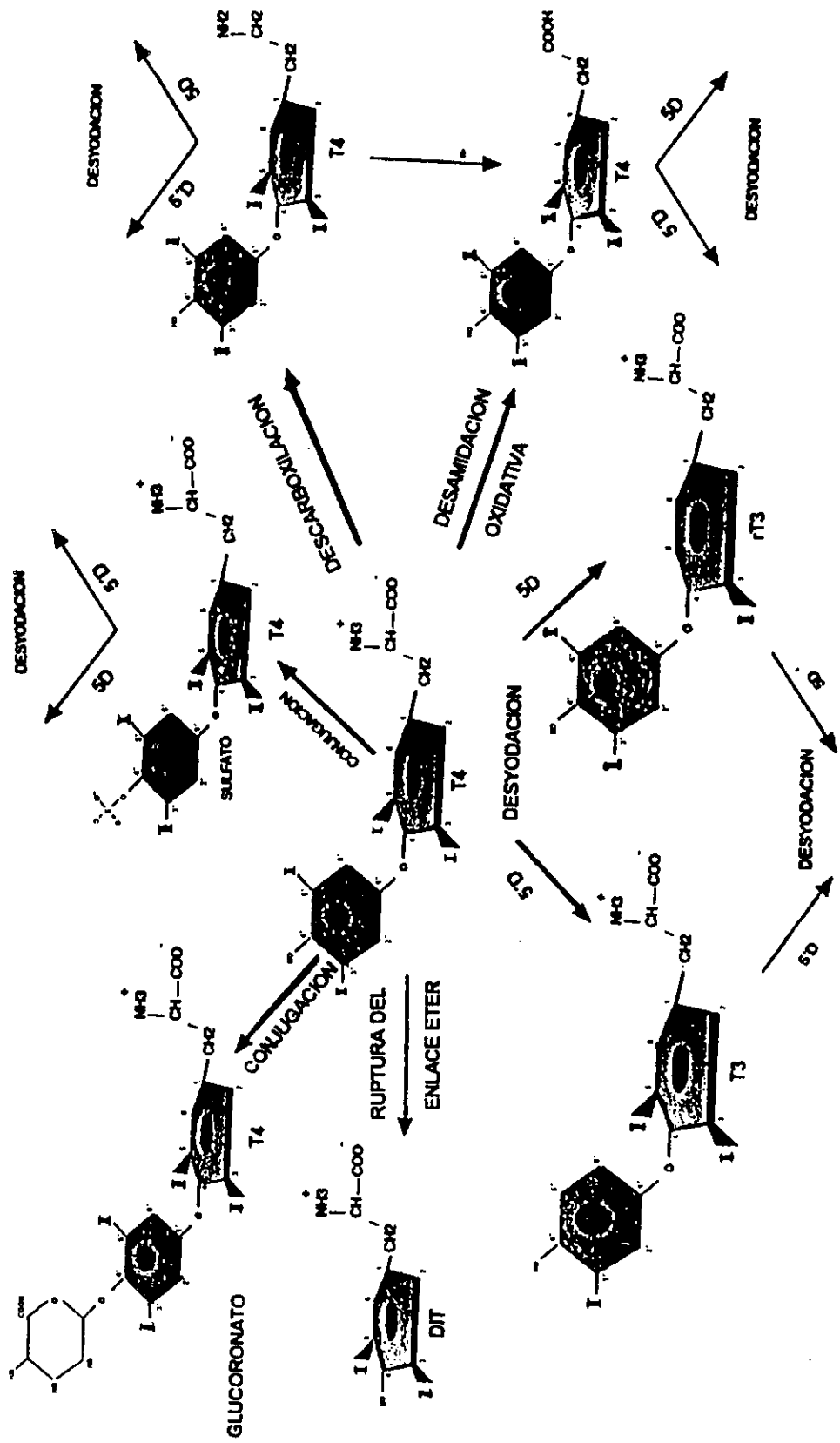
i.e. el complejo tironina/TBPs es secuestrado en la caveola y ya en su interior la hormona liberada difunde por gradiente al citoplasma celular (Anderson, 1993). Además de estas proteínas que unen a las HTs en la membrana celular, también existen proteínas que unen a las HTs en el núcleo, en el citoplasma, en el retículo endoplásmico y en las mitocondrias (Ichikawa y Hashikume, 1991).

1.4 METABOLISMO PERIFERICO DE LAS HORMONAS TIROIDEAS

La T₄ está secretada exclusivamente por la glándula tiroides y constituye el principal producto de la glándula. La T₄, considerada como una pro-hormona, es susceptible de las siguientes modificaciones periféricas: conjugación, desamidación, descarboxilación, rompimiento del enlace éter y desyodación. Las vías anteriores (que se describen en la **FIGURA 2**) no se excluyen mutuamente y pueden ocurrir secuencialmente, ya que por ejemplo, un producto de la sulfoconjugación de T₄ puede ser desyodado posteriormente (Engler y Burger, 1984). Estas vías son importantes en la degradación y excreción de las HTs y representan el 20% de la degradación de T₄. Sin embargo, en los vertebrados, la desyodación de las HTs es la vía metabólica más importante no solo por su papel dual en la activación/inactivación de las tironinas (el 80% de la T₄ es procesada a través de esta vía), sino también por su papel como una vía de recuperación y reciclamiento del yodo. (Chopra *et al* 1978, Engler y Burger, 1984, Kaplan 1986).

1.5 Desyodación Extratiroidea de las HTs

La desyodación de T₄ puede ocurrir tanto en el anillo externo o fenilo como en el interno o tirosilo, generando alrededor del 80% de la T₃ (hormona biológicamente activa) y casi la totalidad de la rT₃ circulante. Como se ilustra en la **FIGURA 3**, actualmente se reconocen dos vías desyodativas. La vía que produce T₃ por la desyodación del anillo fenólico o externo de la T₄ (remoción del yodo en la posición 5' o 3'), se designa vía 5'desyodasa (5'D), o desyodación del anillo externo (ORD). Como genera T₃ a partir de T₄, a esta ruta se le considera la vía de activación, ya que la T₃ es cinco veces más activa que la T₄. Por otra parte, si la desyodación de la T₄ ocurre en el anillo tirosilo o interno de la molécula, se genera rT₃ y por esta razón la vía desyodativa se ha llamado desyodación del anillo interno (IRD), o 5 desyodasa (5 D). Los metabolitos generados carecen de actividad calorigénica o tiromimética y por lo tanto a esta ruta desyodativa (IRD) se le considera como la vía de bioinactivación.



Es importante destacar que las enzimas que participan en estas vías no se han aislado y purificado, por lo que se identifican en base a sus características operacionales y cinéticas (Safran y Leonard, 1991). Se ha intentado, sin éxito, purificarlas utilizando técnicas convencionales de bioquímicas de proteínas, este fracaso se puede explicar en parte por lo siguiente: a) la baja concentración de la enzima (5-20 pmol/mg de proteínas de hígado y riñón); b) la hidrofobicidad del dominio transmembranal de ésta proteína; c) la inestabilidad de la actividad catalítica en presencia de detergentes; d) su dependencia de fosfolípidos y e) el desconocimiento de su co-sustrato fisiológico (Fekkes et al 1983, Leonard, 1991).

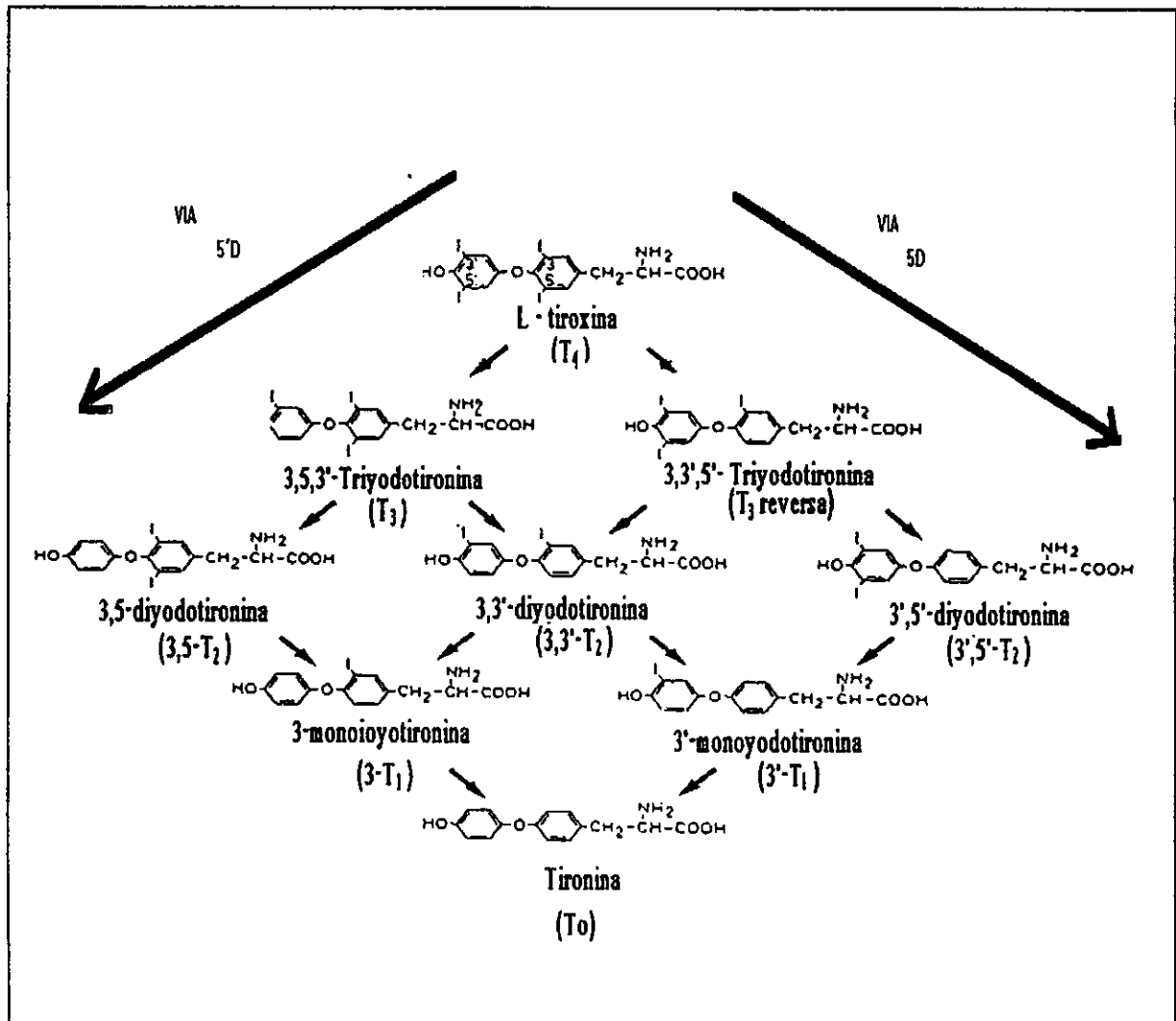


FIGURA 3. DESYODACIÓN EXTRATIROIDEA DE LA T₄. Se ilustra la desyodación secuencial de la T₄ a través de una u otra vía (5'D y 5D), que da como resultado la formación de diferentes tironinas con y sin actividad biológica (Dummont *et al*, 1989; Körhle *et al*, 1987 y 1992; Valverde *et al*, 1993).

1.5.1 Vía de Activación

Como ya se mencionó, por esta vía se produce T₃ a partir de la prohormona T₄, y T₂ a partir de T₃ (**FIGURA 3**). Los 2 átomos de yodo del anillo externo son químicamente equivalentes debido a la rotación alrededor del enlace éter de la molécula de tironina. Los métodos actuales no distinguen cual yodo se quita primero y de ahí su designación 5'D. Por su preferencia de sustrato, el grado de inhibición o susceptibilidad al PTU y su respuesta a cambios fisiológicos, se han identificado dos isoenzimas que catalizan la vía de activación. Ambas enzimas son proteínas integrales de membrana, particularmente del retículo endoplásmico rugoso (RER) y se denominan Tipo I y Tipo II (5'D-I y 5'D-II, respectivamente). Sus propiedades operacionales se resumen en la **TABLA 2**.

5'D-I. Esta desyodasa se define como la enzima que dependiendo del pH del ensayo cataliza la monodesyodación del anillo interno (pH ≈ 6.5) o externo (pH ≈ 8.0) de la molécula de tironina. La Km de esta enzima para sustrato tiene un intervalo μmol/L, y para el cofactor de mmol/L. El sustrato preferencial es T₄ y la actividad enzimática se inhibe con concentraciones mmol/L de propiltiouracilo (PTU) y nmol/L con tioglucosa áurica (GTG). Su mecanismo de reacción es de tipo ping-pong (**FIGURA 4**) y su actividad es elevada en órganos con alto recambio hormonal, como son: el hígado, el riñón y la tiroides y menor en otros tejidos. En el riñón se localiza en la membrana apical de las células epiteliales y en las membranas basolaterales en proximidad con la sangre. Utilizando marcaje de afinidad con derivados bromocetilados de tironinas (¹²⁵I-BrAc-T₃ ó ¹²⁵I-BrAc-T₄) ha permitido establecer que la 5'DI está compuesta de dos subunidades idénticas de 27 kDa cada una, con un coeficiente de sedimentación de 3.67 y un radio de Stokes de 32 a 37 Å (Köhrlé, 1994). Estudios recientes indican que la 5'D-I es una selenio-proteína y se sugiere a la cisteína hiperactiva como el sitio activo esencial (Se-cys) (Leonard J y Visser T 1986; Behne *et al* 1990; Berry *et al* 1991 a, b, c). Esta peculiaridad hace que su actividad sea inhibida por GTG, la cual al unirse al Se forma un complejo estable e irreversible (McNabb, 1992). La actividad de la enzima es directamente proporcional a la concentración o aporte tisular de T₄. Este hecho, así como la presencia de la enzima en órganos con elevado flujo o gasto sanguíneo y la rápida liberación al compartimento vascular de la T₃ producida (10 a 20 min), ha llevado a proponer que la 5'D-I elabora hormona activa para exportación.

Las 5'DI son las desyodasas más estudiadas hasta la fecha. En 1991 se clonó un RNA mensajero (mRNA) a partir de una biblioteca de DNA complementario (cDNA) de hígado de rata. Las propiedades cinéticas así como la especificidad por el sustrato y la sensibilidad a PTU de la proteína codificada por este cDNA (expresado en células en cultivo o en ovocitos de *Xenopus*), confirmaron que es idéntica a la 5'DI. El mRNA tiene 2.1Kb, y codifica para una proteína de

29KDa, que contiene el aminoácido (aa) modificado selenio-cisteína (Se-Cys), posición 126, en su sitio activo. Se ha sugerido que el aa Se-Cys aumenta la eficiencia catalítica de la enzima (Berry *et al* 1991 a y b, 1992a). El mRNA de la DI se ha clonado en diferentes especies (humano, rata y perro) y la comparación de la secuencia deducida, muestra que en las tres especies las enzimas exhiben una elevada homología (99%) (Mandel *et al* 1992, Toyoda *et al* 1994). Todos los cDNA tienen un codón UGA que codifica a la seleniocisteína y requiere de un elemento de inserción llamado SECIS en la región 3' no traducible que tiene forma de bucle. La región SECIS contiene la información para que el codón UGA sea leído de manera que se inserte a la proteína el aa modificado Se-Cys (Berry *et al* 1993). Mientras la DI de rata tiene dos sitios potenciales de glucosilación (Asn -94, y -203), solo el -203 se conserva en humano y perro (Toyoda *et al* 1994). Todas las DI presentan una cisteína altamente conservada, que se localiza en la posición 124, a dos residuos en dirección aminoterminal de la seleniocisteína. Estudios recientes indican que este aa participa en las interacciones con los cofactores (tíoles -DTT-), aumentando la afinidad, y que también participan en la unión con el PTU (Sun *et al* 1997).

A partir de la secuencia deducida del cDNA, se ha identificado que, en el sitio activo se encuentran una Se-Cys (posición 126) que es un aceptor de yodo y 4 histidinas. Dos de éstas (HIS 185 y 283) no participan en la reacción de desyodación y su remoción, carece de efecto. Sin embargo, la remoción de la HIS 158 da una enzima totalmente inactiva y la HIS 174 es crítica para la desyodación, ya que esta involucrada en la unión a la hormona (Mol JA, *et al* 1984, Berry, 1992b). En la unión de la hormona (rT3) a la enzima, también participa la fenilalanina 65 en humano y rata o la leucina en perro.

Toyoda *et al*, demostraron que la DI es una proteína integral de membrana, con la porción del carboxilo terminal orientada hacia el citosol. El dominio transmembranal se localiza entre los aa 11 y 12 y un grupo de residuos cargados en las posiciones 34-39, entonces los residuos cargados en las posiciones 11, 12 y 27 se requieren para la formación óptima de la proteína, pero no para la catálisis. La región amino de la DI contiene una señal no unida y una secuencia con propiedades de paro de transferencia (Toyoda *et al* 1995b).

El gen de la DI, se ha identificado en el ratón (Maia *et al* 1995) y el humano (Toyoda *et al* 1995a). El gen de ratón es de 15Kb y contiene 4 exones, el primero de los cuales contiene el codón ATG que da la señal de inicio. En el segundo exón, se encuentra el codón TAG que codifica para la Se-Cys, y en el cuarto se encuentra el codón de termino TAG, la región SECIS y la señal de poliadenilación ATTAAA.

En años anteriores se había descrito otra isoenzima llamada tipo 5'D I-Low (Körhle *et al*, 1992). Sin embargo, posteriormente se demostró que se trata de un artefacto de la técnica para cuantificar la actividad enzimática ya que se observa dependiendo de la concentración de

cofactor utilizada en el ensayo. Esto se corroboró porque el cDNA para la tipo DI codifica para una sola entidad molecular que exhibe actividad tanto en una Km alta como en una Km baja (Sharifi y St Germain, 1992, St Germain 1994c).

5'D-II. Este isotipo fue descubierto a principios de los 80's al analizar las fuentes intracelulares de T₃ (Körhle, 1987 y 1992; Leonard y Visser 1986; Fekkes *et al* 1982). La enzima tiene mayor preferencia por T₄ que por rT₃, su Km es un orden de magnitud menor (nanomolar) en comparación con la DI, es insensible al PTU, y su mecanismo de reacción es secuencial (FIGURA 4). También se diferencia de la tipo DI en su distribución tisular, localizándose preferentemente en órganos como: hipófisis, corteza cerebral, sobre todo en neuronas, aunque los astrocitos se pueden estimular para expresar a la enzima al elevar el cAMP. También se encuentra en el tejido adiposo café (BAT), placenta, glándulas pineal, de Harder y suprarenal (Fekkes *et al*, 1982; Kaplan y Shaw, 1984a,b; Visser, 1988; Anguiano *et al* 1991). La actividad DII esta estrechamente asociada a la actividad del sistema nervioso simpático y la noradrenalina (NA) tiene un efecto estimulante que en BAT esta mediado por receptores α y β adrenérgicos (Larsen, 1991). Esta es la única desyodasa para la que se ha descrito un patrón de actividad circádico (Guerrero *et al*, 1988; Luna *et al*, 1995). Otra diferencia entre ambas enzimas se refiere a su respuesta durante situaciones fisiológica o patológicas en las cuales la actividad es inversamente proporcional a las concentraciones circulantes de T₄ (TABLA 2). Por esta razón se ha propuesto que esta enzima produce T₃ para autoconsumo, esto es, mantiene los niveles intracelulares de T₃ constantes. Así una disminución de los niveles séricos de T₄, provoca un aumento de esta enzima y viceversa.

El mRNA para ésta enzima se clonó en un anfibio, la *Rana castesbiana* (Davey *et al* 1995). El cDNA obtenido es de 1459 pb. Al igual que la DI tiene un codón TGA (nt 380-382), que codifica para la Se-Cys. Como en el caso de las otras desyodasas, tiene un dominio hidrofóbico en el extremo amino terminal y las 2 histidinas cruciales para la actividad (Berry, 1992b). Otras áreas de alta homología son: el sitio activo (80% con la 5'DI de rata y 87% con la 5DIII de rana) y la región alrededor de la primera histidina (83% con la 5'DI de rata y 5DIII de rana).

A diferencia del resto de vertebrados, el hígado de peces teleósteos, expresa actividad tanto DI como DII (Orozco *et al*, 1997). Usando una biblioteca de cDNA derivada del hígado de un teleósteo marino *Fundulus heteroclitus*, se aisló un mRNA que codifica para una desyodasa con características funcionales virtualmente idénticas a las 5'DII descritas para mamífero y anfibios. El análisis de secuencia de aa mostró que tiene alta homología con el resto de las DII caracterizadas anteriormente, incluyendo el codón TGA que codifica para la Se-Cys, apoyando así la noción de que la familia de las desyodasas está altamente conservada dentro de la

evolución de vertebrados (Valverde-R *et al*, 1997). En tilapia (*Oreochromis niloticus*) recientemente se identificó la actividad de una desyodasa tipo I que es insensible al PTU, IAc y GTG. Este hallazgo se ha explicado, en parte por la presencia de un residuo Pro, localizado a dos residuos de la Se-Cys, (que también se localiza en las desyodasas DII y DIII), y por la baja reactividad del residuo Se-Cys (Sanders *et al*, 1997).

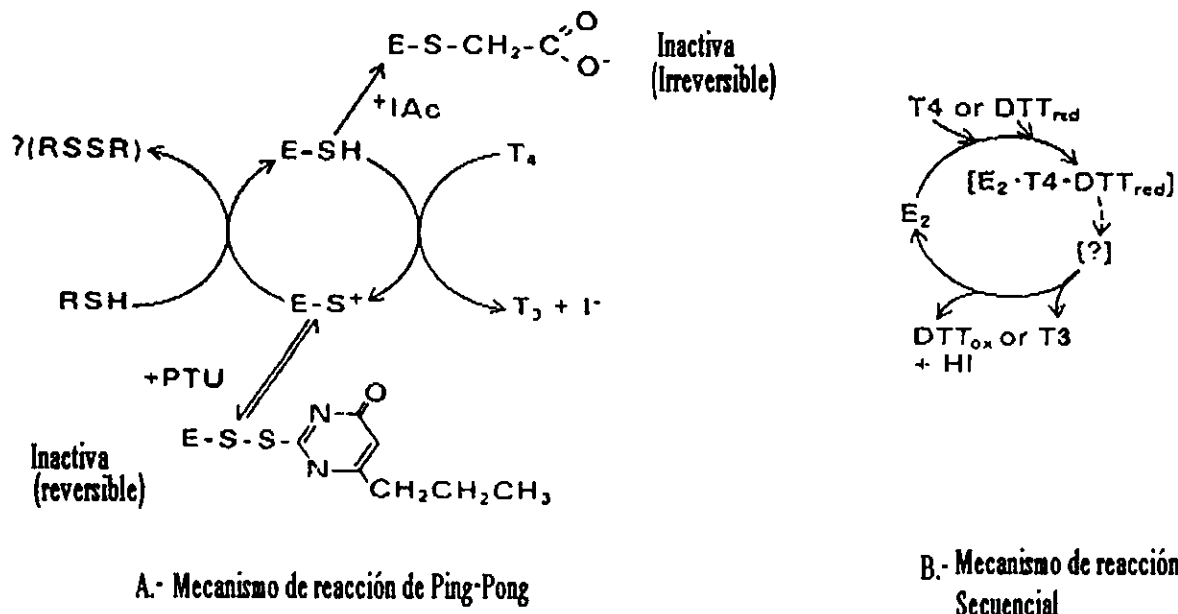


FIGURA 4. DESYODACIÓN DE TIRONINAS. MECANISMOS DE REACCIÓN. La reacción tipo **Ping-Pong** comprende dos pasos: la desyodación propiamente dicha y la regeneración mediante reducción de la enzima oxidada. Como se ilustra en **A**, el yodo es removido del sustrato por una transyodasa/transhidrogenasa en la forma de yoduro (I⁻) y transferido a un grupo SH de la enzima (E-SH). El intermediario enzimático resultante SI (E-SI) representa una forma oxidada de la desyodasa que libera dicho yodo al ser reducida (regenerada) por el cofactor. Este último interviene en la reacción como un sustrato secundario obligado y provee de los equivalentes reducidos para la regeneración de un grupo parcial oxidado del sitio activo de la enzima. Aunque no se conoce con certeza, es probable que este segundo sustrato sea el glutatión. Esta reducción (regeneración) de la enzima es inhibida de manera reversible por PTU ya que compite con el cofactor, reacciona con E-SI formando una mezcla estable enzima-PTU disulfuro. La enzima también se puede inhibir de manera irreversible con Acido Iopanoico (+IAc) el cual bloquea su sitio activo. La presencia de Se-cys en el sitio activo permite que la enzima sea inhibida selectivamente por la tioglucosa áurica (la figura no muestra este último mecanismo). Mecanismo de reacción **secuencial**. Como se muestra en **B**, este mecanismo se caracteriza por la unión de los dos sustratos (hormona y cofactor) antes de la liberación del producto. En otras palabras, las yodotironinas y los tioles (cofactor) deben combinarse en el sitio activo de la enzima antes que la desyodación se lleve a cabo (Visser *et al* 1982, Leonard y Visser, 1986; Nunez, 1988; Berry 1991a, 1992b, Chopra 1978, 1992).

1.5.2 Vía de Inactivación

5DIII La desyodación del anillo interno o tirosilo de la T₄ y de la T₃ genera tironinas inactivas, rT₃ y T₂ respectivamente, y se conoce como la vía 5D-tipo III. Esta inactivación de la prohormona o de la principal tironina bioactiva ocurre en todos los tejidos excepto en la adenohipófisis. Esta enzima se localiza en prácticamente todos los tejidos excepto en la hipófisis. Hasta la fecha se ha detectado en placenta, piel, corteza cerebral, grasa blanca, cerebelo, bazo, corazón, riñón, testículo, pulmón, intestino delgado, hígado y músculo estriado (Roti *et al* 1981, 1982; Emmerson *et al* 1988; Huang *et al*, 1985; Körhle *et al*, 1987 y 1992, Kaplan 1988, Santini *et al*, 1992a,b). En los mamíferos la mayor actividad se detecta en el hígado, cerebro, piel y placenta. A pesar de su evidente importancia fisiológica, se conoce relativamente poco acerca de las propiedades bioquímicas fisiológicas y funcionales de la enzima que cataliza esta ruta metabólica (Körhle *et al* 1987 y 1992).

Como el resto de los miembros de esta familia enzimática, la DIII es una selenio-proteína asociada a membranas microsomales y es más abundante en el retículo endoplásmico. El sustrato preferencial es la T₃ y el secundario es la T₄, y su K_m esta en el orden de nmol/L. Requiere elevadas concentraciones de cofactor 200-800 mmol/L. La enzima es insensible al PTU y GTG, requiere de tioles como cofactor. Su mecanismo de reacción es secuencial y el pH óptimo esta en la alcalinidad 8 a 8.5 (St Germain *et al*, 1994b, c, 1995).

La placenta y el cerebro en desarrollo presentan una elevada actividad DIII. Por ejemplo, en el cerebro la maduración neuronal, se asocian a decaimientos de esta enzima durante el periodo crítico, lo que representa un mecanismo de protección neuronal a los efectos catabólicos o termogénicos de una sobre - exposición a T₃ (McNabb, 1992, Valverde-R *et al* 1993).

La enzima fue clonada en 1994 en anfibios, a partir de tejido muscular de cola de rana *Xenopus laevis* durante la metamorfosis (St. Germain *et al* 1994a y b). Tiene un marco abierto de lectura de 606nt y codifica para una proteína de 202 aa con un peso molecular de 22kDa. La comparación de esta clona con la secuencia para la 5'DI, reveló 5 regiones con homologías entre 53 y 75%. La 5DIII contiene como las desyodasas de la vía de activación el TGA que codifica para la Se-Cys, las dos histidinas críticas para la actividad desyodativa, así como la secuencia consenso para el SECIS en la región 3' no traducible

TABLA 2. PRINCIPALES CARACTERISTICAS DE LAS DESYODASAS EN LOS MAMÍFEROS

PROPIEDAD	5'D-I	5'D-II	5D-III
SITIO DE DESYODACIÓN	AMBOS ANILLOS	ANILLO FENÓLICO O EXTERNO	ANILLO TIROSILO O INTERNO
CINÉTICA	PING-PONG	SECUENCIAL	SECUENCIAL
SUSTRATO PREFERENCIAL	rT3>T4>T3	T4>rT3	T3>T4
PRODUCTO LIMITANTE	T3, rT3, T2	T3, T2	rT3, T2
Km	µM	nM	µM
COFACTOR DTT [Km]	5 mM	20 mM	100 mM
INHIBIDORES			
PTU	INHIBICIÓN (++++)	SIN EFECTO (±)	SIN EFECTO
GTG	INHIBICIÓN (++++)	SIN EFECTO (+)	SIN EFECTO
AC. IOPANOICO	INHIBICIÓN (++++)	INHIBICIÓN (++++)	INHIBICIÓN (++++)
YODOACETATO	INHIBICIÓN (++++)	INHIBICIÓN (+)	INHIBICIÓN (++)
FLAVONOIDES	INHIBICIÓN (++++)	INHIBICIÓN (+++)	INHIBICIÓN (+++)
PESO MOLECULAR (KDA)	55.4	198.7	22
SUBUNIDADES (KDA)	27	29	31
COEF SEDIMENTACIÓN (S)	3.5--4.5	5.22	?
SITIO ACTIVO	Se-Cys	Se-Cys	Se-Cys
DISTRIBUCIÓN EN TEJIDOS			
	HÍGADO, RIÑÓN TIROIDES, GLÁNDULA MAMARIA, MÚSCULO. SNC	SNC, BAT, PINEAL HIPÓFISIS, HARDER, SUPRARENAL.	PLACENTA, SNC, PIEL
LOCALIZACIÓN SUBCELULAR			
	MEMBRANA MICROSOMAL (RER EN HÍGADO) Y MEMBRANA PLASMÁTICA (RIÑÓN).	MEMBRANAS MICROSOMALES Y PLASMÁTICA	MEMBRANAS MICROSOMALES
CAMBIOS DURANTE HIPERTIROIDISMO			
	AUMENTA	DISMINUYE	AUMENTA
HIPOTIROIDISMO			
	DISMINUYE	AUMENTA	DISMINUYE
PROBABLE FUNCIÓN			
	PROVEER T3 AL COMPARTIMIENTO VASCULAR	AUTOCONSUMO	DESACTIVACIÓN DE T3 Y T4, REGULACIÓN DE 5'DII

SNC, Sistema Nervioso Central; BAT, tejido graso café; Km, constante de Michaelis; PTU, 6-propil-2-tiouracilo; GTG, tioglucosa aúrica; M, mol/L; ? Desconocido. (Modificado de Kaplan 1986; Leonard y Visser 1986, Berry y Larsen 1992, y St Germain 1994a y b, 1995).

1.6 ACCIONES Y EFECTOS DE LAS HTs

Las HTs tienen acciones en prácticamente todos los órganos y tejidos del organismo. Sus efectos pueden ser directos o indirectos y se agrupan en dos grandes categorías: efectos metabólicos y efectos sobre el desarrollo. En la **TABLA 3** se resumen sus acciones. La bioactividad de las HTs depende principalmente de las concentraciones intracelulares de T₃, las cuales a su vez están determinadas por: 1) la secreción de T₄ y T₃ por la tiroides; 2) el intercambio de T₄ y T₃ entre el plasma y los tejidos; 3) la conversión extratiroidea de T₄ a T₃ a nivel local; y 4) la degradación metabólica de T₃. Entre los diversos efectos fisiológicos de las HTs, los más característicos y mejor estudiados son, sobre el crecimiento y la diferenciación celular particularmente del sistema nervioso; así como, sus efectos sobre el metabolismo energético y la respiración celular (Davis, 1992; Oppenheimer, 1992). Estos efectos de las HTs están mediados por sus acciones a nivel de la membrana plasmática y a nivel genómico por su interacción con receptores específicos localizados en el DNA nuclear y el mitocondrial (Ichikawa y Hashikume 1991, Nunez, 1988)

Membrana Plasmática y Mitocondrial. Las acciones de las HTs sobre la membrana plasmática pueden afectar la actividad de enzimas, de transportadores o bombas asociadas; Vgr., captura de glucosa, adenilato ciclasa y permeabilidad a K⁺ (Davis 1992). Entre las acciones mejor estudiadas se encuentra la estimulación que las HTs ejercen sobre la actividad de la bomba de Na/K-ATPasa dependiente. La energía para la función de ésta bomba localizada tanto en la membrana plasmática como en la mitocondrial interna, deriva de la hidrólisis de ATP a ADP en un proceso productor de calor (**FIGURA 5**). Las HTs estimulan la síntesis de las subunidades α y β de la ATPasa y aumentan su actividad, así como de la de α - glicerofofostato deshidrogenasa que cataliza la entrada de equivalentes reductores del citosol al sistema de transporte de electrones mitocondriales (Faramaz 1988, Davis 1992).

Acciones Genómicas de las HTs. Se sabe que los receptores nucleares de las tironinas (THR_s) forman parte de la superfamilia de proteínas reguladoras de la transcripción genética a la cual también pertenecen los receptores para esteroides, vitamina D, retinol y otros mensajeros. La unión de la tironina a su receptor, se resume en la **TABLA 4**, induce o reprime la transcripción de mRNAs específicos y explica porque las HTs producen efectos tan diversos *in vivo*.

TABLA 3. ALGUNOS EFECTOS DE LAS HORMONAS TIROIDEAS EN MAMÍFEROS.

CALORIGÉNESIS

FAVORECE LA GLUCÓLISIS Y CONSUMO DE O₂.

↑ SÍNTESIS S/UNIDADES Y ACTIVIDAD BOMBA Na/K
ATPASA DEPENDIENTE. ↑ UCP EN GRASA PARDA. ↑
CITOCROMO C. ↑ TRANSCRIPCIÓN DE LA ENZIMA
MÁLICA.

CRECIMIENTO Y DIFERENCIACIÓN CELULAR

↑ CRECIMIENTO SOMÁTICO, TRANSCRIPCIÓN DE GH.
MADURACIÓN DEL SISTEMA NERVIOSO, OSIFICACIÓN
EPIFISIARIA.

METABOLISMO DE LOS CARBOHIDRATOS

↑ ABSORCIÓN Y UTILIZACIÓN DE GLUCOSA,
GLUCOGENÓLISIS, GLUCONEOGÉNESIS, DEGRADACIÓN
DE INSULINA.

METABOLISMO DE LÍPIDOS

↑ SÍNTESIS, DEGRADACIÓN Y EXCRECIÓN BILIAR DE
COLESTEROL Y ÁCIDOS BILIARES.

METABOLISMO PROTEICO

ANABOLISMO, CATABOLISMO (DEPENDIENDO DE LOS
NIVELES).

METABOLISMO MUSCULAR

↓ CONVERSIÓN DE CREATININA A P-CREATININA,
PRINCIPAL FUENTE ENERGÉTICA.

METABOLISMO HIDROELECTROLÍTICO

↑ FILTRACIÓN GLOMERULAR Y NA-TRIURESIS.

↑ TRANSCRIPCIÓN DE ORNITIN AMINOTRANSFERASA EN
RIÑÓN (CICLO UREA).

↑ TRANSCRIPCIÓN DE RENINA EN GLÁNDULA S/MAXILAR

METABOLISMO DE VITAMINAS

PARTICIPACIÓN EN LA SÍNTESIS DE VITAMINA A.

↓ FOSFORILACIÓN DE TIAMINA. ↑ DEMANDA DE OTROS
COMPONENTES DEL COMPLEJO B.

SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

ESENCIALES (PERIODO CRÍTICO) EN DESARROLLO Y
MADURACIÓN NEURONAL MODULAN LA VELOCIDAD
CONDUCCIÓN-EXCITABILIDAD Y REGULAN LOS PATRONES
CONDUCTUALES.

SISTEMA CARDIOVASCULAR

TIENEN EFECTO INO Y CRONOTRÓPICO

↑ TRANSCRIPCIÓN α-MIOSINA. ↓ TRANSCRIPCIÓN β-
MIOSINA. SINERGISMO CON CATECOLAMINAS.

SISTEMA HEMATOPOYÉTICO

PARTICIPAN EN LA SÍNTESIS DE HEMOGLOBINA,
ABSORCIÓN DE B12 Y ÁCIDO FÓLICO.

APARATO GASTROINTESTINAL-HÍGADO

REGULAN LA VELOCIDAD DE TRANSITO INTESTINAL.
DEPLECIÓN DE GLUCÓGENO HEPÁTICO.

FUNCIÓN HIPOFISIARIA

PARTICIPA EN SÍNTESIS Y SECRECIÓN DE TSH, GH,
FSH, LH Y PRL.

FUNCIÓN REPRODUCTORA

GÓNADAS: NECESARIAS PARA LA REPRODUCCIÓN
NORMAL.

MAMA: ESCENCIALES PARA DIFERENCIACIÓN Y
DETERMINACIÓN FUNCIONAL DE PRIMORDIOS
ALVEOLARES. FORMAN PARTE DEL COMPLEJO
GALACTOPOYETICO.

UCP, termogenina, GH, Hormona de crecimiento; FSH, hormona foliculoestimulante; LH, hormona luteinizante; PRL, prolactina.

TABLA 4 . EFECTOS GENÓMICOS DE LAS HTs

GEN	mRNAs	TASA DE TRANSCRIPCIÓN	LATENCIA DE RESPUESTA (HR)	ORGANO O TEJIDO
GH	↑ 10	↑ 10	>0.5	Células GC
Ornitin aminotransferasa	↑ 3	↑ 2	>4	Riñón (rata)
Fosfoenolpiruvato carboxicinasa	↑ 4-6	↑ 4-6	ND	Hígado (rata)
Enzima málica	↑ 11-16	↑ 3-4	2	Hígado (rata)
Cadena pesada α -miosina	↑	↑	<4	Miocardio (rata)
Renina	↑ 6	ND	1	Glándula S/ Max (rata)
Citocromo C	↑ 3-4	↑ 3-4	12	Hígado y Riñón (rata)
Subunidad α Na/ K -ATPasa	↑ 7.3	↑ 1.4	ND	Hígado (rata)
Subunidad β Na/ K -ATPasa	↑ 2.6	↑ 1.8	ND	Corteza renal (rata)
Termogenina (UCP)	↑ 4	↑ 4	2	BAT
Reductasa HMG-CoA	↑ 20-40	↑ 5	24	Hígado (rata)
S14	↑ 10-14	↑ 3-9	0.1	Hígado (rata)
Subunidad α de TSH	↓	↓	0.5	Tumor tirotrópico (ratón)
Subunidad β de TSH	↓↓	↓↓		Tumor tirotrópico (ratón)
Cadena pesada β - miosina	↓	↓	<4	Miocardio (rata y conejo)
TRH		ND	ND	Hipotálamo (rata)

ND No detectado; Inducción (↑) o represión (↓) por T₃ (Greer, 1991).

Hasta la fecha se han identificado 4 subtipos de THR α s (α 1 y α 2; β 1 y β 2), los cuales muestran una distribución específica y se han identificado en prácticamente todos los tejidos periféricos. Son proteínas no histonas de aproximadamente 50 kD con un coeficiente de sedimentación de 3.5 S y un radio de 1.2. Exhiben una alta afinidad y una capacidad limitada para los siguientes ligandos TRIAC > 3' isopropil > T₃ > T₄ > rT₃ > di y monoyodotirosinas. El receptor clonado a partir de una biblioteca de embrión de pollo, llamado receptor a HTs α (TR- α) está situado en el cromosoma 17, en el humano; mientras que el clonado a partir de una biblioteca de placenta humana y conocido como receptor a HTs β (TR- β) está situado en el cromosoma 3 (McNabb 1992; Oppenheimer *et al*, 1994).

Los THR α s tienen cuatro dominios: 1) la región amino terminal cuya función es de transactivación, 2) una región altamente conservada que se une al DNA y cuya secuencia contiene dos dedos de zinc (asas de aa c/u unida a la proteína por complejo tetraédrico de aa (cisteína) y iones de zinc, este microelemento estabiliza la estructura de la proteína, permitiendo la unión al DNA); 3) la región llamada bisagra, cuya secuencia facilita la dimerización, y 4) la región carboxilo terminal, que une o reconoce al ligando y se designa como al elemento

responsivo a la hormona (TRE). El complejo tironina-receptor facilita la unión a una secuencia específica de nucleótidos llamados elementos de respuesta a tironinas (TREs) de los genes regulados (Ribeiro *et al*, 1995). Un receptor identifica sus genes blanco por la presencia de elementos de respuesta específicos dentro de las porciones reguladoras del DNA, que por lo general se encuentran en los extremos 5' del inicio de la transcripción. Para los TRE, los elementos de respuesta consisten de un hexanucleótido en la secuencia de AGGTCA el cual, por lo general, y tal vez siempre, se encuentra en pares o números mayores, con separaciones arregladas entre los sitios. Los arreglos espaciales precisos de estos sitios es crucial, ya que secuencias muy similares se usan como elementos de respuesta por otros miembros de la superfamilia de receptores. Se requieren proteínas auxiliares del receptor a HTs (TRAP). La identidad de estas proteínas puede variar de un tejido a otro (y de un gen a otro), pero en muchos casos, el receptor a retinoide X (RXR) se ha identificado como el agente activo. Esta proteína es miembro de la superfamilia de receptores nucleares, su ligando es el ácido retinoico 9-cis, un isómero de la forma normal todo-trans. Los heterodímeros entre THR y RXR se unen fuertemente a los elementos de respuesta TRE, en comparación con los homodímeros y también parece que provocan una activación transcripcional mayor de los genes blanco (Oppenheimer, 1992, 1994; Yen y Chin, 1994; Freake, 1995). Hay tres genes que codifican para RXRs y múltiples productos de estos genes (Lazar, 1993) que sugiere una alto grado de complejidad de regulación. Por ejemplo, un elemento de respuesta dado puede favorecer una forma específica de cada receptor. Esta preferencia puede ser influenciada en un tejido de una manera específica por la presencia de otras proteínas que interactúan ya sea directamente con el receptor o con porciones vecinas del gen blanco en el DNA. Las especificidades de estas interacciones aun no se conocen con certeza, especialmente *in vivo*, pero estos sistemas de receptores son lo suficientemente complejos para explicar la acción de HTs observadas en animales intactos.

Respiración Celular y otras Acciones Metabólicas. Aunque hasta hace poco tiempo se pensaba que las HTs desacoplaban en la mitocondria la fosforilación oxidativa reduciendo la proporción P/O; ahora se sabe que este efecto desacoplador es un efecto farmacológico (Davis 1992). Las acciones de las HTs sobre la respiración celular son secundarias a sus efectos sobre la glucólisis al aumentar la captación de glucosa y la entrada de los intermediarios del ciclo de Krebs; así como por sus acciones genómicas regulando la expresión de las enzimas que se indican en la TABLA 4 (Nunez, 1988; Greer *et al*, 1991; Davis 1992). Las HTs estimulan prácticamente todas las fases del metabolismo de las grasas. Movilizan lípidos del tejido adiposo, lo que aumenta la concentración de ácidos libres en la sangre y acelera su oxidación hepática. Disminuyen la cantidad de colesterol, fosfolípidos y triacilgliceridos, y regulan la síntesis de enzimas lipogénicas como la carboxilasa, sintetasa de ácidos grasos y las enzimas málicas,

además coenzimas como la Acetil CoA. Las HTs ejercen efectos opuestos en el sistema de adenilato ciclasa presentes en los adipocitos y en los hepatocitos (Davis, 1992).

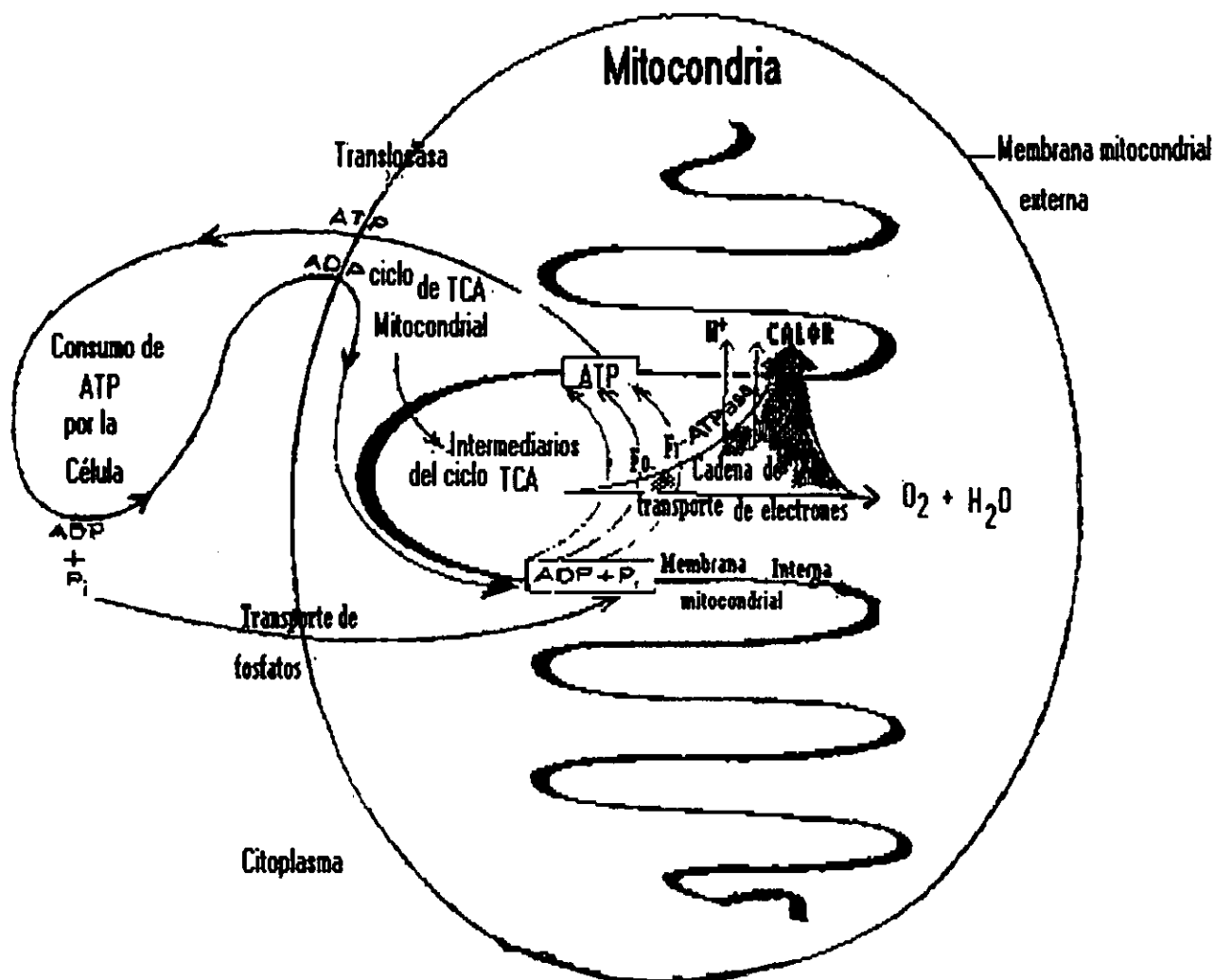


FIGURA 5. DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DE LOS POSIBLES SITIOS DE ACCIÓN DE HTS EN LA MITOCONDRIA. Como se ilustra en ésta figura las acciones de las HTs a nivel mitocondrial ocurren al menos en 5 sitios. 1) Aumentando la actividad del transportador o translocasa ADP-ATP que es la proteína más abundante en las mitocondrias. 2) Regulando la disponibilidad de los intermediarios para el ciclo de los ácidos tricarbóxicos (TCA) o ciclo de Krebs. 3) Aumentando la actividad del transportador mitocondrial de fosfatos, este efecto probablemente está mediado por las acciones genómicas nucleares de las HTs. 4) Facilitando la transferencia intramitocondrial de protones por la ATPasa FoF₁ y 5) Estimulando indirectamente la cadena de transporte de electrones actuando en receptores nucleares y estimulando la transcripción de la subunidad II de la citocromo C oxidasa (Davis, 1992).

Desarrollo y Diferenciación Neuronal. Se sabe que el desarrollo del sistema nervioso en todos los vertebrados es un proceso complejo, multifactorial y heterocrónico en el cual las HTs juegan un papel determinante regulando la neurogénesis y migración neuronal, así como la sinaptogénesis, la proliferación de procesos neurales y la mielinogénesis. También se sabe que la participación de las HTs ocurre en un periodo específico de la ontogenia denominado periodo crítico y que la asincronía; o bien, la deficiencia o exceso de estas hormonas provoca cambios irreversibles (Nunez 1988, Greer *et al*, 1991). Se ha propuesto que este papel neurogénico de las HTs involucra sus acciones a nivel del citoesqueleto, específicamente a nivel del arreglo de los microtubulos ya que regulan la expresión del mRNA de las proteínas TAU. Los microtubulos están compuestos mayoritariamente por tubulina y por las proteínas asociadas a ellos o MAPs. Estas proteínas son promotores del ensamblaje y la estabilidad de los microtubulos. Las proteínas TAU son las más estudiadas y parecen ser las responsables del ensamblaje de los microtubulos ya que se unen a varias moléculas de tubulina simultáneamente facilitando así su polimerización (Alberts 1991). Además de su acción neurogénica durante el periodo crítico, las HTs regulan la inactivación de la 5'D-II neural por un mecanismo extragenómico que también involucra al citoesqueleto. En efecto las HTs estimulan la polimerización de la actina y la internalización de la desyodasa unida a la actina-F hacia reservas de membrana celulares, dando como resultado la pérdida del 50% de la actividad enzimática. Solo la T4 y no la T3 afectan esta actividad, esto sugiere que una de las proteínas citoplasmáticas que unen a las tironinas también une a la actina (Farwell, *et al* 1990).

II FISILOGIA TIROIDEA EN REPTILES

En comparación con mamíferos, la información acerca de la fisiología tiroidea en reptiles, es escasa, fragmentada, controvertida e inconsistente. Los reptiles son los primeros vertebrados totalmente terrestres y, actualmente, se encuentran representados por cuatro grupos: Chelonia (tortugas y t.galápagos), Rhynchocephalia (sphenodon y tuataras), Squamata o lacértidos (lagartijas y serpientes) y Cocodrilia (cocodrilos y lagartos(o caimanes). La información que se resume a continuación se orienta principalmente a lacértidos, en particular a lagartijas, ya que es el tema principal de esta tesis.

2.1 LA GLÁNDULA TIROIDES

La glándula es esencialmente la misma del resto de vertebrados. Está formada por folículos tiroideos con un coloide en su interior que, con excepción de ciclóstomos y teleósteos donde se encuentran distribuidos de manera difusa, en el resto se encuentran agrupados en una glándula. La glándula se encuentra muy vascularizada. El tamaño del folículo esta relacionado con el estado funcional de la glándula (Lynn, 1970).

Morfología

En los reptiles la morfología de la glándula tiroides es variada. En tortugas y serpientes es unipareada, esférica, y se localiza en la parte ventral de la traquea justo antes del corazón. Los cocodrilos tienen una tiroides con lóbulos bien definidos a los lados de la traquea conectados por un istmo estrecho.

En las lagartijas, la glándula exhibe una amplia variedad de formas que son: unipareadas, bilobuladas y completamente pareadas, las cuales se encuentran aún en diferentes miembros de una misma familia. La descripción detallada de las relaciones anatómicas de la tiroides solo se han descrito para algunas especies. Solo en algunas familias, todos los miembros son uniformes con respecto a la forma de la glándula, de hecho las familias más grandes exhiben las tres formas de tiroides mencionadas. Un aspecto notable es que una forma particular de la tiroides, es siempre característica de un género y una especie dada. Así, todos los miembros de esta clasificación taxonómica presentan solo un tipo morfológico. Por esta razón, la morfología de la glándula es útil para indicar las relaciones sistemáticas y evolutivas en las lagartijas. De esta forma se sabe que la condición pareada de la glándula, ha evolucionado de manera independiente, en lagartijas (Iguanidae y Agamidae) y el apareamiento de la tiroides puede ser visto como una consecuencia de la condición no pareada (Amphisbaenia), probablemente con la bilobulada como un paso intermedio (Lynn, 1970).

La regulación de la función de la glándula en los reptiles, es la misma que la descrita anteriormente para mamíferos (ver sección 1.1, 1.2). Su actividad depende del estado fisiológico, por lo que uno de los mejores indicios de ésta consiste en cuantificar la captación de yodo radiactivo, así como, su velocidad de recambio y la proporción de incorporación en varios compuestos involucrados en la síntesis de las hormonas. El estado fisiológico a su vez varía de acuerdo a la temperatura (a la estación), o a las condiciones del medio como son temperatura, humedad, alimentación. Estos aspectos se han estudiado en diferentes reptiles, principalmente en tortugas, lagartijas serpientes y cocodrilos (Lynn *et al* 1965, 1970; Chiu y Wong, 1973, Dunlap 1995).

Con respecto a los receptores de HTs, solo hay un reporte preliminar (Wong y Chiu, 1987), que estudia los receptores para T₃ en eritrocitos de diferentes reptiles (Tortuga, *Gecko* y serpiente). Los valores que reportan son de receptores de alta afinidad (KD 9.1 a 41 pmol/L) y baja capacidad (0.12 a 0.37 fmol/millón de células), los cuales coinciden con los descritos para mamíferos (ver sección 1.6).

2.2 RELACIONES HIPOTALAMO - HIPÓFISIS- TIROIDES

a) *Efectos de Tiroidectomía, Hipofisectomía, Administración de T₄ o TSH.*

Como otros vertebrados, la tiroides de reptiles, se encuentra bajo el control hipofisiario. La hipofisectomía provoca cambios regresivos en la tiroides, se aplanan los folículos y aumenta el coloide. Los tratamientos con extractos de hipófisis en serpientes hipofisectomizadas revierten esta condición. La hipofisectomía también provoca una marcada reducción en la captura de yodo (radioyodo) por la tiroides. La administración de TRH provoca la liberación de TSH, lo anterior se ha comprobado en hipófisis de lagartijas macho (Licht y Denver, 1988). A su vez, la aplicación de TSH extraída de hipófisis resulta en una actividad aumentada de la tiroides, aunque el grado de respuesta varía entre los individuos. La administración de T₄ reduce la actividad tiroidea y disminuye el contenido y secreción de TSH por la hipófisis (Lynn, 1970).

En serpientes macho, la tiroidectomía provoca, después de dos semanas, una pérdida rápida del peso corporal, y en la disminución de calcio en suero y la proporción calcio/fósforo en suero. La administración de T₄ no revierte totalmente el daño en la anemia que aparece. En contraste, en hembras, la tiroidectomía no tiene efectos aun con altas temperaturas y T₄ aumenta los eritrocitos y Hb. La actividad disminuida en invierno y aumentada en verano aumenta la sobrevivencia, además se sabe que participan otras hormonas como las esteroides (Thapliyal, 1980).

En los endotermos por lo general, la tiroidectomía deprime y los tratamientos con T₄ aumentan la tasa de respiración. Sin embargo, estas manipulaciones experimentales en reptiles, son temperatura-dependientes (Thapliyal, 1980, John-Alder, 1984a). En reptiles además de la temperatura, el estatus

fisiológico (estaciones del año), también influye en la respiración de los tejidos. Hígados aislados y músculos esqueléticos de lagartijas de jardín machos adultos mantenidos con un fotoperiodo constante de 12L:12O y 39 ± 2 °C muestran diferentes tasas de respiración cuando se miden a 30°C con y sin T4 en los diferentes meses del año. Esta variación se puede deber a que los tejidos exhiben un ciclo anual de sensibilidad a hormonas tiroideas, o a que la respuesta depende del estatus fisiológico del animal. En muchos reptiles se ha demostrado que los esteroides gonadales también influyen en la respiración y que inclusive pueden suprimir la reducción en la captura de oxígeno en tejidos después de una tiroidectomía (Thapliyal, 1980, Haldar-Misra y Thapliyal, 1981).

b) Efectos de drogas bociogénicas

Existen diferentes drogas que inhiben la función tiroidea ya sea al interferir con la captura de yodo o al inhibir la formación de proteínas yodadas, por lo que producen alteraciones semejantes a una tiroidectomía. La glándula tiroidea de animales tratados con estas drogas, muestra hiperemia, hiperplasia o hipertrofia del epitelio folicular. Si el tratamiento continua se provoca bocio. Esto se atribuye a un aumento de TSH dado por niveles circulantes bajos de HTs. El uso de estas drogas bociogénicas representa un método menos radical que la tiroidectomía para estudiar la respuesta de la hipófisis a la respuesta de deficiencia tiroidea (Lynn, 1970; Licht y Denver, 1988).

2.3 CAMBIOS ESTACIONALES EN LA TIROIDES

a) Cambios estacionales relacionados con la Temperatura

Se han reportado cambios estacionales en la apariencia histológica de la tiroidea en algunas lagartijas (por ejemplo *Lacerta*, *Sceloporus undulatus*). Estos cambios, como se puede esperar, indican una mayor función en verano en comparación con invierno. Las observaciones histológicas puedan estar influenciadas por la temperatura del aire; por la bien conocida conducta de reptiles de calentamiento por el sol, la información de los promedios de la temperatura del aire pueden diferir ampliamente de las temperaturas en las que los animales actualmente se ven expuestos (Avery, 1976). Cuando la temperatura del aire es baja, la mayoría de los reptiles pasan la mayor parte del día asoleándose, y viceversa. La exposición crónica (13 semanas) de especies de *Sceloporus* a altas temperaturas (34 a 35°C) aumentó significativamente el epitelio tiroideo al cabo de 3 semanas, y la tasa de mortandad a partir de las 6 semanas (Lynn, 1970; Leatherland 1987). Además de estos cambios relacionados con la temperatura, se conoce que la función tiroidea se modifica con la actividad reproductora (ver mas adelante). Los niveles circulantes de HTs en las hembras preñadas de *Lacerta vivipara* son ligeramente más altos en comparación con las no preñadas, pero también es un efecto relacionado con el hecho que las hembras preñadas de este género se exponen al sol por periodos mas prolongados (Lynn, 1970). La temperatura corporal de hembras de lagartijas varía considerablemente entre las especies, ya que

algunas presentan temperaturas mayores o menores en el periodo de reproducción. En el caso del género *Sceloporus* la temperatura corporal es menor en este periodo en comparación con el no reproductivo (Andrews, 1997).

Por lo general la función tiroidea en reptiles varía proporcionalmente con la temperatura, aunque no se conocen aún las relaciones causa-efecto. La actividad tiroidea en lagartijas de clima templado es mayor en las estaciones cálidas. La reducción artificial de la temperatura en los meses de verano reduce la actividad tiroidea, de esta manera, la actividad de la glándula es mayor cuando se mantienen a 35°C que a 15°C. Sin embargo, la máxima actividad tiroidea también se correlaciona con la reproducción. Una excepción de lo descrito anteriormente se presenta en varias especies de lagartijas como por ejemplo *Agama*, cuya actividad tiroidea se deprime en invierno. De hecho esta especie de lagartijas es mas activa en invierno que en verano. Este aumento en la actividad tiroidea también se correlaciona con un aumento en la humedad y en la actividad, lo que sugiere una relación compleja entre la actividad tiroidea, el estado de actividad del animal y los factores ambientales (Lynn, 1970; Norris, 1997). Así, se sabe que existe una relación directa entre la temperatura del ambiente y la captura de yodo, y que la administración de TSH no modifica la captura de yodo con muy bajas temperaturas (2-3°C). Las tiroides de lagartijas (*Anolis carolinensis*) mantenidas a 35°C mostraron evidencia histológica de una actividad marcadamente mayor con menor variabilidad en comparación con las mantenidas a 15°C, pero el efecto de ésta diferencia de temperatura en la captación de radioyodo es muy grande.

La longitud del día también puede influenciar la actividad tiroidea. En las tortugas la exposición a luz continua provoca en la tiroides una estimulación, que es máxima en 5 días y gradualmente disminuye hasta que la glándula está inactiva en el día 35 (Lynn, 1970; Leatherland 1987).

b) Cambios relacionados con los ciclos reproductores

El estudio de los ciclos de reproducción en diferentes especies de reptiles ha mostrado una relación directa entre la actividad de la tiroides con la actividad gonadal. Así, por ejemplo, en *Sceloporus occidentalis* a lo largo del periodo de actividad (Marzo a Noviembre), ocurre un aumento gradual en la altura del epitelio tiroideo en ambos sexos, que es mayor durante el periodo de apareamiento (Abril o Mayo hasta Junio). Posteriormente hay una disminución en hembras después de la oviposición. Los machos mostraron una disminución más gradual empezando en Julio hasta Septiembre. La espermatogénesis ocurre en poco tiempo después de la hibernación y tiene lugar en un periodo de actividad tiroidea relativamente baja. Hay un aumento del tamaño de los testículos cuando el epitelio tiroideo es alto y luego decrece. En hembras hay un aumento en la altura del epitelio tiroideo asociado con el depósito de yema (vitelogénesis) y en la ovulación. Se ha sugerido que estos cambios son secundarios al aumento en la síntesis y secreción de hormonas tiroideas (Lynn 1970, Leatherland 1987, Norris, 1997).

Para el caso de *Sceloporus grammicus* (especie utilizada en este trabajo), se conoce que ambos sexos también presentan actividades reproductivas en diferentes estaciones. Los machos alcanzan la máxima producción de esperma a principios del verano (Mayo- Julio), cuando inseminan a las hembras, mientras que éstas comienzan la vitelogénesis a finales del verano y la ovulación se da principalmente en septiembre (hasta noviembre). El esperma se conserva en los oviductos por aproximadamente tres meses (Guillete, 1980; Méndez de la Cruz, 1989).

El hipo e hipertiroidismo provoca un deterioro en la actividad reproductiva en diferentes especies (en hembras atresia folicular y atrofia ovárica y en machos pérdida de células de Leydig y regresión gonadal), por lo que se requieren niveles óptimos de HTs para la función gonadal normal. Obviamente la glándula tiroidea varía en su actividad durante el año y además de la temperatura puede estar influenciada por otras hormonas como la somatotropina (GH) y las gonadotrópicas (Eyeson, 1970; Hadar-Misra y Thapliyal, 1981; Letherland, 1987). En lagartijas hipotiroideas la T4 restablece el peso testicular, T3 no participa o participa muy poco en el aumento del peso gonadal. (Chandola-Saklani, 1990).

2.4 Hormonas Tiroideas y Vitelogénesis

El hipo o hipertiroidismo inducen pérdida de la yema en los oocitos del ovario de *Agama*, se requieren niveles normales de HTs para que se realice éste proceso. Se sabe que las HTs son permisivas (Leatherland, 1987; Callad *et al*, 1994).

2.5 Tiroides y Muda

La relación entre la función tiroidea y la muda se ha estudiado en diferentes especies lagartijas, en el género *Lacerta*. La tiroidectomía provoca el cese de la muda. En animales sin tiroides la capa córnea se forma de manera continua y no ocurre la diferenciación de la capa del borde externo. La tiroides está relativamente inactiva durante la fase de formación rápida y estratificación de una nueva epidermis, sin embargo, en un periodo breve de muda, la altura del epitelio tiroideo y la liberación del coloide aumentan. Esta actividad continua por varios días después de la muda y disminuye gradualmente hasta alcanzar un punto bajo en el periodo que precede a la siguiente muda. En animales tiroidectomizados se inhibe o se alarga el periodo entre las mudas. Los implantes tiroideos en músculo o la administración de tiroxina, revierten el efecto permitiendo las mudas. Estudios en lagartijas mostraron que T4 acelera la muda en mayor proporción que T3. En el mismo trabajo el uso de ácido iopanoico inhibe la desyodación periférica, pero no afecta a la muda, lo que sugiere que T4 actúa ya sea directamente o bien estimulando la secreción de otras hormonas (Chandola-Saklani, 1990). La muda en squamata también esta influenciada por otros factores como son extractos de timo, GH, ACTH,

hormonas sexuales y PRL. Se desconoce si estas hormonas actúan directamente o a través de modificar la función tiroidea. En condiciones experimentales con temperaturas superiores aumenta la frecuencia de las mudas. La hipofisectomía también inhibe la muda, efecto que se revierte con la administración de TSH o prolactina. Esta última hormona aumenta la acción de T4 en animales intactos (Lynn, 1970).

De manera sorprendente, para serpientes (como *Python*, *Natrix*, *Vipera*) la influencia tiroidea es lo inverso que lo observado en lagartijas. La hipofisectomía o tiroidectomía provocan un aumento en las mudas. Hasta el momento no se ha dado explicaciones de esta notable diferencia entre estos dos tipos de reptiles (Chiu y Lynn, 1970).

2.6 Tiroides y Diferenciación en el Crecimiento

No hay estudios detallados que correlacionen la tiroidectomía, la inhibición tiroidea, la administración de T4 o de TSH con el crecimiento de reptiles jóvenes. Hay alguna evidencia que la tiroidectomía inhibe el crecimiento de lagartijas (*Lacerta agilis* o *Sceloporus undulatus*) jóvenes, lo que sugiere que la relación entre el crecimiento y las HTs son similares a los patrones descritos para mamíferos (Lynn, 1970, Norris, 1997).

La inhibición de la función tiroidea en el desarrollo embrionario se ha estudiado en tortugas *Chelydra*. Los huevos se trataron con tiourea inyectada en la albúmina. Los embriones mostraron una deficiencia en el crecimiento, anomalías en el caparazón, la eclosión se retrasó y no presentó la retracción normal del saco vitelino. La tiroidectomía de hembras preñadas de *Lacerta* 6 a 8 semanas antes del término provocó partos prematuros de los huevos, sin embargo los embriones eran normales (Lynn, 1970).

2.7 Tiroides y Otros Organos Endocrinos

Los cuerpos ultimobranquiales (cuerpos postbranquiales) se hipertrofian en lagartijas tiroidectomizadas, exhiben los mismos cambios estacionales en la actividad secretora que la observada en la tiroides, más aún, responden a TSH de la misma forma, pero la hipofisectomía no produce cambios en estas estructuras. La remoción de estos no producen cambios en la tiroides. Lo anterior sugiere que en los reptiles, la relación de éstas dos glándulas es misma que en mamíferos, i.e secreción de tirocalcitonina al aumentar la concentración de calcio en el suero. La remoción del ojo parietal (o pineal) en lagartijas (*S. occidentalis* y *Uma* o) provoca estimulación tiroidea, se sugiere que el ojo parietal puede producir una hormona que ejerce una inhibición de la actividad corporal del animal, probablemente vía la glándula pineal, hipófisis, tiroides y otras glándulas endocrinas. Así, la destrucción de la región epifisial se acompaña de inactividad testicular y de estimulación tiroidea. En animales parietalectomizados,

mantenidos a temperaturas medias de su hábitat natural, se observó un aumento en la altura del epitelio tiroideo y reducción del coloide aun meses después de la operación. Las lagartijas que se regresaron a su hábitat, mostraron un aumento en la actividad en invierno y primavera, pero no en verano, o sea que la operación no afecta el comportamiento anual de la tiroides, (Lynn 1970, Thapliyal, 1980).

2.8 Efectos Misceláneos de HTs

En serpientes, la tiroidectomía provoca la formación de cristales fluidos en el timo, la inyección de extracto de timo mamífero, inhibe la actividad tiroidea y se acompaña de un aumento de muda (Lynn, 1970). En *Lacerta* provoca una disminución gradual de la actividad física, del apetito y mueren de 3 a 8 meses después con aparición de anemia debida a un déficit hematopoyético. La administración de tiroxina previene la aparición de éstos síntomas. También las HTs aumentan el comportamiento territorial y la irritabilidad. (Lynn, 1970; Thapliyal, 1980).

2.9 Metabolismo de Carbohidratos, Proteínas y Lípidos

En lagartijas de jardín hipo- o hipertiroideas, la glucemia disminuye en el invierno. En las serpientes acuáticas la tiroidectomía no modifica la glucemia y aumenta el glucógeno hepático. La tiroxina revierte los efectos sobre glucógeno hepático y esquelético resultando en hiperglucemia. A diferencia de las lagartijas de jardín, parece que en serpientes acuáticas es importante que la glucosa sanguínea no baje de cierto nivel. Puede tener significado adaptativo, ya que asegura un suplemento estable de glucosa como combustible metabólico al cerebro especialmente en invierno cuando el consumo de O₂ en el cerebro es alto. En lagartijas de jardín la tiroidectomía no tiene efecto en el contenido de proteínas sanguíneas. El efecto sobre ácidos grasos libres varia en diferentes especies. En *Calotes* no hay cambio en invierno, pero en verano, la tiroidectomía provoca disminución de ácidos grasos libres (FFA) en el plasma sin afectar los niveles de triacilglicéridos (TG). Por otro lado, en lagartijas normales o tiroidectomizadas, la administración de T₄ reduce los TG en el invierno y no influye en los FFA. Los niveles de colesterol sanguíneo solo se ven afectados (disminuyen) con altas temperaturas (Thapliyal, 1975; Leatherland, 1987). No están claros los efectos de las HTs en otros parámetros metabólicos, pero la condición eutiroidea puede ayudar a la normoglucemia al aumentar el glucógeno en hígado y músculo y puede estar relacionado en el metabolismo de lípidos a través del control de concentraciones de triglicéridos y FFA hepáticos y los triglicéridos del plasma (Thapliyal, 1980; Chester-Jones *et al*, 1987; Jacob y Oomen, 1990). Además la tiroxina tiene efectos en enzimas asociadas al metabolismo de carbohidratos y proteínas (ver 2.10).

2.10 Tiroides y Enzimas metabólicas

Aun no está claro si al igual que endotermos, las HTs juegan un papel en la regulación del balance metabólico de los reptiles. Así, por ejemplo, no se ha podido correlacionar los efectos directos de la administración de T₄ o la tiroidectomía en el metabolismo oxidativo. Los efectos fisiológicos de las HTs en lagartijas se han estudiado ya sea con el suplemento (administración de T₄ o TSH) o la supresión hormonal (tiroidectomía). Estos estudios han demostrado claramente en uno u otro procedimiento, estimula o disminuye respectivamente, la tasa metabólica estándar (SMR), evaluado por el consumo de oxígeno de todo el organismo o de órganos como: hígado, cerebro, corazón y pulmón. Sin embargo, estos efectos, solo se observan con temperaturas mayores a 30°C, en el intervalo de 21 a 24°C no observaron dichos efectos (Lynn, 1970; Wong *et al*, 1975; Thapliyal, 1980; John-Alder, 1984a; Chester-Jones *et al*, 1987; Jacob y Oomen, 1990).

Para comprender la función de las HTs en la regulación de la SMR, se han estudiado diferentes enzimas que se sabe reflejan el gasto energético durante la actividad. Así, como indicador de la capacidad de glucólisis aerobia se analizó a la piruvato cinasa, como indicador de la capacidad mitocondrial de la oxidación, a la citrato sintetasa y como indicador del intercambio de NADH entre citosol y mitocondria, a la α -glicerolfosfato dehidrogenasa (α -GPDH). La piruvato cinasa es independiente, mientras que la citrato sintetasa, si es dependiente de HTs y tiene su máxima expresión en animales eutiroideos. En lagartijas (*Sceloporus*) hipotiroideas disminuye la capacidad de locomoción y su capacidad de oxidación en músculo (John-Alder, 1984a,b). Solo la α -GPDH citosólica se vio afectada por aumentos en los niveles de T₄ (este aumento no ocurre en ratas), por lo que se sugiere que la administración de T₄ puede aumentar la capacidad de locomoción, al aumentar la capacidad de gluconeogénesis (John-Alder, 1990).

La comparación de las mitocondrias de reptiles (lagartija) con mamíferos (rata), que tienen la misma masa y temperatura corporal ha mostrado que la membrana interna de la mitocondria de la lagartija (*A. vitticeps*) es varias veces menos permeable a los protones que la mitocondria de rata. Esto se debe a que presentan una composición alterada de los fosfolípidos de membrana. La rata tiene de 7 a 8 veces el número de dobles enlaces en la mitocondria en comparación con la de reptiles, son 5 veces más permeables, lo que provoca una fuga mayor de protones (por tanto, mayor generación de calor) y el doble del consumo de oxígeno (Brand *et al* 1991).

En un esfuerzo por sistematizar toda la información revisada hasta aquí, en la **TABLA 5** se resumen los principales efectos de las hormonas tiroideas en reptiles.

TABLA 5. Algunos efectos de las Hormonas Tiroideas en Reptiles.

RESPIRACIÓN CELULAR/CALORIGÉNESIS ↑ SOLAMENTE CON ALTAS TEMPERATURAS.	METABOLISMO DE IONES TIROIDECTOMIA REDUCE CONCENTRACIONES DE CALCIO Y FOSFORO.
CRECIMIENTO Y DIFERENCIACIÓN CELULAR SEMEJANTE A MAMÍFEROS (↑ CRECIMIENTO SOMÁTICO, TRANSCRIPCIÓN DE GH. MADURACIÓN DEL SISTEMA NERVIOSO, OSIFICACIÓN EPIFISIARIA).	CONDUCTA DEPENDIENTE DE LA TEMPERATURA. CON BAJAS TEMPERATURAS ↓ ACTIVIDAD FÍSICA, CON ALTAS TEMPERATURAS ↑ ACTIVIDAD, COMPORTAMIENTO TERRITORIAL Y LA AGRESIÓN (EN MACHOS).
MUDAS LAGARTIJAS: HIPOTIROIDISMO ↓, HIPERTIROIDISMO ↑ EL NÚMERO, EN SERPIENTES: EFECTO OPUESTO.	SISTEMA HEMATOPOYÉTICO (SERPIENTES) EN HEMBRAS, T ₄ ↑ RBC Y Hb. TX SIN EFECTO AUN CON ALTAS TEMPERATURAS.
METABOLISMO DE LOS CARBOHIDRATOS EN INVIERNO ↓ GLUCEMIA (SIN IMPORTAR EL ESTADO TIROIDEO), EN VERANO ↑.	ABSORCIÓN ES DEPENDIENTE DE LA TEMPERATURA.
METABOLISMO DE LÍPIDOS ↓ COLESTEROL LIBRE EN VERANO, EN INVIERNO SIN EFECTO. EN VERANO Tx ↓ FFA, SIN AFECTAR TG. EN INVIERNO T ₄ ↓ TG SIN AFECTAR FFA.	FUNCIÓN HIPOFISIARIA SIMILAR A MAMÍFEROS (PARTICIPACIÓN EN SÍNTESIS Y SECRECIÓN DE TSH, GH, FSH, LH Y PRL).
METABOLISMO PROTEICO EN VERANO ↑ PROTEÍNAS, EN INVIERNO SIN EFECTO.	FUNCIÓN REPRODUCTORA EN PERIODOS DE REPRODUCCIÓN HIPOTIROIDISMO ↓, HIPERTIROIDISMO ↑ TAMAÑO GÓNADAS. PARTICIPAN EN LOS CICLOS REPRODUCTORES. PERMISIVAS EN LA VITELÓGENESIS. GESTACIÓN/PARTO. EN VÍPARAS SIN EFECTO, EN OVÍPARAS HIPOTIROIDISMO: DEFICIENCIA DE CRECIMIENTO O PARTOS PREMATUROS.
METABOLISMO MUSCULAR ACTIVIDAD MUSCULAR TEMPERATURA-DEPENDIENTE.	

↑, aumenta; ↓, disminuye; FFA, ácidos grasos libres; FSH, hormona foliculoestimulante; GH, Hormona de crecimiento; Hb, Hemoglobina; LH, hormona luteinizante; PRL, prolactina; RBC, eritrocitos; TG, triacilglicéridos, Tx tiroidectomía, T₄ tiroxina. (Tomado de: Eyeson, 1970; Chiu, 1970; Lynn, 1970; Thapliyal, 1980; Guillete, 1980; Haldar-Misra, 1981; John-Alder, 1984a; Chester-Jones, 1987; Leatherland 1987; Licht, 1988; Méndez de la Cruz, 1989; Chandola-Saklani, 1990; Jacob, 1990; Callad IP, *et al*, 1994; Andrews, 1997; Norris, 1997).

III ADAPTACION ENZIMATICA A LA TEMPERATURA

Cuando los organismos colonizan un nuevo ambiente se ven expuestos a diferentes presiones de selección, una de las más importantes es la temperatura la cual determina los límites de distribución, los intervalos en que funcionan y la sobrevivencia de los organismos. En respuesta a los problemas generados por la temperatura los organismos han adoptado dos formas de adaptación muy diferentes: la endotermia y la ectotermia.

En los organismos ectotérmicos la temperatura corporal esta determinada por la temperatura del ambiente (Hochachka y Somero, 1984). Los ectotermos terrestres tienen una mayor fluctuación de la temperatura en comparación con los acuáticos (Prosser, 1991). En condiciones naturales la demanda impuesta por el calor o el frío ambiental determina, en todos los organismos cambios o respuestas compensatorios en la fisiología o en la morfología que ayudan al individuo a enfrentar y/o resistir dicha demanda.

Al conjunto de cambios que un animal experimenta en un marco natural se le denomina ambientación. En un concepto más restringido la aclimatación se refiere al cambio(s) fisiológico(s) específico(s) desarrollado(s) en un tiempo, en el laboratorio, en respuesta a la variación de un único factor ambiental como la temperatura (Eckert, 1988).

En el ambiente térmico heterogéneo de los ectotérmicos terrestres, factores como la radiación solar, (cielo y tierra), conducción del sustrato, evaporación del agua, y la conversión libre y forzada por el viento pueden influir en la temperatura corporal. Si el comportamiento etológico es posible, existe una tendencia a estabilizar la temperatura corporal alrededor de la temperatura preferida (termorregulación etológica). Esta temperatura se puede alterar con la aclimatación en muchas especies (White y Somero, 1982).

La agrupación o preferencia de los vertebrados ectotérmicos alrededor de una cierta temperatura, cuando se ofrece una opción en un gradiente térmico, se ha demostrado en ciclóstomos, elasmobránquios, teleósteos, anfibios y reptiles. Entre los anfibios y reptiles esta termorregulación etológica se puede dar por medio de ciertos comportamientos estereotipados, incluyendo las posturas de calentamiento (asoleo) que aumentan la captura de calor solar, estabilizan la temperatura corporal (la orientación hacia el sol) y retrasan la pérdida de calor (Crawshaw, 1979).

Los sistemas termorregulatorios de todos los vertebrados incluye la integración de información proveniente de receptores termosensibles del tallo cerebral y/o columna vertebral con información de receptores periféricos. El procesamiento e integración de esta información se realiza en la zona preóptica hipotalámica anterior. Todos los vertebrados parecen ser sensibles a temperaturas periféricas y profundas, que se comparan con una temperatura de referencia (punto de ajuste) neural. La diferencia o discrepancia entre ambas registrada (Crawshaw *et al*, 1990), determina las respuestas etológicas o

neurales, que permiten un control considerable del estado térmico y, si el ambiente presenta opciones térmico, las temperaturas corporales se pueden conservar en un intervalo cercano a la temperatura preferida. Este patrón común de las especies o de las poblaciones, así como el control específico de la temperatura y la selección (como son cambios entre sol y sombra y retiro a lugares subterráneos), indican que la preferencia térmica debe estar asociada, de manera adaptativa con el funcionamiento fisiológico y bioquímico óptimo de los organismos (Crawshaw *et al*, 1990).

La regulación alrededor de una temperatura particular incluye dos estrategias térmicas diferentes: 1) En muchas especies los organismos intentan defender una temperatura corporal absoluta dada cercana a la temperatura preferida, y 2) En otras especies, los organismos pueden seleccionar un número de temperaturas durante el curso del día. La clave en la selección de éste régimen térmico, es lograr una temperatura óptima en un tiempo promedio que permita las funciones fisiológicas, por ejemplo el crecimiento y la eficiencia en la asimilación.

Aunque se ha demostrado que una variedad considerable de sistemas fisiológicos y bioquímicos pueden funcionar de manera óptima cerca de las temperaturas preferidas, no se debe concluir que la preferencia térmica de un organismo es un componente estático del repertorio conductual. Muchos factores, físicos y químicos, pueden interactuar para producir variaciones en la preferencia térmica de un organismo. Por ejemplo, al igual que los vertebrados endotérmicos, los organismos ectotérmicos infectados con bacterias gram-negativas y toxinas de bacterias, aumentan su temperatura corporal. En ectotermos por supuesto la "fiebre" es por comportamiento, que se da a través de la selección de una temperatura más elevada en un gradiente térmico. Estas fiebres etológicas han sido observadas en peces, ranas y lagartijas. En estos estudios la intensidad de la fiebre varió en un intervalo de 2- 6.5 °C sobre la temperatura preferida y fue abolida con la administración de antibióticos (White y Somero, 1982).

La variabilidad estacional en la temperatura corporal es una característica funcional *sine qua non* de los ectotermos. Sobre bases únicamente físicas, las alteraciones en los intervalos de los procesos bioquímicos, el estado físico de los lípidos y la solubilidad de los gases respiratorios en los fluidos biológicos, se anticipan como una consecuencia del estado térmico alterado. Así, por ejemplo, dado que la solubilidad del coeficiente de CO₂ es una función de la temperatura, podemos esperar alteraciones en la temperatura corporal para hacer uso de cambios en el estado ácido-base de los fluidos corporales. Estas alteraciones deben corresponder a la bioquímica ya que la concentración de protones [H⁺] es un factor crucial para gobernar las actividades de las enzimas y de otras proteínas. (White y Somero, 1982).

3.1 Temperatura-pH

Como se mencionó arriba, las variaciones en la solubilidad de los gases van a producir cambios en el pH. Cambios pequeños tienen influencias extraordinarias en la velocidad y proporción de los procesos metabólicos así como en la estabilidad de las proteínas. Por esta razón todos los organismos aplican un esfuerzo considerable para controlar el pH sistémico.

En todos los vertebrados se sabe que existe una correlación inversa y constante entre pH y temperatura de ~ -0.015 unidades (U) de pH/°C (varía de acuerdo a la especie). Esta relación constante requiere de la presencia de un amortiguador con un pK de alrededor de 7 y una entalpía de ionización de aproximadamente 7 kcal/mol. Estas relaciones han sido evaluadas por Reeves (1972), quien argumentó que la pendiente de esta función es influenciada de manera importante por la interacción de dos sistemas de amortiguación de ácidos débiles con bases conjugadas. Estos sistemas de amortiguación son: 1) los sistemas de ácido carbónico - bicarbonato, que son intercambiados en una manera dependiente de la temperatura, y 2) los derivados de imidazol: que son histidinas unidas a proteínas, y amortiguadores conteniendo dipéptidos de histidina e histidinas libres (Reeves, 1977, White y Somero, 1982).

Los efectos de la temperatura sobre el pH de diferentes órganos en los vertebrados están ampliamente documentados. Así, por ejemplo, en el hombre, los valores de pH, en la sangre arterial a 37 y 41°C son de 7.4 y 7.34 respectivamente. En la sangre de la piel a 25°C, el pH es de 7.58 (Rahn y Reeves 1980). Sin embargo, en el caso de muchas especies de ectotermos (vertebrados e invertebrados) los valores de pH sanguíneo varían décimas de unidades de pH diferentes a 7.4, debido a los grandes cambios que estos organismos exhiben en la temperatura corporal. Así, cuando la temperatura aumenta 1°C, el pH de la sangre y del citosol desciende. Esta dependencia del pH sanguíneo y del citosol a los cambios en la temperatura se observa en a) variaciones de aclimatación en los individuos y b) en especies con diferente adaptación térmica. Por ejemplo, en el músculo de un mamífero, el citosol a 37°C esta cercano a 6.7 - 6.9, mientras que en el músculo de un pez antártico a -1.9°C, es de 7.3-7.5, esto es una diferencia de casi un orden de magnitud (Hochachka y Somero, 1984).

Tal vez la implicación mas importante de esta heterogeneidad tisular en la respuesta a temperatura-pH y la composición del amortiguador, es la velocidad a la cual se efectúa la regulación dependiente del α - imidazol, por lo que no solo varía entre organismos aéreos y acuáticos sino entre los tejidos de un mismo organismo. La pregunta surge entonces alrededor de cual es la propiedad ácido-base crítica que se debe conservar cerca de un valor preestablecido. La información disponible indica que la propiedad bioquímica que esta en el centro de la regulación fisiológica de pH, es la entalpía de disociación del estado de protonación del imidazol.

Las recompensas mayores de las considerables cantidades de trabajo fisiológico que se puede extender para mantener el pH en los fluidos celulares, con valores que permiten una carga de histidinas estables es porque con valores de pH fisiológicos, se afectarán las cargas o los estados de ionización de

las histidinas pero generalmente no los de otros aminoácidos (aa). Como la histidina tiene un pK cercano a 7.0 con temperaturas fisiológicas, estará parcialmente protonado, por lo que las reacciones enzimáticas que requieren de una histidina protonada para la unión a ligandos para facilitar la reacción en una dirección, también se puede llevar a cabo en la reacción opuesta cuando la unión requiere de histidinas imidazol no cargados. La carga neta de histidinas puede influenciar la conformación (en el sitio activo) de una proteína y por lo tanto de su actividad.

La influencia en la expresión de diferentes formas enzimáticas, se puede deber a cambios en el tipo de enzima o debido a variaciones microambientales en la solución que rodea a las enzimas, estas dos estrategias son importantes en la conservación de la K_m . Estos cambios microambientales son de extrema importancia en los tiempos de adaptación térmica. Los organismos aéreos corrigen el pH a cualquier temperatura al alterar las frecuencias de respiración, por lo que al cambiar las concentraciones de CO_2 de la sangre, Reeves sugiere que se dispara un mecanismo pH- sensible que involucra uno o mas grupos imidazol.

La influencia de los grupos imidazol en los cambios en la actividad enzimática ha sido ampliamente estudiada, el ejemplo más claro es el de la lactato deshidrogenasa purificada de músculo (M4-LDH). Este tetrámero participa en la función anaerobia del músculo. La unión del piruvato al sitio activo de la enzima, requiere la coordinación de un residuo de arginina y de un grupo histidil imidazol. El residuo de arginina, siempre tiene una carga positiva a pH fisiológicos, por lo que la unión del piruvato se facilita en la ARG en la posición 117. Una situación diferente se encuentra en el caso de las interacciones de piruvato imidazol. A pH fisiológicos los grupos histidil imidazol se encuentran a la mitad de la protonación, por lo que el α imidazol cercano a 0.5 permite que la reacción sea reversible. Mientras que a valores de pH extremadamente bajos o altos al pK del imidazol, las reacciones enzimáticas serán irreversibles. Teniendo el punto fijo de la protonación de HIS 195 cerca de 0.5, los descensos de pH pueden tener efectos en la capacidad aumentada de unión a piruvato y disminuida para lactato. Durante el ejercicio, el músculo esquelético depende de la glucólisis anaerobia, la caída en el pH durante la actividad muscular activará la función de la piruvato reductasa de LDH al aumentar la unión. Se puede apreciar claramente los beneficios de tener una capacidad de reserva para los intervalos aumentados de una función en respuesta a una señal de modulación, en éste caso el H^+ (Yancey y Somero, 1978).

La relación pH-temperatura, lleva a valores conservados de la K_m en tiempos cortos y evolutivos en la temperatura corporal. En condiciones experimentales de pH constante, la variación en la K_m en homólogos interespecíficos, es de aproximadamente 10 veces, pero con un pH realista (corregido a la temperatura corporal del organismo) se conserva la K_m . Aunque este sistema es muy eficiente, cuando se estudian a diferentes especies ambientadas a diferentes temperaturas y se utiliza la corrección para el pH, se debería encontrar una K_m idéntica entre las especies y, sin embargo, se observan diferencias, esto implica cambios en los aa que aseguren que se mantenga la eficiencia de la enzima al modificar la afinidad (Yancey y Somero, 1978).

Para las enzimas que carecen del sistema α imidazol, la conservación de la K_m se debe obtener enteramente por cambios de los aa. Las modificaciones evolutivas en la estructura primaria de las enzimas para producir valores correctos de K_m pueden tener un importante efecto en la eficiencia catalítica

Como se mencionó anteriormente los grupos imidazol se preservan en un estado aproximado de la mitad de protonación, condición que no se encuentra en otros grupos de otros aa. Por lo que estos grupos están particularmente preparados para funcionar en una gran cantidad de eventos donde se requieran protonación/deprotonación, que son críticos en las interacciones de las enzimas-ligandos, en pasos catalíticos en las reacciones enzimáticas y en las transiciones estructurales en las proteínas.

En el contexto del pH-temperatura lo mas importante del imidazol es el pK encontrado en temperaturas biológicas. El pK del imidazol se encuentra influenciado por los residuos de aa circundantes de la proteína. La mayoría de los grupos de imidazol tienen un pK cercano a 7 a 25°C. Por lo que no sorprende el hecho que los valores de pH que los organismos defienden estén cercanos a los valores de pK de los grupos imidazol de histidinas. Así en los extremos de la escala de pH, ácidos (5.0) como ocurre en las enzimas digestivas, o básicos en las mitocondrias (9.0), los grupos imidazol presentan amplias variaciones en su pK, dependiendo de la polaridad del microambiente (White y Somero, 1982). Esto se aprecia en la siguiente tabla:

TABLA 6 PROPIEDADES DE LOS GRUPOS IMIDAZOL DE HISTIDINAS

	Valores pK
Imidazol	6.95
Histidina-imidazol	6.00
Histidina-imidazol "típico"	6.5
Adyacente a grupos ácidos (-)	7-8
Adyacente a grupos básicos(+)	5-6
Entalpía de Ionización	7 Kcal/mol

3.2 Adaptaciones Bioquímicas al Hábitat

Como se mencionó anteriormente, la regulación térmica por conducta (termorregulación etológica) es por lo general muy importante cuando se presentan fluctuaciones pequeñas de temperatura en el medio, como puede ocurrir en un ciclo diurno. Los cambios de estaciones o las colonización de un hábitat nuevo (variaciones de temperatura a largo plazo) requieren más que la termorregulación

etológica. Estos cambios requieren modificaciones bioquímicas. Entre estas modificaciones se pueden distinguir 3 tipos de adaptación a la temperatura:

3.2.1) Compensación térmica inmediata. Son modificaciones en la actividad enzimática que, dependiendo de la dirección del cambio, se denominan regulación térmica positiva o negativa. En la positiva la constante de afinidad es proporcional a la temperatura, con concentraciones constantes de sustrato y en la negativa, la afinidad (K_m) aparente de la enzima varía inversamente con respecto a la temperatura. Se ha concluido que frente a concentraciones bajas (fisiológicas) de sustrato, el intervalo de reacciones está determinado por las propiedades catalíticas, más que por los parámetros termodinámicos (Hochachka y Somero, 1973). La afinidad está alterada por la unión de metabolitos específicos en sitios alejados del sitio catalítico de la enzima. El cambio inmediato de la K_m resultante del cambio en la temperatura, se da entonces en la conformación de la enzima (Hochachka, 1971).

3.2.2) Aclimatación térmica. Son cambios semipermanentes (estacionales o transitorios) en la regulación fenotípica de la expresión génica y por lo tanto ocurren cambios en las cantidades y tipos de proteínas en las células. La aclimatación térmica se ha comprobado tanto en tejidos aislados como en tejidos completos, por ejemplo, los músculos de ranas de invierno y de verano difieren en sus propiedades contráctiles, lo que se debe a una modificación enzimática en respuesta a la temperatura.

Por otro lado se conoce que en un mismo tejido, existen dos o más variantes de una enzima, cuyas características cinéticas abarcan un amplio intervalo de temperaturas. En esta forma es posible mantener en un amplio intervalo de temperaturas, una función catalítica térmicamente independiente, que no sería posible si solo estuviera presente una sola forma enzimática.

Además, se sabe que las concentraciones de los sustratos para enzimas entre las diferentes especies es notablemente similar, el ajuste de valores de K_m a niveles similares en diferentes especies es también notorio. Juntas estas dos tendencias mantenidas llevan a la conservación de la K_m para el sustrato óptimo, que permite que las reacciones enzimáticas funcionen en una fracción significativa de la $V_{máx}$, mientras se mantenga la capacidad de alterar significativamente sus tasas catalíticas en respuesta a señales moduladoras (Hochachka y Somero, 1984).

Es poco probable que una determinada enzima pueda actuar eficientemente en el intervalo completo de la temperatura corporal de los organismos ectotérmicos. Para explicar esta constancia catalítica inicialmente se propuso la presencia de cambios genéticos. Estos cambios genómicos producen variantes enzimáticas que pueden ser isoenzimas con múltiples loci, o aleloenzimas (variaciones alélicas de un mismo loci), para permitir así la adaptación del organismo a un amplio intervalo de temperaturas (Hochachka y Somero, 1984). Recientemente, se ha propuesto una segunda posibilidad que plantea la operación de mecanismos o cambios no genéticos o epigenéticos. Estos mecanismos, que no excluyen a las modificaciones genéticas, generan formas enzimáticas termo-

inducidas, las cuales presentan una conformación terciaria (en el sitio activo) diferente que les permite actuar en un amplio intervalo térmico (Fields y Somero, 1997).

Una forma de lograr los cambios térmicos compensatorios en los procesos fisiológicos, es alterar la actividad de enzimas específicas al cambiar su concentración. Los mecanismos responsables de estos cambios en la expresión génica pueden operar en diferentes niveles: transcripción, estabilidad o proceso del mRNA, traducción, modificaciones post-traduccionales y estabilidad o transporte de proteínas. Estos cambios en la expresión enzimática pueden ser alcanzados por dos formas generales de compensación: aclimatación fisiológica y adaptación evolutiva.

3.2.3) Adaptación evolutiva. Son cambios génicos sobre muchas generaciones que permitirán la evolución de variantes macromoleculares que están adaptadas a un nuevo régimen térmica.

A diferencia de la aclimatación fisiológica que ocurre en la vida de un individuo y es típicamente reversible, la adaptación evolutiva actúa vía selección de las diferencias genéticas dentro o entre las poblaciones. Numerosos estudios correlacionan el genotipo o las frecuencias alélicas (fenotipos de proteínas que presentan diferentes alelos) con los factores ambientales o ecológicos. En muchos casos estas correlaciones se han interpretado como la forma en la que actúa la selección natural, sin embargo, estas interpretaciones han sido criticadas por basarse en datos correlativos y por no asignarles una tasa de mutación en la deriva génica. Por ésta razón, algunos investigadores han desarrollado un enfoque bioquímico y fisiológico para estudiar el significado evolutivo de la variación génica en un loci en particular. Igualmente, otros estudios han correlacionado los heterocigotos con múltiples locus con mediciones en el desarrollo fisiológico, como un intento para explicar los niveles de la variación génica, sin considerar las diferencias funcionales de las aleloenzimas (Hochachka y Somero, 1969; Garland y Carter, 1994).

El propósito de estudio de este trabajo incluye lo que es la aclimatación térmica y como se mencionó anteriormente se deben producir variantes enzimáticas en este proceso, por lo que a continuación se presenta la clasificación de las formas enzimáticas múltiples (variantes) según la Comisión de Nomenclatura Bioquímica (CBN) y posteriormente la nomenclatura de las variantes enzimáticas correlacionadas con la adaptación a la temperatura.

La Unión Internacional de Bioquímica y un subcomité *ad hoc* (IUPAC-IUB, CBN, 1978), propusieron una serie de recomendaciones para definir a cada una de las formas enzimáticas múltiples que catalizan esencialmente la misma reacción, y que pueden diferir o variar en diferentes maneras que se presentan en la siguiente tabla.

TABLA 7. FORMAS MÚLTIPLES DE ENZIMAS

Grupo	Razón de la multiplicidad	Ejemplo
1	Proteínas genéticamente independientes	Malatodeshidrogenasa en mitocondrias y citoplasma
2	Heteropolímeros (híbridos) de dos o más cadenas de polipéptidos, uniones no covalentes	Formas híbridas de la lactato - deshidrogenasa
3	Variantes alélicas (aleloenzimas)	Glucosa - 6 - fosfatasas en hombre
4	Proteínas o derivadas	
	a.- Proteínas conjugadas con otros grupos	Fosforilasa b, glucogeno sintetasa a
	b.- Proteínas derivadas de una sola cadena de polipéptidos	Familia de quimotripsinas derivadas del quimotripsinógeno
5	Polímeros de una sola subunidad	Glutamato deshidrogenasa de peso molecular 1,000,000 y 250,000
6	Diferentes formas conformacionales	En modificaciones alostéricas de las enzimas

De acuerdo a la definición original que se hizo únicamente con un sentido operacional, a todas estas formas múltiples se les debe llamar isoenzimas o isozimas. Sin embargo, muchos bioquímicos sienten que el término isoenzimas debería estar restringido a aquellas formas de control génico de la estructura primaria de la proteína. Estas diferencias genéticas en la estructura primaria son la razón de la multiplicidad en los grupos 1 a 3, pero no en los grupos 4 a 6. De hecho los investigadores que trabajan con formas conjugadas o enzimas derivadas no utilizan el termino isoenzima para la caracterización de formas múltiples.

Al nombrar a las isoenzimas, el nombre corriente de la enzima (sistemático o común) se debe utilizar seguido de un número. Los números deben ser consecutivos, preferentemente basados en la movilidad electroforética bajo condiciones definidas, con los números más bajos para la máxima movilidad hacia el ánodo. Cuando se dan patrones complejos de las isoenzimas, con grandes grupos, cada uno compuesto por diferentes zonas electroforéticas, los números se pueden usar para designar a los grupos, con letras en subíndices que señalen la subzona individual (1_a , 1_b , 1_c ; 2_a , 2_b , etc).

La generación de múltiples formas enzimáticas genética o epigenéticamente representan simplemente 2 diferentes mecanismos biológicos por los que los organismos se adaptan a la necesidad de una multiplicidad molecular.

3.3 Modificaciones Genéticas. Variantes Enzimáticas.

Las variantes enzimáticas han sido estudiadas ampliamente. En particular George N Somero (1995) y colaboradores, se han basado en las interacciones de temperaturas-proteína relacionadas con el efecto de la temperatura en tasas catalíticas, aclimatación de las actividades enzimáticas para compensar los cambios en temperaturas y las diferencias interespecíficas en la estabilidad térmica de las proteínas (Hazel y Prosser 1974; Hochahcka y Somero 1984). Se han basado particularmente en dos temas: a) variaciones adaptativas en propiedades estructurales y cinéticas entre proteínas homólogas y b) efectos de la temperatura en expresión de proteínas.

Para una mejor explicación de los términos propuestos por Somero y col. Se expondrán primero las relaciones evolutivas de diferentes proteínas.

A las proteínas de diferentes organismos que realizan la misma función se les llama homólogas, frecuentemente muestran similitudes en sus secuencias de aa, cuando estas similitudes son estadísticamente significativas indican la homología de éstas proteínas. De acuerdo con Nolan y Margoliash, la homología se define de la siguiente manera: Homólogo de acuerdo a su uso biológico, implicará que los genes que codifican a las cadenas de polipéptidos consideradas, en todas las especies que contienen a esas proteínas, tuvieron en un tiempo al gen ancestral común y han evolucionado de manera independiente desde su divergencia original (De Haën y Neurath, 1976).

El hecho que los arboles filogenéticos contruidos de datos de secuencias están en total acuerdo con evidencias fisiológicas, paleontológicas y embriológicas justifica el uso del término "homología" como se definió. La similitud estadísticamente significativa de secuencias, es un fuerte argumento para la homología, pero no es una prueba, por lo que se ha sugerido que la mejor evidencia para homología entre dos familias de proteínas, se obtiene a través de la reconstrucción de secuencias ancestrales de dos secuencias de familias contemporáneas. Si dos familias de proteínas son verdaderamente homologas, los ancestros deberán estar más relacionados que los contemporáneos. Si por el contrario, la similitud de las secuencias se debe a restricciones comunes del doblamiento de proteínas, los ancestros no deberán estar relacionados de manera cercana y entonces se trata de evolución convergente o paralela .

Las proteínas **homólogas** que se dan en el mismo organismo se dice que tienen una relación **paróloga**, mientras que aquellas que ocurren en diferentes organismos presentan una relación **ortóloga**. Las relaciones ortólogas deberán ser reservadas a las proteínas cuyo punto de divergencia coincide con las especies correspondientes. Las relaciones entre las proteínas cuyo punto de divergencia no coincide con las especies de origen (esto es, el gen se localiza en un locus diferente), se les llama **metálogos** (De Haën y Neurath, 1976).

En base a lo anterior Somero y col han acuñado tres nuevos nombres para identificar a las variantes enzimáticas relacionadas con la temperatura:

3.3.1) Homólogos ortólogos que son variantes interespecíficas o interpoblacionales de una proteína codificada por un gen común. Estas variantes exhiben diferencias en sus propiedades, tales como constantes cinéticas de Michaelis-Menten (K_m) y de intervalo catalítico (K_{cat}), ambas son dependientes de la temperatura. La estabilidad térmica esta correlacionada positivamente con la adaptación a la temperatura, el balance entre fuerzas desestabilizadoras y estabilizadoras se ajusta de manera precisa y regularmente durante la evolución en diferentes temperaturas, de tal forma que, en temperaturas fisiológicas, las proteínas homólogas en diferentes especies adaptadas retienen estabildades estructurales similares. Estudios recientes utilizando técnicas de ingeniería genética han mostrado que la estabilidad térmica en las proteínas se puede aumentar al introducir cambios extremadamente pequeños o "puntuales" en la secuencia de aminoácidos (Imanaka *et al*, 1986; Matthews, 1987, 1993). Los estudios de secuenciación de homólogos ortólogos que difieren en estabilidad térmica han llegado a la misma conclusión. Por ejemplo, Nishiyama *et al*, 1986 mostró que en la malato dehidrogenasa de una bacteria *Thermus flavus*, un cambio causado por una sola sustitución en aminoácidos resulta en la alteración de la estabilidad térmica y en las constantes de Michaelis - Menten para sustrato y cofactor y en el intervalo de las constantes catalíticas.

El sitio en el que ocurren estas modificaciones en las proteínas homólogas es generalmente distante del sitio de unión o catalítico. Estas modificaciones en la estructura primaria en la proteína determinan cambios conformacionales cerca del sitio de unión que parecen contribuir al gasto energético de la función enzimática. Powers *et al*, 1993, mostraron que las diferencias en la estabilidad térmica de las ateloenzimas para B4-LDH se podría lograr por una sola sustitución de aa en el sitio de contacto (posición 185). Cuando un residuo de serina se reemplaza por una alanina, ocurre una reducción térmica significativa. La carga neta en la estructura fue solo por la adición (serina) o por la delección (alanina) de un solo grupo hidroxilo.

Estudios de ingeniería genética también han mostrado que la estabilidad térmica y las propiedades cinéticas se pueden modificar por cambios menores en la secuencia. Wilkinson *et al*, 1984 redujeron 100 veces la K_m de ATP de la tiosil - tRNA sintetasa, a través de la sustitución de un solo aminoácido. Matthews *et al*, 1987, 1993, han mostrado que el remplazar residuos de glicina con residuos de alanina es un mecanismo especialmente efectivo para aumentar la estabilidad térmica.

Para homólogos ortólogos de especies adaptadas a diferentes temperaturas la respuesta de la K_m vs temperatura difiere en forma que refleja la temperatura corporal absoluta y el intervalo de temperaturas corporales que la especie normalmente enfrenta. En esta forma y como reflejo de la temperatura corporal absoluta, los valores de K_m para la enzima piruvato A4LDH (muscular), varían con las especies. Así, los valores de K_m para enzimas de animales adaptados a temperaturas cálidas son menores en comparación con los de temperaturas frías. En barracudas (géneros *Shyraena*), diferencias de solo 3 - 8 °C, son suficientes para que las enzimas A4LDH exhiban propiedades (K_m , K_{cat} y en la estabilidad térmica) diferentes (Graves y Somero, 1982, Graves *et al*, 1984).

La comparación de los homólogos ortólogos de diferentes taxa muestran que las respuestas térmica de las enzimas se deben a la historia evolutiva de la especie y no a la filogenia por si misma. Como resultado de estas diferencias de compensación del punto (set point) de inicio, los valores de Km temperatura - dependientes de los homólogos ortólogos son similares en diferentes especies adaptadas a su temperatura corporal normal, por ejemplo la A4LDH de un pez (*G. seta*) ambientado a altas temperaturas (del desierto de Baja California), tiene propiedades cinéticas similares a su homólogo en una lagartija del desierto (*Dipsosaurus dorsalis*), cuya temperatura corporal es similar al pez de cuerpos de agua del desierto.

Recientemente, se compararon las secuencias de aa de homólogos ortólogos para la A4-LDH en dos poblaciones de peces (*G. mirabilis* y *C. nicholsi*), encontrándose que existen diferencias en 5 nucleótidos entre las especies, lo que explica la diferencias en la estabilidad térmica. En una misma especie aclimatada en diferentes temperaturas, se observó la misma secuencia de aa, sin embargo, estas enzimas presentan diferentes estabilidades térmicas y constantes cinéticas, y concluyen que estas diferencias se deben a distintas conformaciones terciarias en estas proteínas (Fields y Somero, 1997).

3.3.1.2) Ortólogas alélicas que son las aleloenzimas. Las especies que habitan en un amplio intervalo de temperaturas, por ejemplo a lo largo de gradientes térmicos latitudinales o altitudinales, poseen variantes enzimáticas (aleloenzimas) que exhiben diferencias en sus estabilidades térmicas y en sus propiedades cinéticas. La aparición de estas aleloenzimas se ha comprobado en una gran cantidad de enzimas de teleósteos por ejemplo las estererasas (Koehn, 1969), LDHs (Meritt, 1972), FFK (o fosfoglucoasa isomerasa) (Watt, 1977), MDHs (Hines *et al*, 1983).

Para alcanzar los niveles adecuados en la actividad catalítica a diferentes temperaturas puede incluir ajustes en concentraciones enzimáticas, especialmente durante la aclimatación o en la ambientación. Las enzimas de ectotermos por lo general exhiben actividades aumentadas durante la aclimatación a bajas temperaturas, aunque los patrones difieren entre las enzimas y en las especies (Hazel y Prosser, 1974; Cossins y Bowler, 1987). El sistema, en el que la base del mecanismo para el aumento en los niveles de las enzimas de organismos adaptados al frío se comprende mejor al estudiar el sistema de aleloenzimas de LDH - B en los peces euritérmicos *Fundulus heteroclitus* (Crawford *et al* 1989 a y b). En una población de una misma especie adaptada al frío y al calor, presentan una variante aleloenzimática dominante, que es la adecuada para asegurar una óptima actividad catalítica. El caso más claro ha sido estudiado por Powers *et al* 1986, 1993, en poblaciones separadas latitudinalmente de los peces euritérmicos *Fundulus heteroclitus*. La isoenzima tipo B de LDH del corazón fue examinada en poblaciones de *Fundulus* que habitan en diferentes ambientes de la costa de US de Maine a Florida. Se encontraron dos aleloenzimas de LDH-B la LDH-B^a y LDH-B^b

El gen b es dominante para poblaciones del norte pero es progresivamente reemplazada por el gen a en un gradiente de norte a sur (en esta región de costas un aumento en 1°C en temperaturas

promedio del agua ocurre por cada cambio en grado de latitud). Las características cinéticas de la isoenzima purificada B4-LDH difiere en un patrón que refleja un gradiente de temperaturas en los hábitats de los peces. Usando la proporción K_{cat}/K_m (medida de la tasa catalítica bajo condiciones de sustrato fisiológicas). Place y Powers, (1979) encontraron que la aleloenzima b tiene una tasa superior a 10°C que la aleloenzima a, mientras que ésta última tiene una alta tasa catalítico sobre los 25°. El valor K_{cat}/K_m se mantiene a 20°C para la aleloenzima b "fría" y cerca de 30°C para la aleloenzima a "caliente".

Poblaciones nórdicas (Maine) de estas especies tienen valores significativamente mayores de LDH- B, en comparación con las poblaciones adaptadas al calor (Georgia). Los niveles mayores de LDH - B se correlacionan con los mayores niveles de mRNA para esta proteína. Los niveles mayores de mRNA, a su vez, parecen ser consecuencia de la mayor transcripción del gen *ldh-b* en las poblaciones nórdicas. La mayor transcripción no se observó en todos los genes. Ni la síntesis del mRNA total, ni la síntesis de mensajeros de actina y tubulina difirió entre las poblaciones. Las diferencias estables de LDH- B de las poblaciones del norte y sur de *Fundulus* contribuyen mas a una compensación de la actividad LDH en respuesta a la temperatura de aclimatación, sugieren que los elementos de regulación de transcripción se encuentran modulados por condiciones ambientales y fisiológicas (Crawford y Powers 1992, Segal y Crawford, 1994).

Las comparaciones entre las aleloenzimas necesitaran incluir mediciones de diferentes tipos como son: valores de K_m , K_{cat} , constantes de inhibición, estabildades, tasas de recambio en la célula y, para algunas proteínas, su potencial captación celular, para su caracterización completa (Powers *et al*, 1993). Posteriormente se analizarán la relación la estructura y propiedades cinéticas a el desarrollo fisiológico y la reproducción en los sucesos. Pocos estudios están comenzando este aspecto, por lo que es prematuro el llegar a conclusiones generales a cerca de la importancia a cerca de las variantes aleloenzimáticas en aumentar la euritermicidad de las especies sobre un amplio intervalo térmico.

3.3.2) Homólogos Parálogos. Son dos o más variantes de un tipo dado de enzimas que están codificadas por loci múltiples (isoenzimas parálogas) y que difieren en su temperatura óptima proveen de otro mecanismo para ampliar el intervalo de función a temperaturas.

Se han descubierto muchos ejemplos de este tipo de polimorfismo proteico. En el músculo de diferentes peces globo aclimatados se ha encontrado que la expresión de isoformas de la ATPasa- Ca^{2+} varía de acuerdo a la temperatura de aclimatación (Hwang *et al* 1990). También se mostraron isoformas de la cadena ligera de miosina varían con la aclimatación de temperaturas en otro pez euritémico, la carpa *Cyprinus carpio*. La temperatura de aclimatación en la trucha arcoiris induce la expresión de isoenzimas de acetilcolinesterasas en el cerebro, los efectos en la temperatura en la K_m de acetilcolina difirió entre las dos isoformas en una forma adaptativa (Baldwin y Hochachka, 1970).

La forma citosólica de la malato deshidrogenasa (cMDH) en peces teleósteos se encuentra codificada por dos loci génicos (Schwantes, 1982 a,b). Un homólogo parálogo es más térmicamente

estable que el otro y tiene un set point mas bajo para la Km de NADH (Somero 1995). En el pez globo euritérico *Gillichthys mirabilis*, el intervalo de expresión de las isoformas de cMDH estables o lábiles al calor, varía de forma estacional en peces naturalmente ambientados. El cambio en el intervalo de las isoenzimas afecta a la conservación de la Km de NADH en el amplio intervalo de temperaturas que esta especie experimenta. Las diferencias en el intervalo térmico de expresión de isoenzimas de cMDH también existe en especies diferentemente adaptadas.

Estos ejemplos ilustran que los homólogos parálogos cuya expresión se correlaciona con, y quizás se regula con la temperatura ambiental, puede jugar papeles en la adaptación térmica. Sin embargo para la mayoría de las especies estudiadas formas múltiples de homólogas parálogas con diferentes sensibilidades térmicas no se han detectado. Para muchas isoenzimas parálogas generadas ya sea por una duplicación en cadena (cascada) de los genes o poliploidía (como en especies tetraploides en peces y reptiles), las variaciones adaptativas parecen unidas a los requerimientos funcionales tejido - específicos mas que a una adaptación a las temperaturas (Tyurin *et al* 1979, Somero *et al* 1991).

3.4 Modificaciones No Genéticas o Epigenéticas

Recientemente se ha iniciado un nuevo campo de investigación de variaciones enzimáticas no genéticas, donde se estudian los múltiples factores que pueden alterar el fenotipo proteico encontrado, estos factores son: temperatura, pH, fotoperíodo, dieta y efectos relacionados con el sexo y temporada de reproducción (Poly, 1997).

Con respecto a la temperatura se han estudiado las alteraciones cualitativas y cuantitativas en las enzimas. Dentro de las alteraciones cualitativas, un ejemplo muy claro es el estudio de acetilcolinesterasas (AChE) purificadas de extractos cerebrales de truchas arcoiris aclimatadas a tres temperaturas (2, 12 y 17°C), al realizar ensayos de electroforesis zonal (obteniendo zymogramas), se observaron dos enzimas una "fría" a 2°C y una "caliente" a 17°C, y con 12°C se presentaron dos bandas. Explicaron lo anterior proponiendo que se trataba de isoenzimas con características cinéticas diferentes (Baldwin y Hochachka, 1970), sin embargo, en estudios posteriores se vio que todos los animales solo poseen un gen de esta enzima y que esta puede sufrir modificaciones postraduccionales. En el caso de la aclimatación, los cambios térmicos observados en esta enzima, son debidos a alteraciones en la estructura de los lípidos o a anclas de fosfatidilinositol glucosiladas (Low MG, 1989). Por otro lado, ya que las truchas son tetraploides y expresan muchos loci duplicados, es aceptable la suposición que presentan dos diferentes genes, actualmente se están estudiando los posibles mecanismos (como modificaciones proteolíticas o por ácido siálico) que expliquen la aparición de las variantes frías y calientes. Las variaciones en la Km de variantes frías y calientes de AChE, se debieron a el pH utilizado en el ensayo.

De la misma manera diferencias en la K_m en diferentes enzimas, se ha mostrado que se deben a modificaciones post-traduccionales, concentraciones enzimáticas y a pH y temperatura de ensayo, por lo que únicamente las diferencias en la K_m , no se debe tomar como prueba de la existencia de isoenzimas (Poly, 1997). Sin embargo, las variantes enzimáticas generadas variaciones genéticas, se han demostrado en diferentes estudios, dentro de sus características se encuentran las diferencias cinéticas (Place y Powers, 1979, Crawford, 1992, Powers et al 1993, Somero 1995, Fields y Somero, 1997).

3.5 Lípidos y Temperatura

Anteriormente se mencionó que los lípidos también tienen influencia en la respuesta de un organismo a la temperatura, esta influencia involucra adaptaciones tanto a corto tiempo (inmediatas como pueden ser a lo largo de un día), como las de largo tiempo (aclimatación), por lo que a continuación se revisan algunos aspectos de estos cambios y que influencia tienen en los ectotermos.

Dentro de los cambios inmediatos, se sabe que la temperatura ejerce un influencia modificadora en la conformación de las cadenas de ácidos grasos de los fosfolípidos, por lo que determina: 1) El estado de fase, 2) La proporción del movimiento molecular, y 3) El orden molecular de los lípidos en las membranas (arreglo del empacamiento) (Hazel, 1993).

Para que se puedan dar las interacciones temperatura-proteína en la membrana debe existir un estado semiestable, por lo que los lípidos deben tener la capacidad de corregir la forma o el estado de ensamblaje para que se de la catálisis y la regulación. En un sistema de membranas, muchos lípidos se encuentran en un estado líquido-cristalino que da una extremada fluidez, o en el extremo opuesto el gel-cristalino, que da rigidez a la membrana (Hazel, 1993, 1995).

La fluidez de una membrana se encuentra determinada por variables físicas como la temperatura y la presión hidrostática, y las químicas como son el tipo de los ácidos grasos, los cuales varían en su temperatura de ruptura de acuerdo al largo de la cadena y a los dobles enlaces. Los más cortos son más líquidos y la adición de dobles enlaces disminuye su temperatura en la que se rompen, el kink o retorcimiento de las cadenas de ácidos grasos introducen un doble enlace en la posición cis, que evita que en las cadenas se de una alineación y reducen la energía de estabilización, que se generan por las fuerzas de Van der Waals, dando como resultado que se encuentren con una fluidez relativa. En una fase desordenada líquido-cristalina, conforme la temperatura baja un estado cristalino o fase gel se forma conforme las cadenas se empaquetan fuertemente en una conformación altamente ordenada llamada "todo trans". Un calentamiento por encima del intervalo fisiológicamente normal, algunos lípidos asumen estructuras no bilaterales como fases cúbicas y hexagonales, resultando en una pérdida de la integridad

de la membrana. La fluidez de membrana también se ve afectada por el contenido de colesterol y por el microambiente iónico ofrecido por la solución que lo baña (White y Somero, 1982; Hazel, 1993, 1995).

La conservación de un estado de viscosidad determinado en la membrana es crítico para que se realicen una gran cantidad de funciones basadas en la membrana. Cuando desciende la temperatura, el organismo puede incorporar altas concentraciones de lípidos no saturados, el resultado de aumentar el contenido de dobles enlaces, es, disminuir la temperatura de transición donde la transformación gel-fluido se lleva a cabo. Por ejemplo, en membranas mitocondriales de hígado de carpas aclimatadas a diferentes temperaturas, se observó que la temperatura ambiental se correlaciona de manera inversa a la insaturación de los lípidos. Así, la composición de los lípidos y la fluidez en la membrana varían de manera conjunta, de esta manera, observaron que las temperaturas bajas favorecen la familia n-6 (Ac. linoleico) a costa de la familia n-3 (Ac. linolénico) y que en las mitocondrias aclimatadas al frío había un aumento en la proporción de ácidos grasos mono-insaturados en la fosfatidilcolina y la fosfatidiletanolamina. La proporción molar del colesterol a fosfolípidos en la mitocondria se disminuyó alrededor de 3% con bajas temperaturas. La importancia del cambio de las concentraciones de colesterol es que altera las propiedades de los fosfolípidos en las membranas, como son las permeabilidades y actividades de enzimas ligadas a las membranas. Al disminuir el colesterol con bajas temperaturas aumenta la proporción de los fosfolípidos accesibles al control de la fluidez de la membrana en la insaturación de las cadenas (Wodke, 1978, Teichert y Wodtke, 1992).

La regulación de la viscosidad (homeoviscosidad) de membranas al cambiar la composición de los ácidos grasos de los lípidos polares, involucra varios eventos de regulación de la síntesis de ácidos grasos y la incorporación subsecuente a los lípidos polares. Diferentes especies exhiben mecanismos de regulación variados: 1) Control del número de dobles enlaces en los ácidos grasos, 2) Regulación del tipo de ácidos grasos añadidos durante la síntesis de fosfolípidos y 3) Activación o desactivación de enzimas responsables de la insaturación. Este último está regulado rápidamente para modular el régimen térmico, y es el tipo de regulación que ilustra como el efecto directo en las enzimas puede llevar a cambios importantes de regulación.

Los cambios observados en la composición de fosfoglicéridos de membrana durante la aclimatación térmica, proveen de información tanto de los tiempos requeridos por las especies ectotérmicas para ajustarse al nuevo régimen térmico, como de los papeles clave de los componentes de bajo peso molecular relativo en establecer las propiedades de las enzimas con diferentes pesos moleculares. Es más, los cambios observados en la composición de las membranas lipídicas, se correlacionan significativamente con los cambios de comportamiento y neurofisiológicos en el organismo, por lo que las adaptaciones lipídicas a la temperatura, juegan papeles críticos en la sobrevivencia de los organismos (White y Somero 1982).

Se han estudiado las consecuencias bioquímicas y biofísicas al cambiar el microambiente lipídico donde las proteínas de membrana se localizan. Se sabe que las alteraciones en la saturación de los fosfoglicéridos afectan la cantidad de las funciones enzimáticas, así, el decremento de la saturación provoca actividades enzimáticas específicas mayores. Por ejemplo, se analizó la composición de los ácidos grasos (colina, etanolamina y serina/inositol) de sinaptosomas cerebrales de peces dorados aclimatados a diferentes temperaturas, se observó que el decremento en la saturación (aumento en el contenido de dobles enlaces) genera lípidos más fluidos, que contribuyen a la respuesta de la homeoviscosidad. Además refleja que los mecanismos de adaptación en la homeoviscosidad, son característicos de la adaptación evolutiva y de aclimataciones a corto tiempo (de un laboratorio) utilizando diferentes temperaturas (Cossins and Prosser, 1978). En tiempos cortos el pez dorado sufrió cambios en la conducta, con cambios concomitantes en la composición de los fosfoglicéridos de los sinaptosomas cerebrales. La aclimatación al frío ocurrió más lentamente que la aclimatación al calor, lo que sugiere que la reestructuración lipídica responsable de la homeoviscosidad, esta basada en un mecanismo metabólico activo con una dependencia significativa con la temperatura.

La adaptación de la homeoviscosidad y la aclimatación etológica se realizan en periodos de tiempo mayores a los cambios térmicos experimentados por algunos ectotermos en un día. Los tiempos en los que se sabe ocurren el máximo de cambios en los lípidos y en el comportamiento son: para una temperatura constante de 1 a 2 semanas, para cambios a temperaturas menores ("frías") o mayores ("calientes") son de 3 a 5 semanas (White y Somero, 1982).

3.6 Lípidos y Hormonas Tiroideas

La temperatura no es el único factor por el que los lípidos se ven modificados, sino que el estado tiroideo también los modifica. A continuación se menciona el papel que juegan las HTs en la síntesis y regulación de los lípidos.

Las hormonas tiroideas juegan un papel muy importante en la regulación del número y tipo de lípidos en los vertebrados, así se sabe que en los mamíferos difiere sustancialmente el tipo de lípido generado de acuerdo al estado tiroideo, así como altera el área relativa de las crestas mitocondriales y es uno de los reguladores de la síntesis *de novo* de ácidos grasos y colesterol (en el hipotiroidismo se disminuyen y en el hipertiroidismo se incrementan). Como se mencionó en la sección 1.6, las HTs actúan en los receptores nucleares para expresar enzimas lipogénicas sucesivas y tal vez sus modificadores, resultando cambios en la composición de los lípidos de membrana, por ejemplo, la composición de los lípidos de membranas plasmáticas de hepatocitos purificados (y de eritrocitos) de rata, es muy diferente en las membranas dependientes de HTs (RER, mitocondria y núcleo). El índice de insaturación de los fosfolípidos de la membrana plasmática del hepatocito es de 70 a 130, en comparación con 190 de las

membranas de los organelos y 215 en el sarcolema de corazón, por lo que es posible que las diferentes membranas, respondan de distinta manera a la estimulación de las HTs. El estado tiroideo o los lípidos de la dieta, afectan en general, las propiedades físicas de la membrana plasmática y las actividades de las enzimas y transportadores, consistentemente con la mediación que se da a través de los cambios lípidos, que a su vez, modifican el mecanismo de varios de receptores (Hoch FL, 1988).

En ratas tirotóxicas, las membranas plasmáticas del hígado se encuentran anormalmente rígidas y ordenadas y pierden su reactividad a la insulina o al glucágon añadido. Las membranas plasmáticas de ratas hipotiroideas son normalmente ordenadas pero con la adición de T₃ *in vivo*, aumenta su rigidez. En ratas hipertiroideas se observa una disminución de la insaturación de los ácidos grasos. En ratas eutiroideas tratadas con HTs provocan aumento en la insaturación en las membranas de los organelos (Hoch FL, 1988).

IV PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El estudio de la fisiología tiroidea en reptiles, se encuentra sumamente restringido. Se han cuantificado las concentraciones circulantes de las hormonas con actividad biológica, y hasta donde sabemos no se han cuantificado los de rT3. Las concentraciones reportadas de T3 y T4 varían considerablemente, lo cual en gran parte obedece a la técnica utilizada (RIAs homólogos o heterólogos, con estuches comerciales o desarrollados en un laboratorio), así como al organismo estudiado. Se sabe que, en general, las concentraciones de T3 en reptiles de Squamata dependen de la estación, siendo significativamente más altas en primavera y verano (Kar y Chandola-Saklain 1985a, John-Alder 1984a). En la TABLA 8 se presentan los valores reportados para ambas hormonas en la misma especie.

TABLA 8 NIVELES CIRCULANTES DE HTS EN LAGARTIJAS

Especie	T4 (ng/ml)	T3 (ng/ml)	Cita
<i>Sceloporus undulatus</i>	9.9 ± 2.0	2.4 a 13	John-Alder, 1991
<i>Calotes versicolor</i>	0.25 - 5	0 - 1.76	Kar y Chandola-Saklain, 1985a
<i>Dipsosaurus dorsalis</i>	10.11 ± 1.04	3.55 ± 0.48	John-Alder, 1984a
<i>Sceloporus occidentalis</i>	3.285-20 ± 0.72	0.8 - 1.0	John Alder, 1990

ACTIVIDAD DESYODATIVA EN REPTILES

Los estudios de la desyodación en reptiles son sumamente escasos. Los primeros análisis para tratar de identificar la actividad desyodativa se realizaron en hígado y riñón de tres reptiles: Tortugas, *Gecko* y Serpientes. En estos estudios se cuantificó la liberación de ¹²⁵I utilizando como sustrato ¹²⁵I-MIT (Chiu y Wong, 1975, 1984). En serpientes no encontraron actividad, en el lacértido (*Gecko*) encontraron la misma actividad en hígado y riñón y esta fue 4 veces mayor que la encontrada en el hígado de tortugas. Posteriormente, este mismo grupo reportó la presencia de compuestos yodados cuantificando en hígado y riñón los residuos MIT, en 13 especies de vertebrados, incluyendo 2 teleósteos, 2 anfibios, 8 reptiles (tortugas, lagartijas y serpientes) y 1 ave (Chiu y Wong, 1977).

Solo hay un reporte de la conversión y degradación de T4 *in vivo*, en el cual aunque no cuantifican la actividad desyodativa, demuestran claramente la desyodación periférica al cuantificar los niveles de hormonas (Kar y Chandola-Saklain, 1985b). Posteriormente, en una comunicación corta en un congreso, se reportó por primera vez, la presencia de actividad 5'D total en el hígado de *Sceloporus*

occidentalis. En éste resumen mencionan que la actividad hepática es igual a la de la codorniz (Joos y John Alder, 1989). Más adelante, en otro congreso (Darras *et al*, 1994) se reportan las actividades ORD e IRD en diferentes clases de vertebrados. En este trabajo se menciona que el reptil *Agama* presenta "una actividad rT3-ORD sumamente alta".

Solo conocemos un reporte en el que se realizó la caracterización cinética parcial de la actividad 5'D de hígado, riñón y páncreas de una serpiente *Elaphe taenuria*. Este estudio reporta que presenta características similares a la desyodasa tipo I de mamíferos y que la actividad enzimática varía con el estado tiroideo, ya sea hipo o hipertiroideo (Wong CC *et al* 1993).

V HIPOTESIS

Dado que los ectotermos presentan formas/variantes enzimáticas que les permiten adaptarse a diferentes temperaturas, en la presente tesis proponemos que las desyodasas en los reptiles presentan formas termo-dependientes.

VI OBJETIVOS

Por todo lo anterior, así como por los hallazgos en trabajos anteriores (Fenton *et al* 1997), la presente tesis se diseñó para alcanzar los siguientes objetivos:

- 1) Caracterizar y cuantificar la actividad de la desyodasa DI en hígado de una lagartija endémica (*Sceloporus grammicus*).
- 2) Determinar la termodependencia *in vitro* e *in vivo*. En el primer caso (*in vitro*) se realizarán las incubaciones del ensayo con diferentes temperaturas, que equivalen al intervalo de temperaturas que soporta esta especie. En el segundo caso (*in vivo*) se comprobará la termodependencia bajo diferentes condiciones de aclimatación, sometiendo a los animales a un régimen térmico por 2-3 semanas, sacrificándolos y analizando la actividad enzimática.

VII MATERIAL Y METODOS

Material Biológico

Se utilizaron lagartijas endémicas (machos y hembras adultas) *Sceloporus grammicus microlepidotus* de una localidad situada en Zoquiapan, Río Frío, Estado de México. El clima de esta zona es semi-frío y corresponde al tipo (Cb'(w2) (w)) según la clasificación de Koppen modificada por García (1988). De acuerdo al Servicio Meteorológico Nacional (1997), la temperatura anual presenta los siguientes valores promedio ($n=25 \pm ES$): Temperatura mínima 1.35 ± 0.07 , temperatura media 9.78 ± 0.03 , temperatura máxima: 18.23 ± 0.06 °C. En el curso de 1.5 años, se realizaron 5 colectas: 2 durante el verano, 2 en el otoño y 1 en el invierno. La talla (cm) y peso (g) promedio de los animales adultos fue la siguiente: **Machos** ($n=30$), longitud cuerpo: 4.9 ± 0.56 ; cola: 8.44 ± 2.4 ; peso: 4.29 ± 1.21 . **Hembras** ($n=60$): cuerpo: 4.6 ± 0.51 ; cola: 6.1 ± 3.14 ; peso: 3.3 ± 0.93 . En las colectas, se reconocieron a los animales adultos por el tamaño y por los caracteres sexuales secundarios (Cuellar O, Méndez de la Cruz F, en prensa).

Los animales se mantuvieron en el laboratorio con una temperatura promedio en invierno de 18 - 29 °C y en verano 29 - 34 °C. La dieta fue de ctenébrios o larvas de una palomilla suplementadas con vitaminas (TETRA Terra fauna Reptical). Antes del sacrificio, los animales se colocaron en el refrigerador por 5 min (anestesia por frío), y posteriormente se decapitaron. A todos se les extrajeron los siguientes órganos: hígado, piel, cerebro, y en el caso de las hembras preñadas también placentas y fetos. Todos los tejidos se guardaron a -70°C hasta su análisis posterior.

Hormonas y Reactivos

Las tironinas no marcadas: T₄, T₃ y rT₃ (grado analítico), se obtuvieron de Henning Chemie & Pharmwerk (Berlín). Las hormonas marcadas con ¹²⁵I se adquirieron de New England Nuclear (Boston MA). La actividad específica de éstas últimas fue: T₄: 400 µCi/µg, T₃: 1500 µCi/µg y rT₃: 1220 µCi/µg.

Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico.

Procedimientos Analíticos

Actividad Desyodativa

Para cuantificar las actividades enzimáticas se utilizaron las siguientes técnicas:

1. **Liberación de Radioyodo** (Leonard y Rosenberg, 1980).- Se hace una incubación del sobrenadante del tejido (homogeneizado utilizando politrón). La mezcla de reacción (volumen total 100µl) contiene al homogeneizado diluido, de manera que se tiene la concentración óptima de proteína. La incubación se lleva a cabo con aproximadamente 100,000 cpm de ¹²⁵rT₃ purificada y una concentración variable de rT₃ fría (para alcanzar el rango µmolar en el que

trabaja la enzima), y cofactor (DTT). Se incuba por 1 h, y la reacción se detiene añadiendo 50 μ l de una solución denominada "stopper" (contiene 50% de BSA y 10 mmol/L de PTU), inmediatamente se le añade 350 μ l de TCA. Posteriormente se centrifuga (3000 rpm X 10 min), y el sobrenadante se decanta en una columna de Dowex 50X2 equilibrada con ácido acético (10%). El producto de la desyodación (125 I-) se eluye con 2 ml de ácido acético (10%) y se cuantifica utilizando un espectrómetro de rayos gamma. Los resultados se expresan como pmol de I⁻ liberado/ mg proteína/h. La concentración de proteínas se cuantificó utilizando el método de Bradford (1976).

- 2. Cromatografías descendentes en papel** (Bellabarba, 1968). Se hace una incubación con el sobrenadante del tejido a analizar, de la siguiente mezcla: Hormona marcada (T₃* o T₄*) purificada, hormona fría y cofactor DTT (mmol/L). Se incuba por 3 h y se detiene la reacción utilizando 200 μ l de etanol. Los productos de la reacción se identificaron mediante la cromatografía, con un sistema de corrido de: Alcohol ter amílico: amoniaco 2N: Hexano 5:6:1. Se toman 100 μ l del sobrenadante de la incubación + 50 μ l de la siguiente mezcla del estándares - acarreadores (K₁, 100mg/25 ml; T₄, 50 mg/25 ml; T₃, 50 mg/25 ml; rT₃, 25 mg/25 ml; T₂ (3,5 y 3,3') 25 mg/ml). Se aplica a tiras de papel Whatman # 3 (#MM) y se dejan correr entre 15 y 22 h. Las tiras se revelan utilizando 1% de cloruro de paladio (PdCl₂) - para el yoduro- y 2% de aminotipirina en 2% de carbonato de sodio y luego con 2% de ferricianuro de potasio (K₃Fe(CN)₆) -para las yodotironinas-. Posteriormente se cortan, se cuentan y se calcula la actividad enzimática que se expresa como porcentajes, y la actividad específica como ng (hormona generada)/ mg proteína/h o pmol (hormona generada)/ mg prot/h.

Ambas técnicas fueron estandarizadas previamente en el laboratorio (Valverde-R *et al*, 1993, Fenton *et al*, 1997), la utilización de homogeneizados, así como la identificación y caracterización de las enzimas corresponden a los parámetros reportados en la literatura (Leonard y Visser, 1986).

Caracterización de Parámetros Operacionales de la Actividad 5'DI

Se analizaron los siguientes parámetros: Concentración de Proteínas (0.01-0.6 mg/ml); Tiempo de Incubación (0.5, 1, 2 y 3h); pH (5.0 a 9.0 utilizando un intervalo de 0.5); Concentraciones de Cofactor (DTT) (0.3, 0.6, 1.5, 2.5, 5, 7.5, 10 y 15 mmol/L); Temperatura (0, 4, 15, 20, 29, 37, 42 y 50°C); Sensibilidad a Inhibidores PTU (0.5, 1, 2 y 5 mmol/L) y GTG (1, 10, 50, 100, 500 y 1000 nmol/L). Homogenados de hígado de ratas macho (Wistar 300g) se valoraron en paralelo (como control).

Actividad 5'DI- Caracterización Cinética

Concentración de sustrato (rT₃) para las constantes aparentes (0.02 - 16 $\mu\text{mol/L}$) y para las constantes verdaderas (0.005 - 2 $\mu\text{mol/L}$).

Experimentos de Aclimatación

Estos ensayos se realizaron en la UAM Iztapalapa en el laboratorio del Dr. Carlos Romero R. Se colocaron grupos de 10 animales (6 machos y 4 hembras preñadas) correspondientes a la colecta de otoño del '96, en cajas con el sustrato de su hábitat (troncos y tierra). En las cajas, se colocaron termómetros que registran el intervalo mínimo y máximo de temperaturas y humedad. Así, los animales se aclimataron a dos diferentes condiciones ambientales: Frío de 15 - 19 °C y Calor de 32-37°C. Todos los animales se alimentaron con larvas de sophobas cada 3 días, periodo en el cual se expusieron al sol por 30-45 min. El periodo de aclimatación abarcó en todos los casos un total de 26 días y al término de éste tiempo se sacrificaron y colectaron los siguientes órganos: Hígado, piel, cerebro, gónadas, placentas y fetos así como sangre (de cada grupo, por sexos).

Análisis Estadístico

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de dos factores para cada uno de los parámetros analizados. Con éste análisis se obtuvieron media, D.S. E.S y la fuente de varianza para los dos factores a estudiar, también se obtuvieron las medias para el cuadrado para el error y los grados de libertad. A continuación se realizaron comparaciones múltiples utilizando pruebas de Tukey y Duncan al 5 y 1% entre los animales utilizados, esto es, entre los sexos de las lagartijas y comparaciones entre lagartijas y rata. Además, se realizaron comparaciones entre cada punto el parámetro analizado para cada una de las especies, esto es, machos, hembras y hembras preñadas. En las tablas se utilizaron análisis de Bonferroni, las diferencias de $p < 0.05$ se consideraron significativas.

Los resultados de cada parámetro analizado representa la media de 4 a 6 de ensayos independientes realizados por duplicado. En cada parámetro se utilizaron tejidos provenientes de las diferentes colectas realizadas a lo largo de 1.5 años. En cada colecta (grupo) el número de animales fue de 6. Lo anterior se realizó para tener un mayor número de grados de libertad, así los resultados son representativos para la población de la especie analizada.

VIII RESULTADOS

A continuación se presentan los resultados de la caracterización de los parámetros que se establecieron para cuantificar la actividad desyodativa en hígado de lagartijas *Sceloporus* (machos, hembras y hembras preñadas), y en ratas macho (Wistar), que se utilizaron como controles.

Vía ORD en hígado de Lagartija

Actividad 5'D-II hepática

En la vía de activación como se menciona en la sección 1.5.1, participan dos enzimas la 5'DI y 5'DII, con excepción del hígado de teleósteos, el resto de los vertebrados carecen de actividad tipo DII, por lo que se desarrollaron ésta serie de ensayos con el objeto de evaluar si el hígado de las lagartijas presenta la actividad tipo II.

Se evaluó la actividad de esta enzima en hígados de lagartijas y como control positivo a corteza cerebral de embrión de pollo (18 días) y corteza cerebral de rata. Se cuantificó la actividad utilizando radioyodo liberado (**FIGURA 6**) y con cromatografías descendentes en papel (no se muestran los resultados). Los resultados mostraron que el hígado de machos, hembras, hembras preñadas y ratas no presentan actividad 5'D-II, con ninguna de las técnicas utilizadas. Los resultados de los controles positivos son semejantes a los previamente reportados en la literatura (Kaplan y Shaw, 1984; Valverde-R *et al*, 1993).

Actividad 5'DI hepática. Caracterización de Parámetros Operacionales

Efecto de la Concentración de Proteínas

Para una misma concentración de proteína, la actividad 5'DI hepática difiere entre lagartijas y ratas, siendo significativamente $p < 0.01$ mayor en las lagartijas (**FIGURA 7**). A partir de 250 μg , no existen diferencias significativas intraespecie, porque el sistema esta saturado. En base a estos resultados se decidió utilizar, en ambas especies, una concentración de 15 a 20 μg /tubo de proteína en los ensayos subsecuentes.

Concentración de Sustrato

Se utilizaron diferentes concentraciones de sustrato (rT3: 0.02 - 16 $\mu\text{mol/L}$). En la **TABLA 9** se resumen las constantes aparentes de Michaelis-Menten para sustrato de machos, hembras, hembras preñadas y ratas. Estas constantes se obtuvieron a partir de los interceptos resultantes de las gráficas tipo Lineweaver-Burk que se muestran en la **FIGURA 8** (panel inferior). En el caso de las lagartijas, los resultados muestran que existe un claro dimorfismo, siendo los machos los que presentan la mayor actividad específica.

TABLA 9. CONSTANTES CINÉTICAS APARENTES DE MICHAELIS-MENTEN PARA rT3 EN HOMOGENADOS HEPÁTICOS DE LAGARTIJAS Y RATA.

Especie	Km	Vmax	Eficiencia Catalítica
	$\mu\text{mol/L}$	pmol/mg proteína/min	Vmax/Km
S. grammicus Machos	0.57 \pm 0.20 a	58.9 \pm 20.1 a	103 a
S. grammicus Hembras	0.63 \pm 0.18 a	27.4 \pm 7.7 b	43 b
S. grammicus Hembras preñadas	0.83 \pm 0.30 a	35.4 \pm 7.5 b	42 b
Rata	0.17 \pm 0.04 b	11.9 \pm 1.5 c	70.83 c

Los resultados representan la media \pm D.E. (n=6). **Condiciones del ensayo** Proteína: 10 - 20 μg ; sustrato (rT3): 0.02 a 16 $\mu\text{mol/L}$; *rT3: 200 fmol; DTT 5 mmol/L, 1h a 20°C para lagartijas y 37°C para ratas. Las letras indican las diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los sexos y entre los vertebrados utilizados.

Concentraciones de cofactor

En los dos tipos de vertebrados utilizados, se observa un típico patrón cinético de saturación hiperbólico (Leonard y Visser, 1986). Utilizando concentraciones de cofactor entre 1.25 a 2.5 mmol/L la actividad enzimática aumentó significativamente ($p < 0.01$) en ambas especies. Sin embargo, como se puede apreciar en la **FIGURA 9**, a partir de 2.5 hasta 10 mmol/L no se observó diferencia. Por otra parte, a partir de 2.5 mmol/L, existe una diferencia significativa $p < 0.01$ entre lagartijas y ratas, y además entre machos y hembras. La concentración que se decidió utilizar fue de 5mmol/L, ya que con esta se encuentra saturado el sistema y se pueden realizar comparaciones con los datos publicados en la literatura.

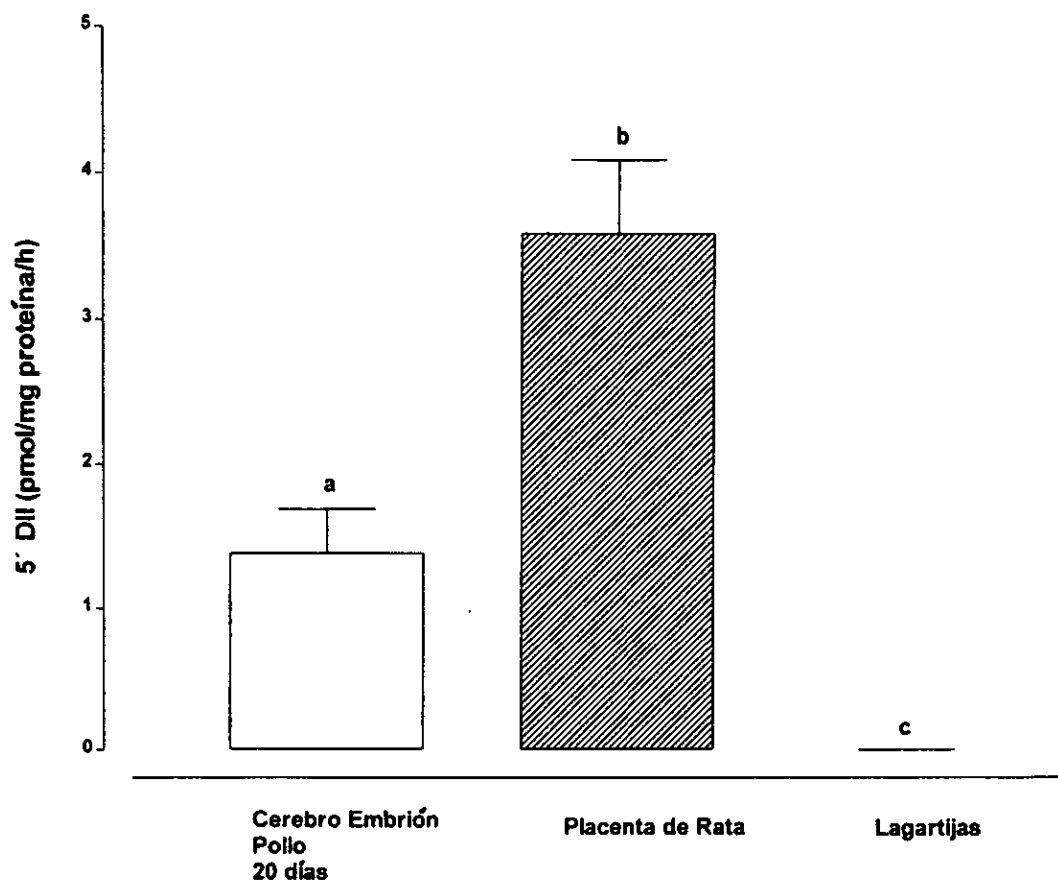


FIGURA 6. ACTIVIDAD TIPO 5'DII EN HOMOGENADOS HEPÁTICOS. Los resultados representan la media \pm D.E. de cuatro ensayos independientes realizados por duplicado. Las condiciones de ensayo fueron: 125 I-T₄: 200 fmol, T₄: 50 nmol/L, DTT 20 mol/L, pH 7.0, 3h a 20°C para lagartijas o 37°C para placenta de rata y cerebro de embrión de pollo de 20 días, PTU: 1mmol/L, utilizando de 15 a 20 μ g de proteína. Las diferentes letras sobrepuestas indican las diferencias significativas ($p < 0.01$) entre los tejidos.

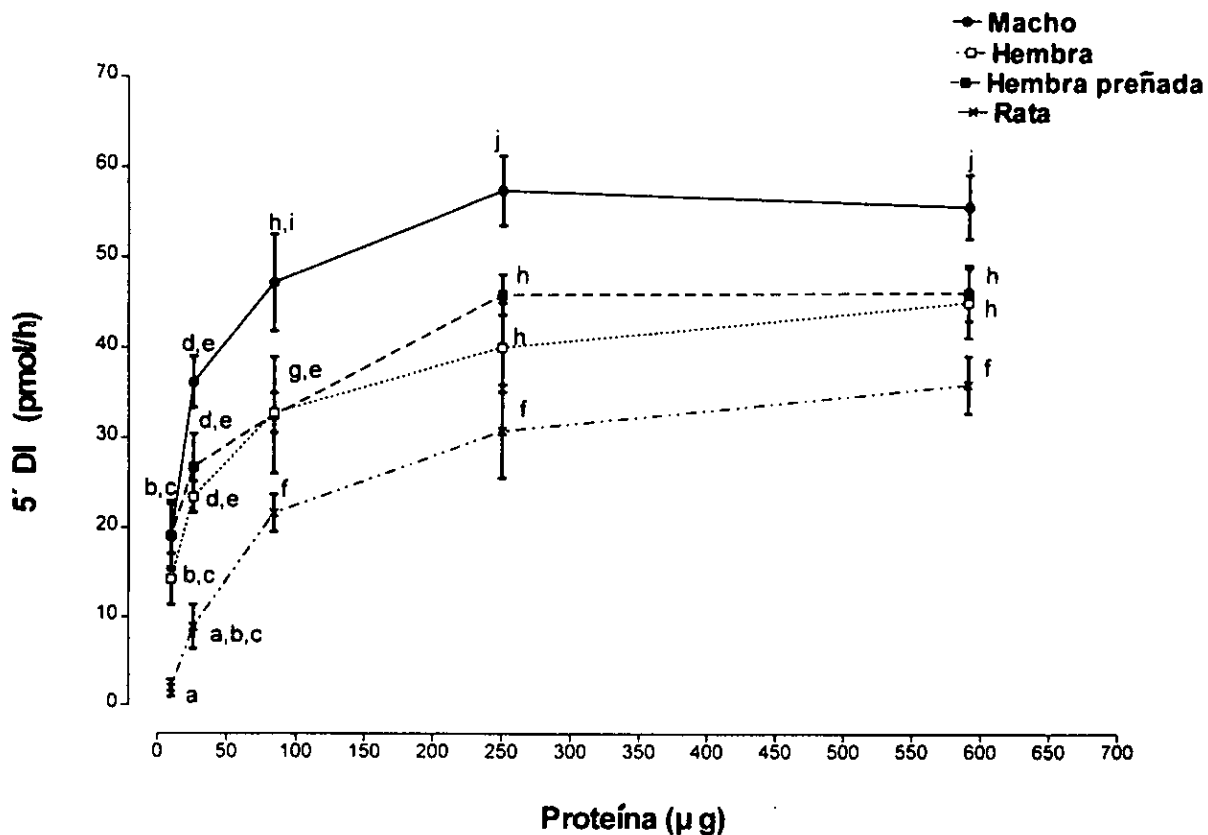


FIGURA 7. EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA EN LA ACTIVIDAD 5'DI HEPÁTICA. Los resultados representan la media \pm D.E. de seis ensayos realizados por separado, utilizando 4 diferentes mezclas de homogenados de animales adultos ($n=6$, cada colecta), colectados a lo largo de 1.5 años. Las condiciones de ensayo para las lagartijas y las ratas fueron: $^{125}\text{I-rT}_3$: 200 fmol, rT3 0.5 $\mu\text{mol/L}$, DTT: 5mmol/L, pH 7.0, 1h a 20°C (lagartijas) o 37°C (ratas). Las diferentes letras sobrepuestas indican las diferencias significativas ($p<0.01$) entre los vertebrados y entre las diferentes concentraciones de proteína utilizadas.

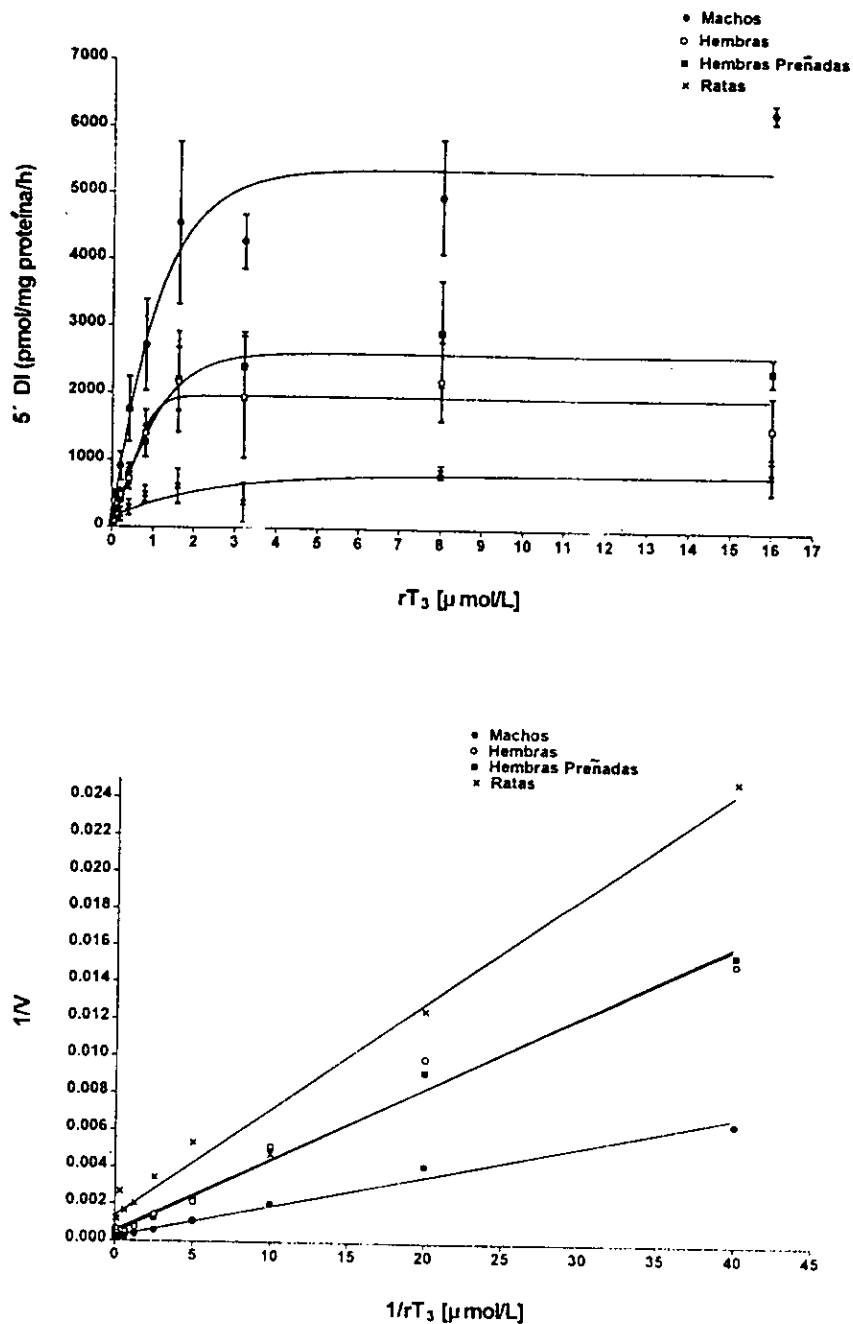


FIGURA 8. CONSTANTES APARENTES DE MICHAELIS-MENTEN EN LA ACTIVIDAD 5'DI DE HOMOGENADOS HEPÁTICOS. Las gráficas muestran (panel superior) la actividad enzimática y (panel inferior) a las dobles recíprocas en función de concentraciones de rT₃ en un intervalo de 0.02 a 16 μmol/L. Cada punto corresponde al promedio ± D.E. de seis ensayos independientes por duplicado. Las condiciones de ensayo fueron las descritas en la FIGURA 7 utilizando de 15 a 20 μg de proteína.

Sensibilidad a Inhibidores

Se usaron dos fármacos que se sabe inhiben preferentemente a la DI, el propiltiouracilo (PTU) **FIGURA 10A** y la tioglucosa aurica (GTG) **FIGURA 10B**. La sensibilidad al PTU fue diferente entre una y otra especie, así como entre machos y hembras en el caso de las lagartijas. La concentración de 0.5 mmol/L inhibió totalmente (98-99%) la actividad enzimática en la rata, mientras que para lagartijas se requiere el doble para observar el mismo efecto. Estas diferencias no se observan con la GTG. Con lo anterior se comprueba que se trata de la desyodasa tipo I.

Tiempo de Incubación

La mayor actividad enzimática en machos y hembras se observó al cabo de 1 h de incubación y a partir de este tiempo la actividad ya no se modificó (**FIGURA 11**). Igualmente, a todos los tiempos analizados se continuo observando la diferencia dimórfica significativa $p < 0.01$ en lagartijas, siendo la actividad de los machos dos veces mayor que en las hembras. Como en el caso del cofactor, se decidió utilizar 1 h para poder realizar comparaciones con los datos en la literatura.

Efecto de la Temperatura.

Mientras que en la rata la actividad enzimática es insignificante en el intervalo de 0 a 4°C, en las lagartijas la actividad específica de la enzima oscila entre 800 a 1500 pmol/mg proteína/h. Además, en el caso de las lagartijas, se observó que a partir de 15°C hasta 42°C, la actividad enzimática se mantiene constante y no hay diferencias entre los sexos (**FIGURA 12**). Por el contrario en la rata, la actividad de la enzima aumentó conforme a la temperatura de incubación para alcanzar un máximo (800 pmol/g proteína/h) entre los 37-42°C. Con estos resultados se decidió utilizar 20 °C para las lagartijas, ya que es el punto donde se estabiliza la meseta y 37°C para las ratas dado que es la temperatura en la que típicamente se ha evaluado en la literatura.

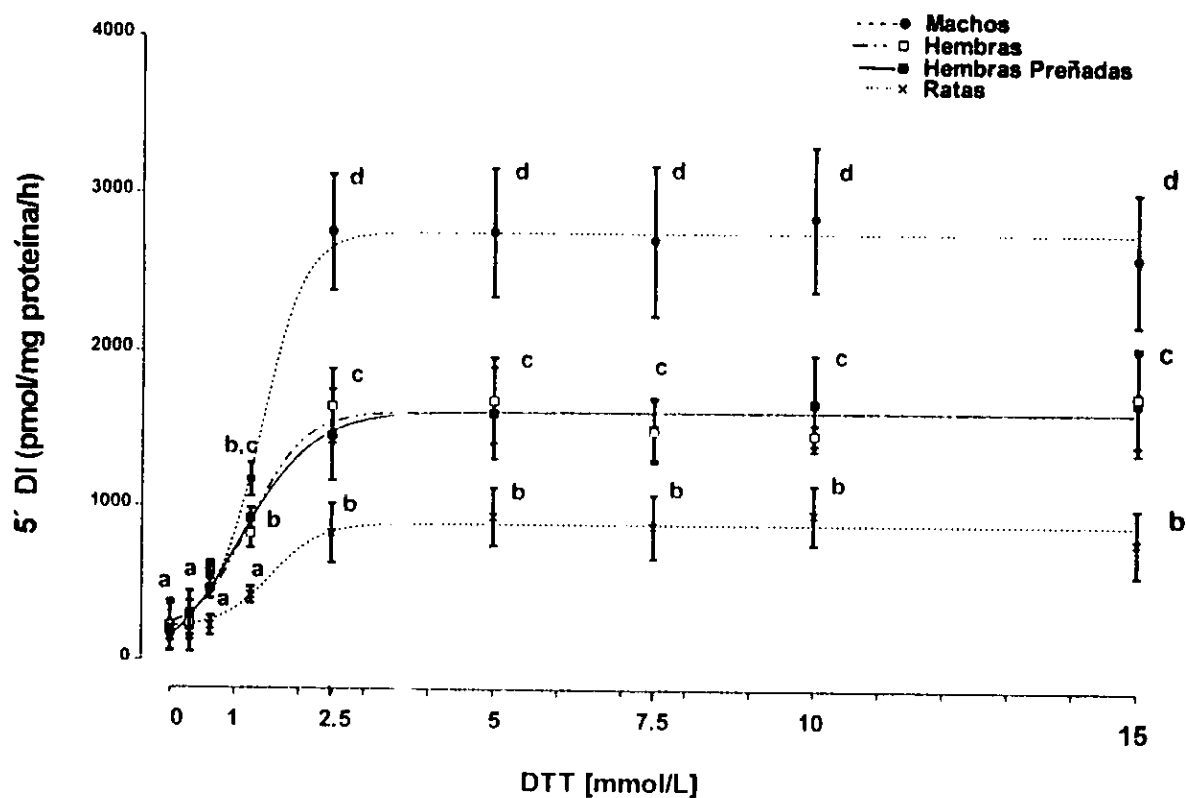


FIGURA 9. EFECTO EN LAS CONCENTRACIONES DE COFACTOR (DTT). Las condiciones del ensayo, así como el manejo de los datos fueron iguales a los descritos en la **FIGURA 7**. Utilizando de 15 a 20 μ g de proteína. Cada punto representa la media \pm D.E. de seis ensayos independientes realizados por duplicado.

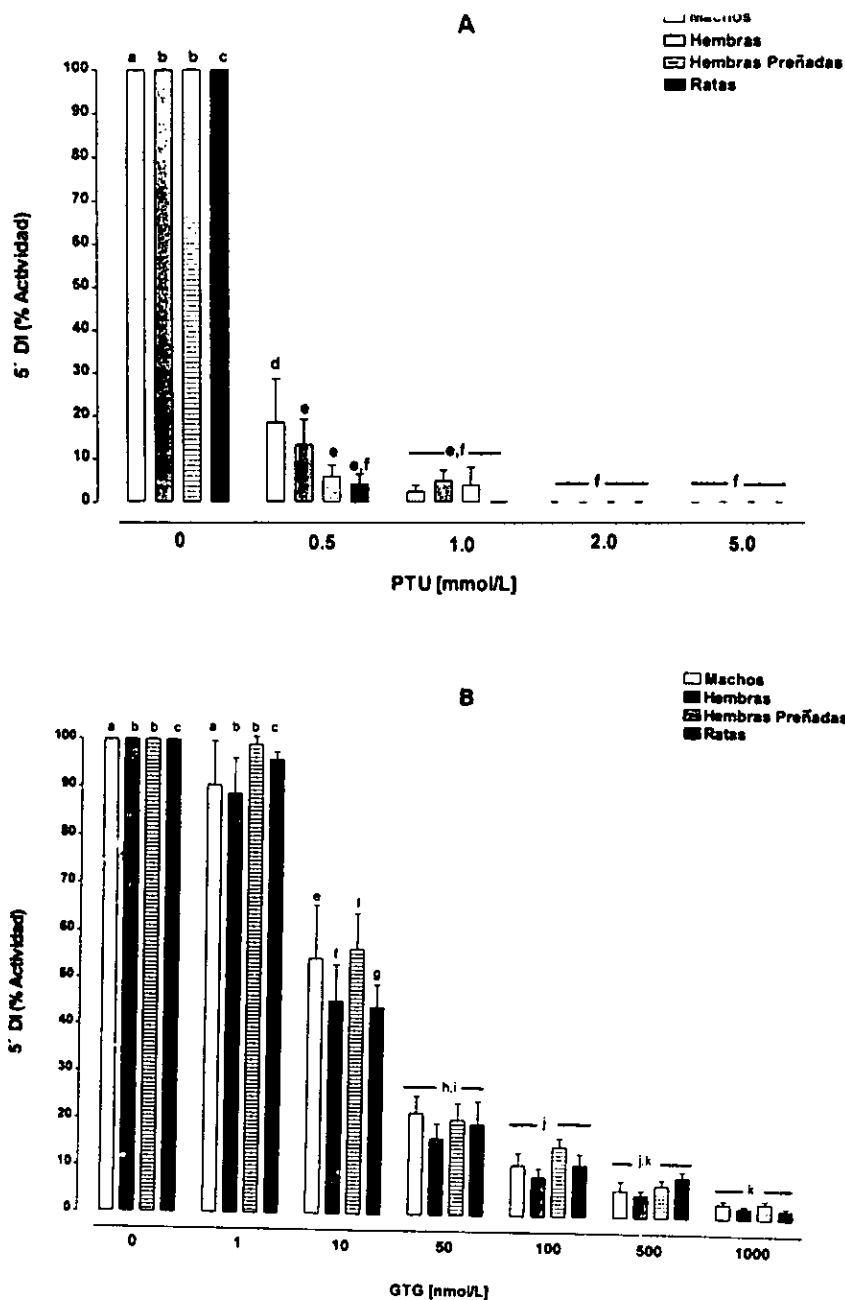


FIGURA 10. SENSIBILIDAD DE LA ACTIVIDAD 5' DI A LOS EFECTOS DE LOS INHIBIDORES (A) PTU Y (B) GTG. Los ensayos se realizaron en la presencia o en la ausencia de las diferentes concentraciones de inhibidores mostradas. Los valores de 100% representan el resultado de los controles ensayados en ausencia de los inhibidores. Los resultados muestran el promedio \pm D.E. de seis ensayos independientes realizados por duplicado. Las condiciones de ensayo fueron las descritas en la FIGURA 7 utilizando entre 15 a 20 μ g de proteína. Las diferentes letras superpuestas indican las diferencias significativas ($p < 0.01$) entre los vertebrados y las diferentes concentraciones de inhibidores utilizadas.

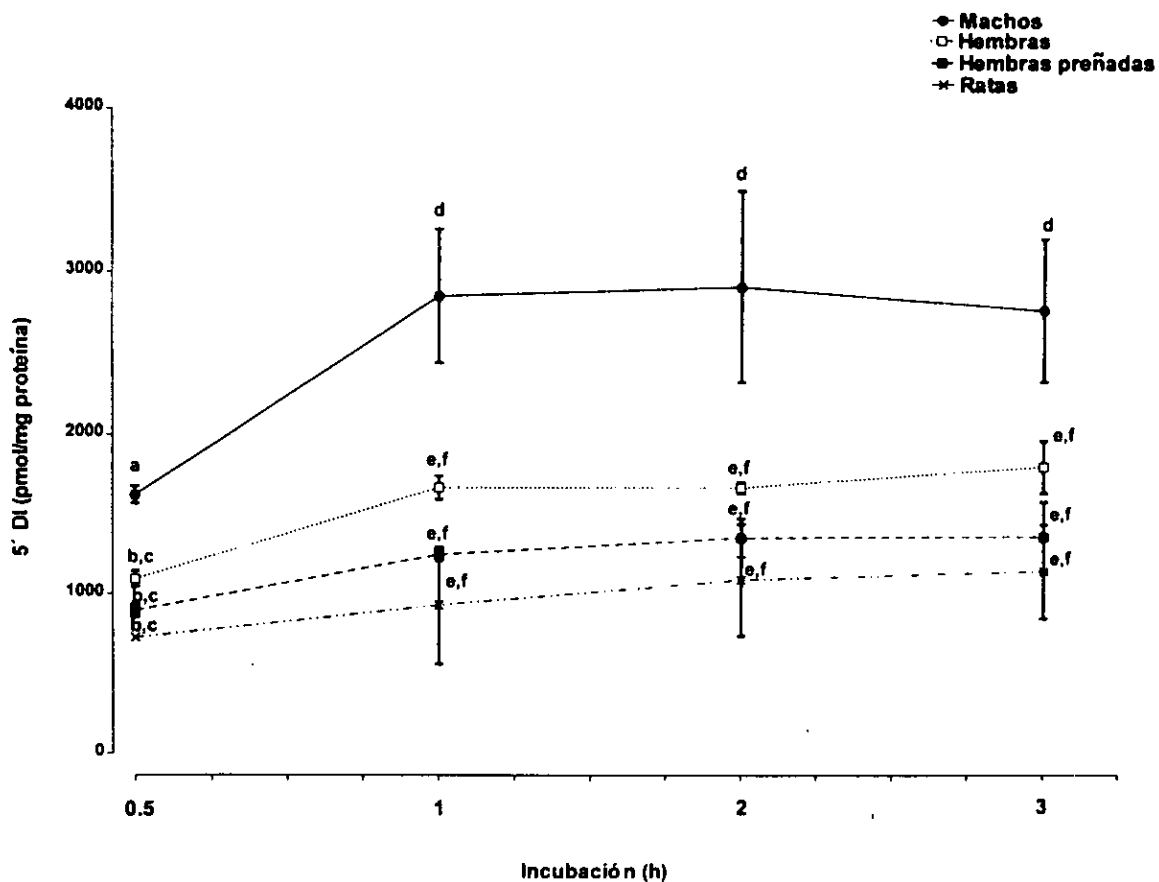


FIGURA 11. TIEMPOS DE INCUBACIÓN. Los resultados muestran el promedio \pm D.E. de cuatro ensayos independientes realizados por duplicado. Las condiciones del ensayo, así como el manejo de los datos fueron iguales a los descritos en la FIGURA 7. Utilizando de 15 a 20 μ g de proteína.

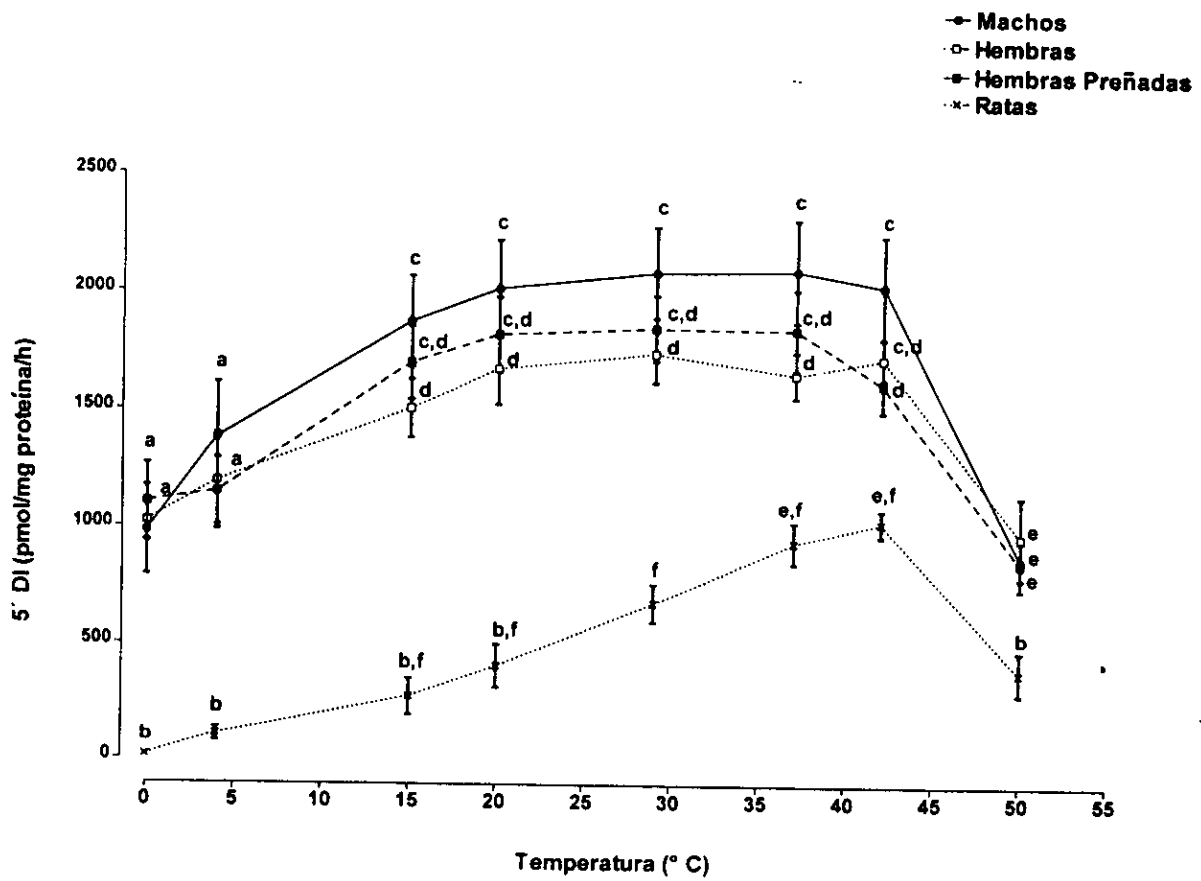


FIGURA 12. EFECTO DE LA TEMPERATURA. Los resultados muestran el promedio \pm D.E. de seis ensayos independientes realizados por duplicado. Las condiciones del ensayo, así como el manejo de los datos fueron iguales a los descritos en la FIGURA 7. Utilizando de 15 a 20 μ g de proteína.

Efecto del pH

Este parámetro se analizó en el intervalo de valores que va de 5.0 - 9.0 con incrementos de 0.5. Los resultados, que se ilustran en la **FIGURA 13**, muestran que en las dos especies la actividad 5'DI hepática se expresó en el intervalo de pH utilizado, y que las actividades de las lagartijas fueron, en todos los casos, significativamente diferentes ($p < 0.01$) a las actividades de la rata. En las lagartijas la actividad se mantuvo prácticamente constante a lo largo de todo el intervalo analizado, presentando los machos un pequeño aumento ($p > 0.01$) en el intervalo de pH de 6.5 a 7.5. En las ratas, la máxima actividad enzimática se observó en un intervalo de pH más pequeño (6.5 a 7.5) y fue significativamente menor ($p < 0.01$) en los extremos de pH analizados. En base a los resultados de temperatura y pH, en los ensayos subsecuentes se decidió utilizar un pH de 7.0 y 20°C para las lagartijas.

Constantes Cinéticas Verdaderas de Michaelis-Menten de 5'DI Hepáticas.

Además de mostrar que en el hígado de lagartijas la vía ORD esta catalizada exclusivamente por una enzima tipo I, los resultados obtenidos hasta aquí indicaban que, en ésta especie, la actividad DI hepática se expresa de manera dimórfica y esta presenta en un amplio intervalo de temperatura y pH. Los machos tienen mayor actividad que las hembras durante la temporada de actividad gonadal y en el resto del año este dimorfismo enzimático desaparece (**FIGURA 8, TABLA 9**). Por ésta razón y para obtener las constantes cinéticas verdaderas, se decidió utilizar solamente a machos colectados en la temporada no reproductiva (Julio a Abril). La caracterización cinética se llevo a cabo utilizando tres diferentes temperaturas (*in vitro*): 15, 20, 37 °C. Se analizó un intervalo mas amplio utilizando ahora 8 concentraciones de sustrato (rT3): 0.005, 0.01, 0.025, 0.05, 0.125, 0.250, 0.5, 1.0 y 2.0 $\mu\text{mol/L}$, con tres concentraciones de cofactor (DTT): 1.25, 2.5, 5.0 mmol/L .

Las cinéticas de Michaelis-Menten para sustrato (rT3) y cofactor (DTT) se muestran en las **FIGURAS 14-19**, donde se puede apreciar patrones típicos de saturación. Los parámetros para calcular las constantes cinéticas se obtuvieron a partir de gráficas tipo Lineweaver-Burk, que muestran un típico patrón cinético tipo "ping-pong", siendo más pronunciado con 37°C. La **FIGURA 20** resume los resultados de las tres temperaturas utilizadas, obtenidas a partir de los interceptos de las dobles recíprocas. Los valores obtenidos se resumen en la **TABLA 10**, y se puede apreciar una relación directa entre la Km y la temperatura, lo que resulta en un aumento significativo (dos veces) en la eficiencia catalítica (sustrato), con altas temperaturas.

TABLA 10. CONSTANTES CINÉTICAS VERDADERAS DE MICHAELIS-MENTEN PARA SUSTRATO Y COFACTOR EN HOMOGENADOS HEPÁTICOS DE LAGARTIJAS MACHO Y RATAS UTILIZANDO TRES TEMPERATURAS DE INCUBACIÓN.

SUSTRATO (rT3 $\mu\text{mol/L}$)

Especie	$^{\circ}\text{C}$	Km	Vmáx	Eficiencia Catalítica
		$\mu\text{mol/L}$	pmol/mg proteína/min	Vmax/Km
<i>S. grammicus</i> Machos	15	0.78 \pm 0.07 a	26.7 \pm 2.67 a	33.96 a
<i>S. grammicus</i> Machos	20	0.76 \pm 0.16 a	27.4 \pm 3.03 a	35.99 a
<i>S. grammicus</i> Machos	37	0.29 \pm 0.0035 b,c	18.97 \pm 2.58 a,b	65.41 b
Rata	37	0.155 \pm 0.034 b,c	15.96 \pm 1.41 b	102.96 c

COFACTOR (DTT mmol/L)

Especie	$^{\circ}\text{C}$	Km	Vmáx	Eficiencia Catalítica
		$\mu\text{mol/L}$	pmol/mg proteína/min	Vmax/Km
<i>S. grammicus</i> Machos	15	1.06 \pm 1.15 a	28.58 \pm 2.67 a	26.96 a
<i>S. grammicus</i> Machos	20	1.00 \pm 0.59 a	30.41 \pm 3.03 a	30.41 a
<i>S. grammicus</i> Machos	37	0.94 \pm 1.17 a	25.20 \pm 5.76 a	26.80 a
Rata	37	4.32 \pm 0.88 a	16.48 \pm 0.96 a	3.81 b

Los resultados muestran el promedio \pm D.E. de tres ensayos independientes realizados por duplicado. Las condiciones del ensayo son: Proteína: 10-20 μg ; rT3: 0.005 a 2.0 $\mu\text{mol/L}$; ^{125}I -rT3: 200 fmol; DTT: 5mmol/L; 1h a 15, 20 o 37 $^{\circ}\text{C}$. Las letras indican las diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los vertebrados y entre las temperaturas utilizadas.

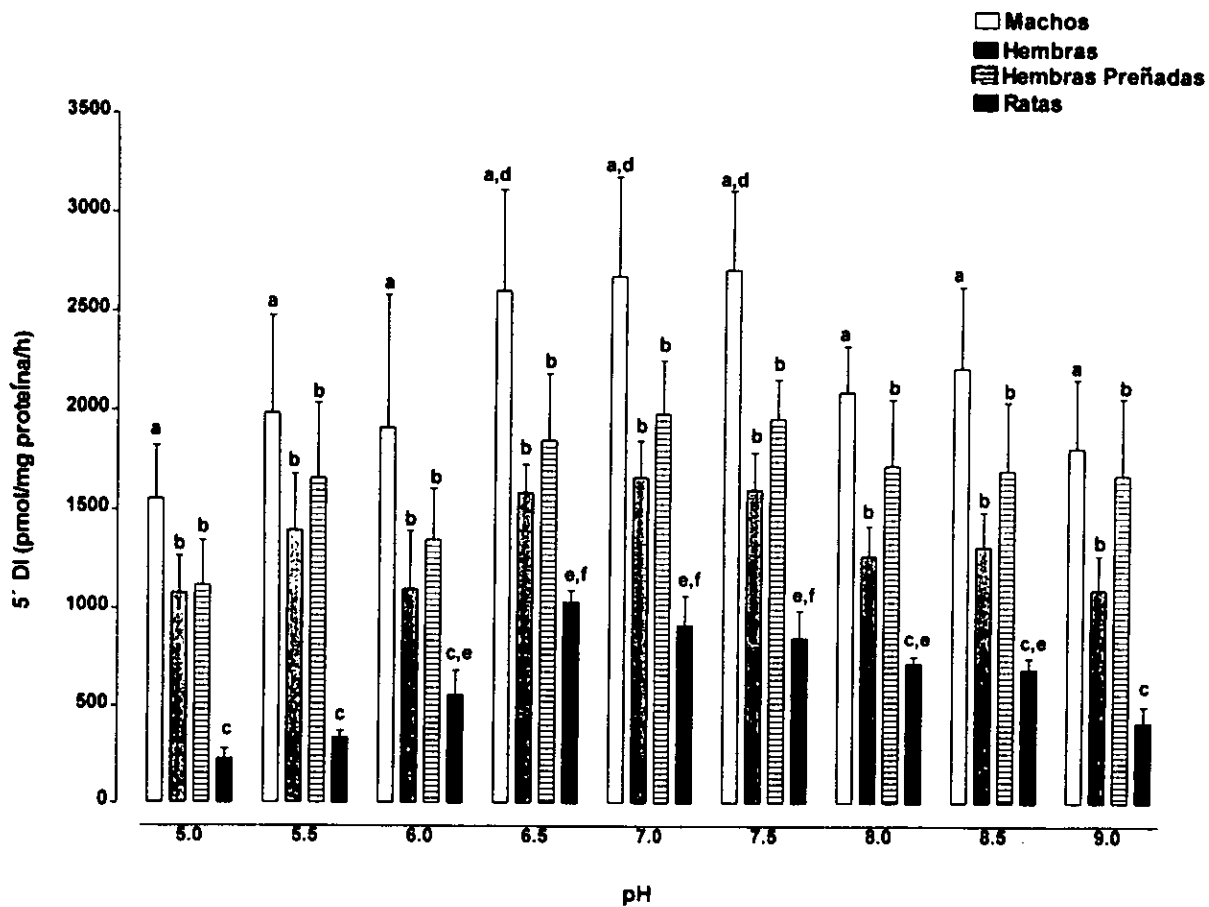


FIGURA 13. EFECTO DEL PH. Los resultados muestran el promedio \pm D.E. de seis ensayos independientes realizados por duplicado. Las condiciones del ensayo, así como el manejo de los datos fueron iguales a los descritos en la FIGURA 7. Utilizando de 15 a 20 μ g de proteína. Las letras superpuestas indican las diferencias significativas ($p < 0.01$) entre los vertebrados y los diferentes pH utilizados.

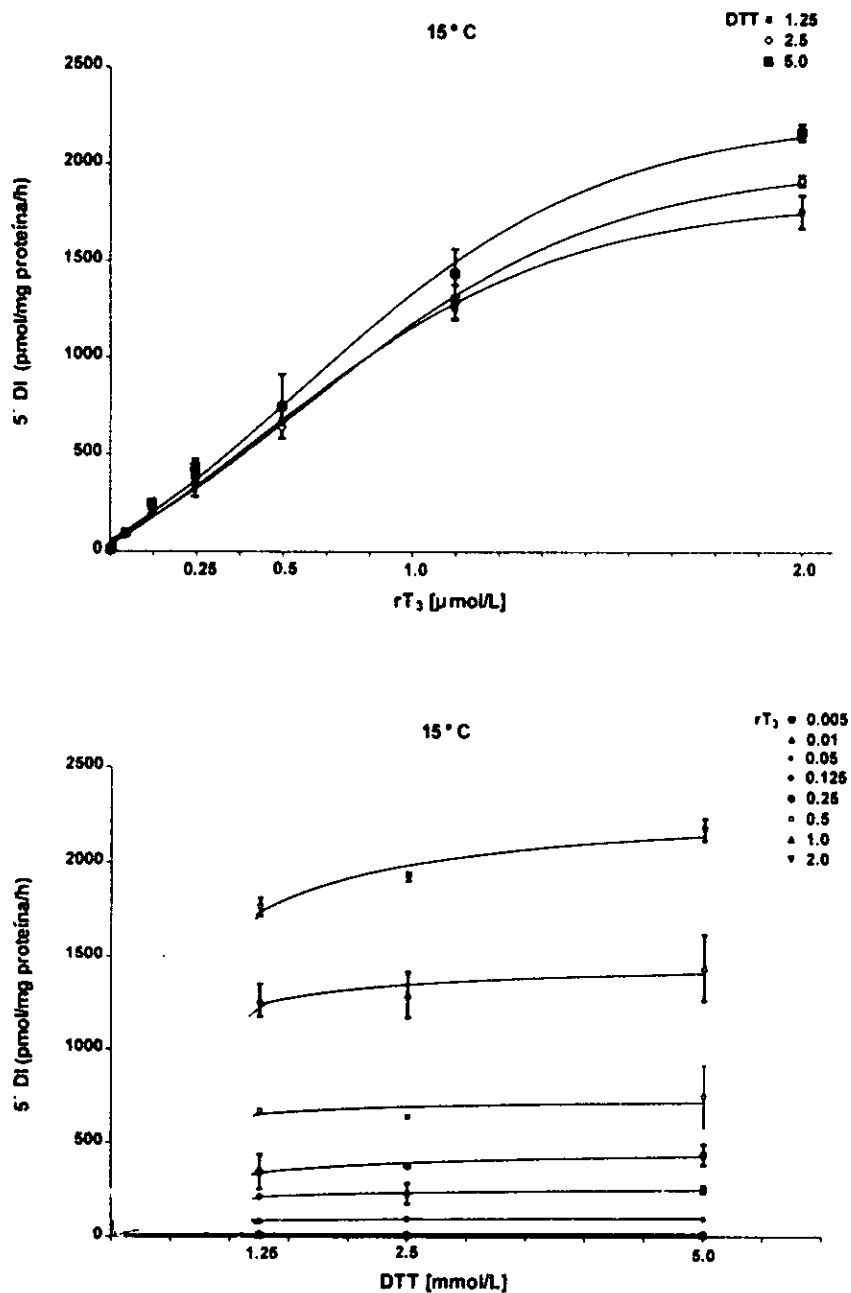


FIGURA 14. CINÉTICA DE LA ACTIVIDAD 5'DI HEPÁTICA DE LAGARTIJA A 15°C. Se muestra la actividad enzimática en función de (panel superior) la concentración de sustrato (rT₃) y (panel inferior) concentración del cofactor (DTT). Cada punto representa el promedio ± D.E. de tres ensayos independientes realizados por duplicado, utilizando en cada uno, la mezcla de seis hígados de macho, colectados de la temporada no reproductora.

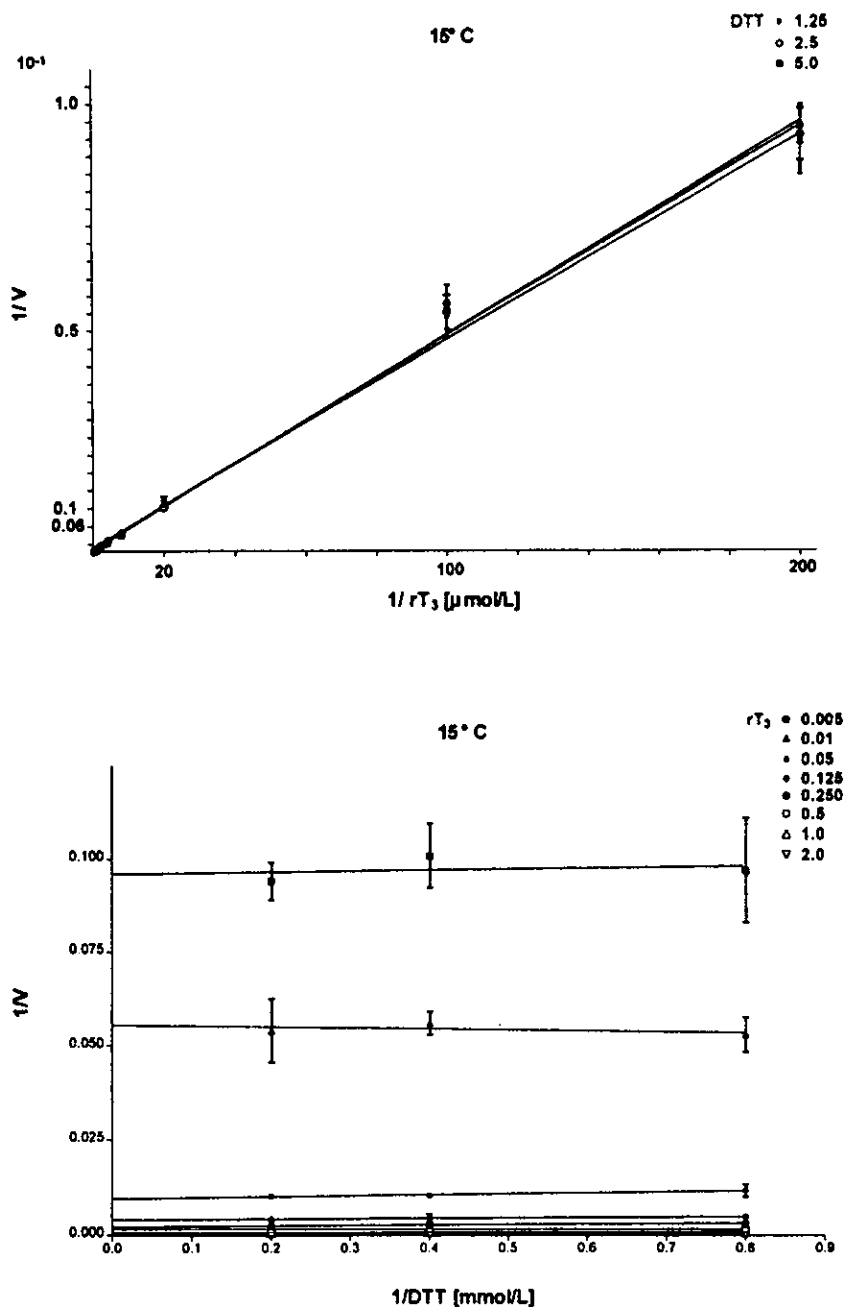


FIGURA 15. CINÉTICA DE LA ACTIVIDAD 5'DI HEPÁTICA DE LAGARTIJA A 15°C. Se muestra las gráficas tipo Lineweaver-Burk en función de (panel superior) la concentración de sustrato (rT3) y (panel inferior) concentración del cofactor (DTT). Cada punto representa el promedio \pm D.E. de tres ensayos independientes realizados por duplicado, utilizando en cada uno, la mezcla de seis hígados de macho, colectados de la temporada no reproductora.

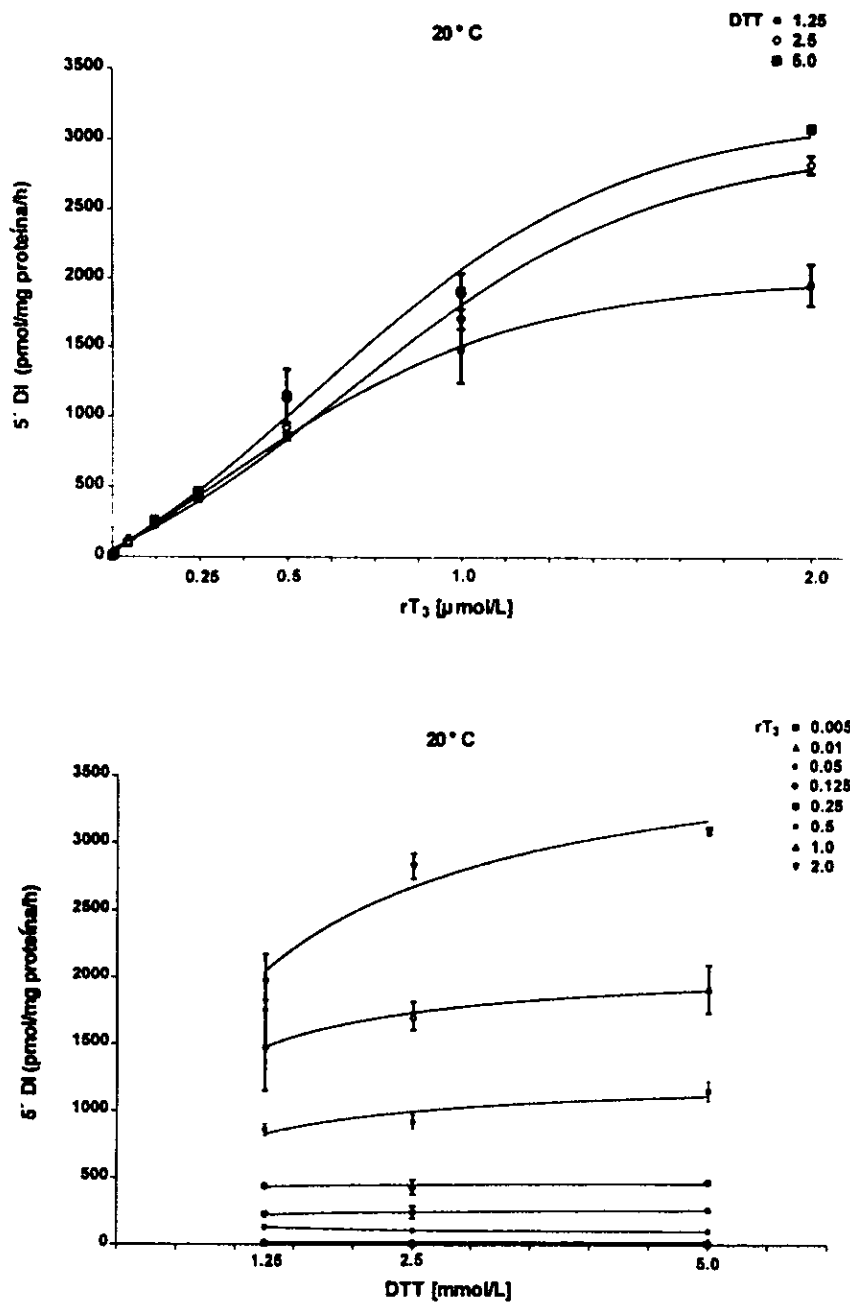


FIGURA 16. CINÉTICA DE LA ACTIVIDAD 5'DI HEPÁTICA DE LAGARTIJA A 20°C. Se muestra la actividad enzimática en función de (panel superior) la concentración de sustrato (rT₃) y (panel inferior) concentración del cofactor (DTT). Cada punto representa el promedio ± D.E. de tres ensayos independientes realizados por duplicado, utilizando en cada uno, la mezcla de seis hígados de macho.

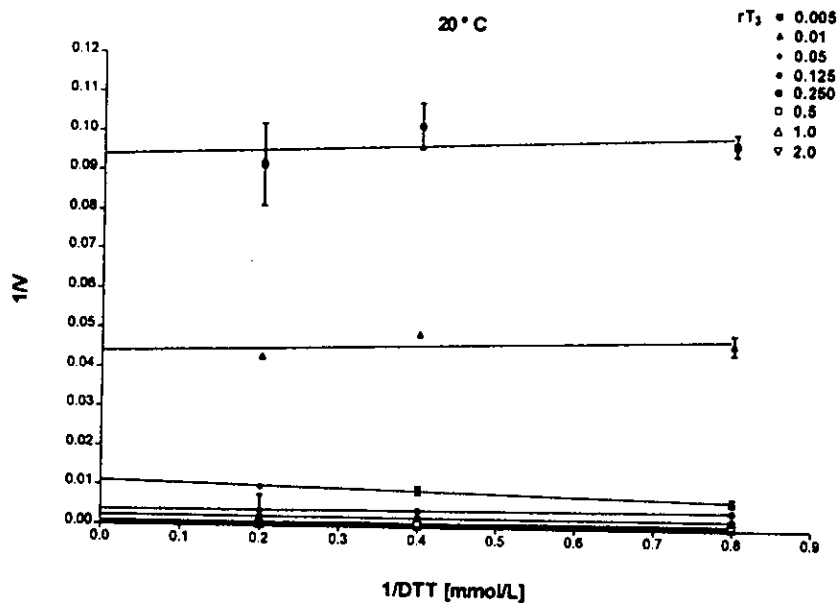
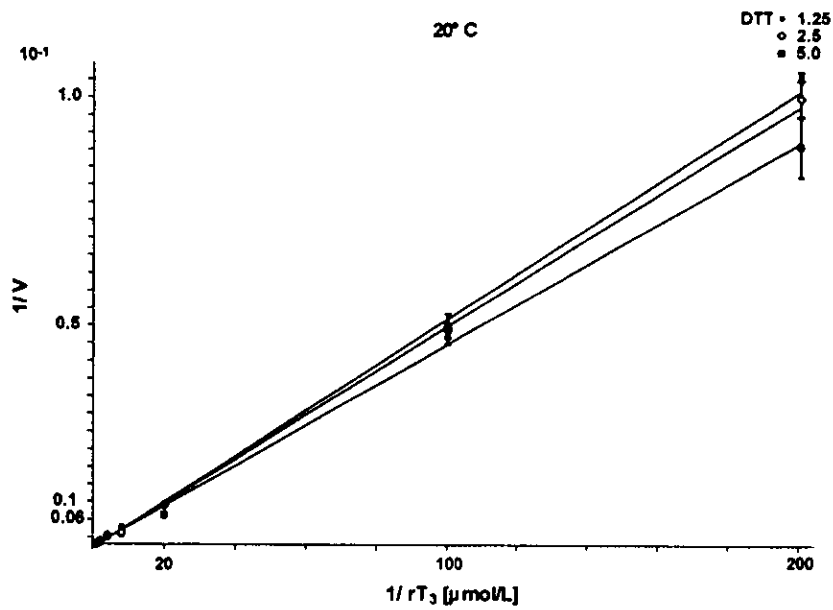


FIGURA 17. CINÉTICA DE LA ACTIVIDAD 5'DI HEPÁTICA DE LAGARTIJA A 20°C. Se muestran gráficas tipo Lineweaver-Burk en función de (panel superior) la concentración de sustrato (rT_3) y (panel inferior) concentración del cofactor (DTT). Cada punto representa el promedio \pm D.E. de tres ensayos independientes realizados por duplicado, utilizando en cada uno, la mezcla de seis hígados de macho.

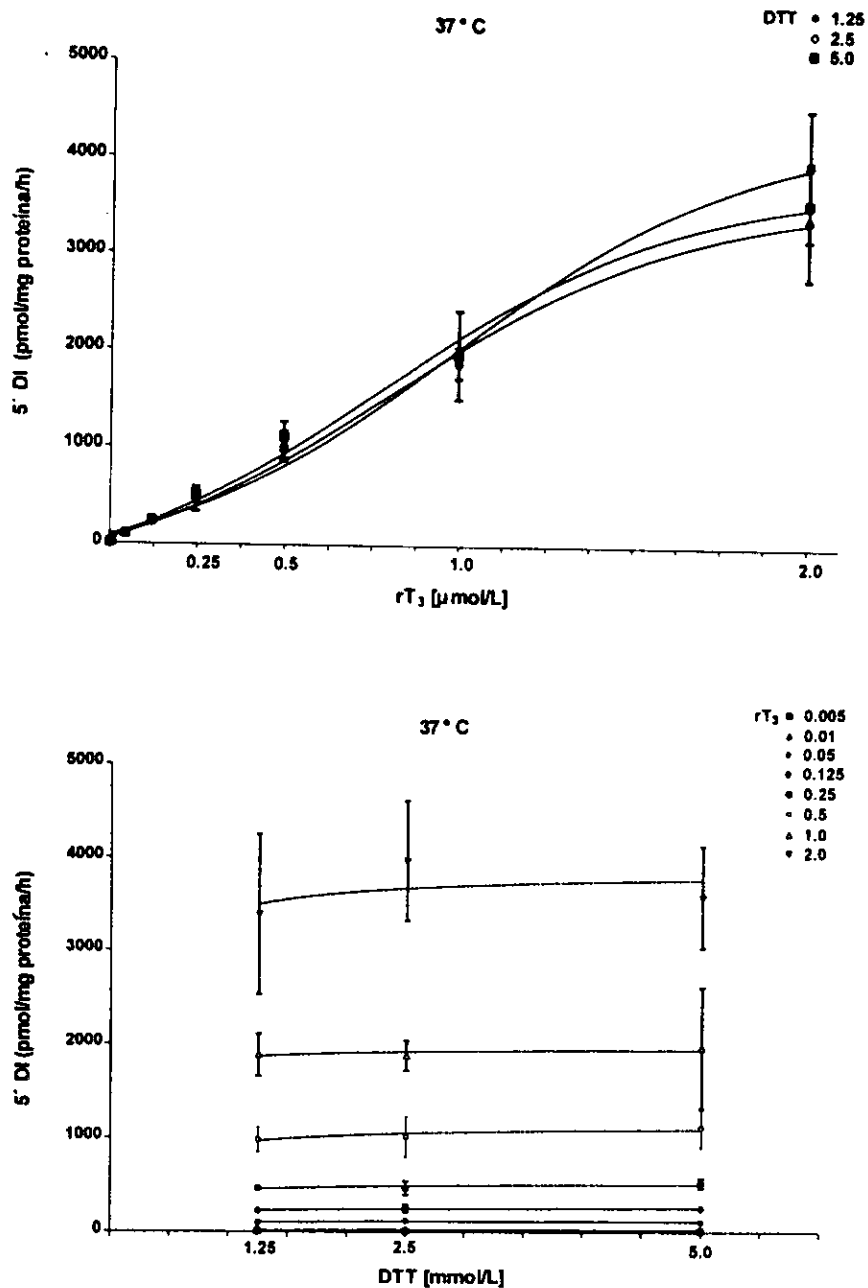


FIGURA 18. CINÉTICA DE LA ACTIVIDAD 5'DI HEPÁTICA DE LAGARTIJA A 37°C. Se muestra la actividad enzimática en función de (panel superior) la concentración de sustrato (rT₃) y (panel inferior) concentración del cofactor (DTT). Cada punto representa el promedio ± D.E. de tres ensayos independientes realizados por duplicado, utilizando en cada uno, la mezcla de seis hígados de macho.

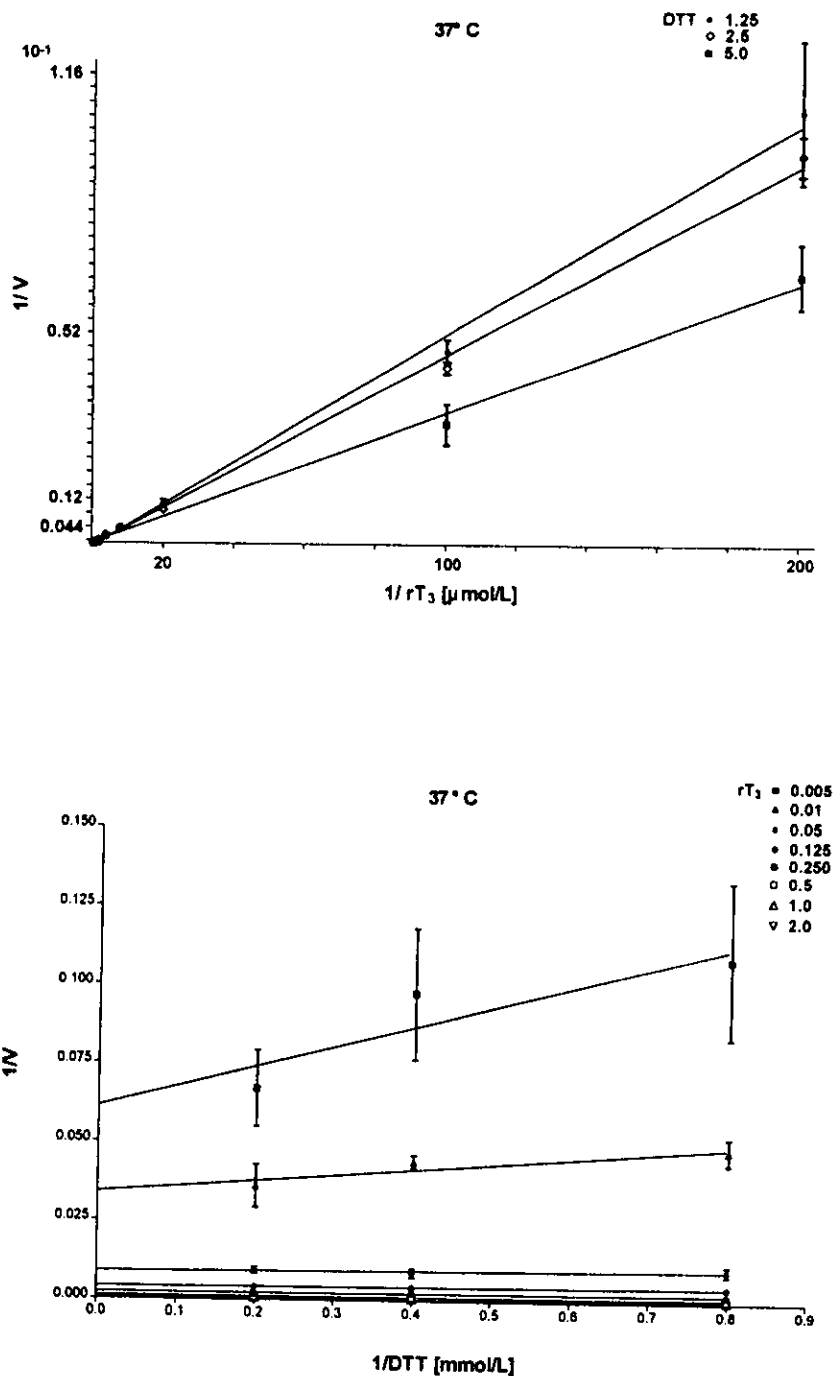


FIGURA 19. CINÉTICA DE LA ACTIVIDAD 5'DI HEPÁTICA DE LAGARTIJA A 37°C. Se muestran gráficas tipo Lineweaver-Burk en función de (panel superior) la concentración de sustrato (rT₃) y (panel inferior) concentración del cofactor (DTT). Cada punto representa el promedio ± D.E. de tres ensayos independientes realizados por duplicado, utilizando en cada uno, la mezcla de seis higados de macho.

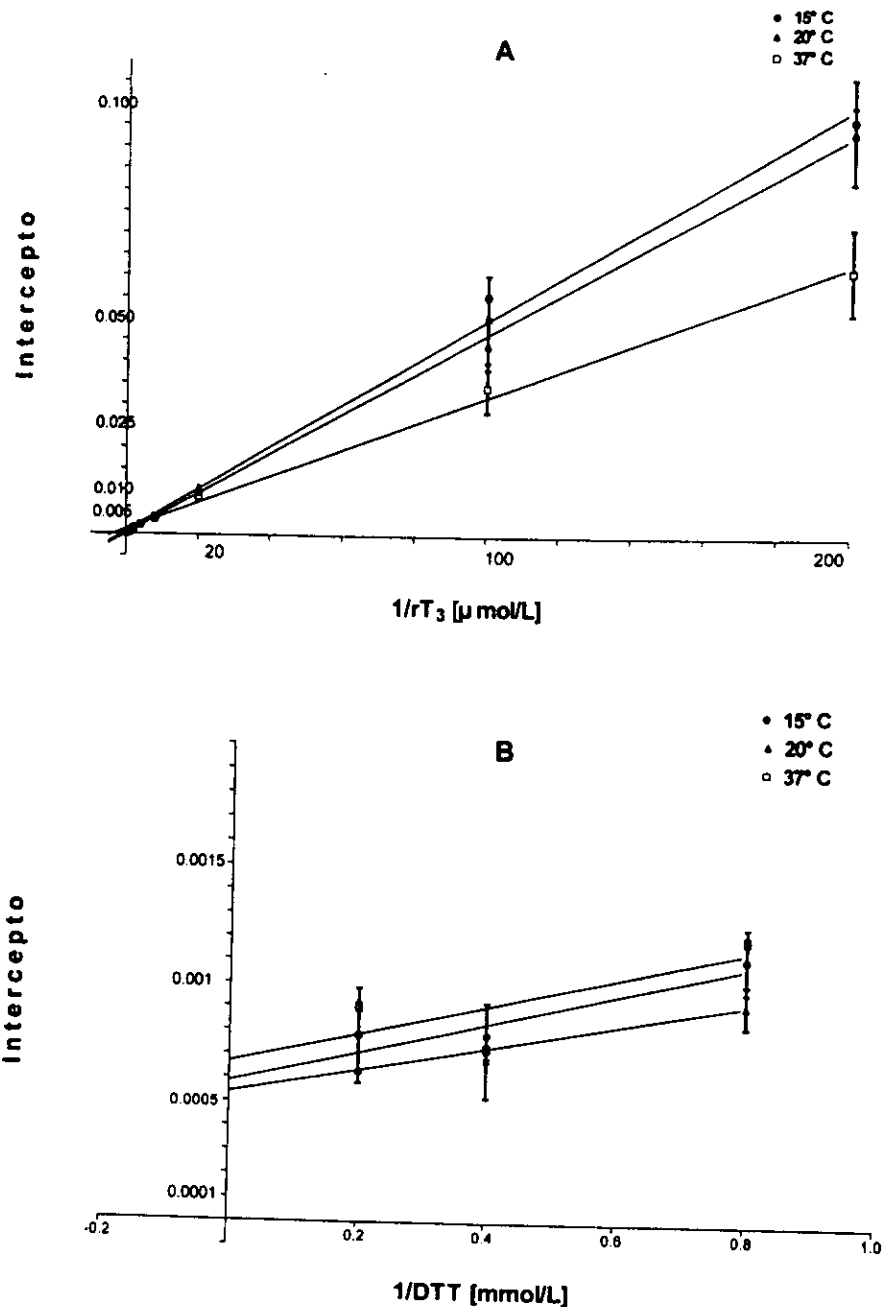


FIGURA 20. CINÉTICA DE LA ACTIVIDAD 5'DI HEPÁTICA. Las gráficas representan los interceptos de las dobles recíprocas en función de (A) la concentración de sustrato (rT_3) y (B) concentración del cofactor (DTT), realizados a 15 (●), 20 (Δ) y 37 (□) °C. El intervalo de rT_3 utilizado fue: de 0.005 a 2.0 $\mu\text{mol/L}$. Cada punto representa el promedio \pm D.E. de tres ensayos independientes realizados por duplicado, utilizando en cada uno, la mezcla de seis hígados de macho, utilizando de 15 a 20 μg de proteína, incubándose por 1h (ver TABLA 10).

ACLIMATACION

Los animales aclimatados a los dos intervalos termales mostraron diferencias tanto conductuales como morfológicas, que se explican a continuación.

15-19°C: Los animales no mostraron movimiento y se agregaban en pilas, comportamiento típico hacia el frío dirigido a aumentar la proporción masa/superficie corporal (White y Somero, 1982). Al momento de ser sacrificados se observó que los animales no mudaron de piel (hipotiroideos ?), el alimento se encontró sin digerir en el tracto digestivo y la cola (reserva de grasas) se observó más delgada (0.1 cm diámetro) que en las aclimatadas a 32-37°C. Todas las hembras se encontraron preñadas, o con un posible apareamiento (anterior a la aclimatación), los fetos se encontraron en la primera etapa de desarrollo (2mm).

32-37°C: Los animales mostraron una conducta activa, sin embargo, los machos no mostraron la típica territorialidad, debido a la temporada de la colecta. Al ser sacrificados, se observó que los animales presentaron mudas (eutiroideos? o hipertiroideos?), no se encontraron restos de alimentos, la cola gruesa (0.25cm diámetro). Las hembras preñadas presentaron fetos con dos diferentes estados de desarrollo, unas con fetos pequeños (2-3mm) lo que indica un probable apareamiento y otras con fetos desarrollados (2.8-3 cm).

Caracterización cinética de la actividad 5'DI en animales aclimatados

Análisis de la actividad en función de la Temperatura de Incubación

Se analizaron las temperaturas antes mencionadas en la caracterización. Los resultados mostraron que en machos (**FIGURA 21**) de 15-19°C, la actividad se mantuvo constante de 15-42°C y en los de 32-37° la actividad se observó entre 20-42°C. Se observó una diferencia significativa $p < 0.01$ entre los dos grupos, presentando la máxima actividad los animales de 32-37°C. Las hembras preñadas (**FIGURA 22**), mostraron el mismo comportamiento que los machos con la diferencia que la actividad enzimática se mantuvo de 15-42°C en los dos grupos. Entre los sexos se observó una diferencia significativa entre Machos comparada con las hembras preñadas.

Cinética

Se desarrollaron cinéticas con los dos grupos de aclimatación, con tres diferentes temperaturas: 15, 20, 37 °C. Se utilizó el intervalo de sustrato, empleado en la obtención de las constantes cinéticas verdaderas, que fue, (rT_3): 0.005, 0.01, 0.025, 0.05, 0.125, 0.250, 0.5, 1.0 y 2.0 $\mu\text{mol/L}$, con tres concentraciones de cofactor (DTT): 1.25, 2.5, 5.0 mmol/L . Los resultados obtenidos a partir de los interceptos resultantes de gráficas tipo Lineweaver-Burk, se muestran en las **FIGURAS 23 y 24** y en la **TABLA 11**. Se puede apreciar que existen diferencias en la K_m entre los dos grupos aclimatados, mientras que en los de 15-19°C se aprecia una característica compensación térmica positiva, siendo la misma que la observada en las cinéticas *in vitro* (de los animales de campo). En los de 32-37°C se observa lo opuesto, esto sugiere la expresión de variantes y/o formas enzimáticas.

TABLA 11. CONSTANTES VERDADERAS DE MICHAELIS-MENTEN EN HOMOGENADOS HEPÁTICOS DE LAGARTIJAS MACHOS ACLIMATADOS EN REGIMENES TÉRMICOS (15-19°C Y 32-27°C) Y UTILIZANDO TRES TEMPERATURAS DE INCUBACION.

SUSTRATO (rT₃)

ACLIMATACION 15 - 19 °C

°C	Km	V _{máx}	Eficiencia Catalítica
	µmol/L	pmol/mg proteína/min	V _{max} /Km
15	2.06 ± 0.15 a	51.8 ± 1.1 a	25.02 a
20	0.61 ± 0.16 b	16.3 ± 1.03 b	26.72 a
37	0.25 ± 0.11 b,c	9.79 ± 0.58 c	39.16 a

ACLIMATACION 32 - 37 °C

°C	Km	V _{máx}	Eficiencia Catalítica
	µmol/L	pmol/mg proteína/min	V _{max} /Km
15	0.17 ± 0.05 a	7.56 ± 0.80 a	42.50 a
20	0.80 ± 0.16 b	27.27 ± 0.98 b	33.98 a
37	1.15 ± 0.29 b,c	40.0 ± 1.01 c	34.78 a

COFACTOR (DTT)

ACLIMATACION 15 - 19 °C

°C	Km	V _{máx}	Eficiencia Catalítica
	µmol/L	pmol/mg proteína/min	V _{max} /Km
15	2.35 ± 0.07 a	52 ± 1.30 a	22.12 a
20	0.66 ± 0.16 b	25.57 ± 1.22 b	38.74 a
37	0.98 ± 0.19 b	13.39 ± 1.58 c	14.87 a

ACLIMATACION 32 - 37°C

°C	Km	V _{máx}	Eficiencia Catalítica
	µmol/L	pmol/mg proteína/min	V _{max} /Km
15	2.99 ± 0.9 a	33.18 ± 1.51 a	11.06 a
20	3.65 ± 0.21 a	32.96 ± 2.97 a	9.03 a
37	5.12 ± 1.22 a	39.9 ± 1.2 a	7.79 a

Los resultados muestran el promedio ± D.E. de dos ensayos independientes realizados por duplicado. Condiciones del Ensayo: Proteína: 10-20µg; rT₃: 0.005 a 2.0 µmol/L; ¹²⁵I-rT₃: 200 fmol; DTT: 5mmol/L; 1h a 15, 20 o 37°C. Las letras indican las diferencias significativas (p<0.05) entre las temperaturas utilizadas.

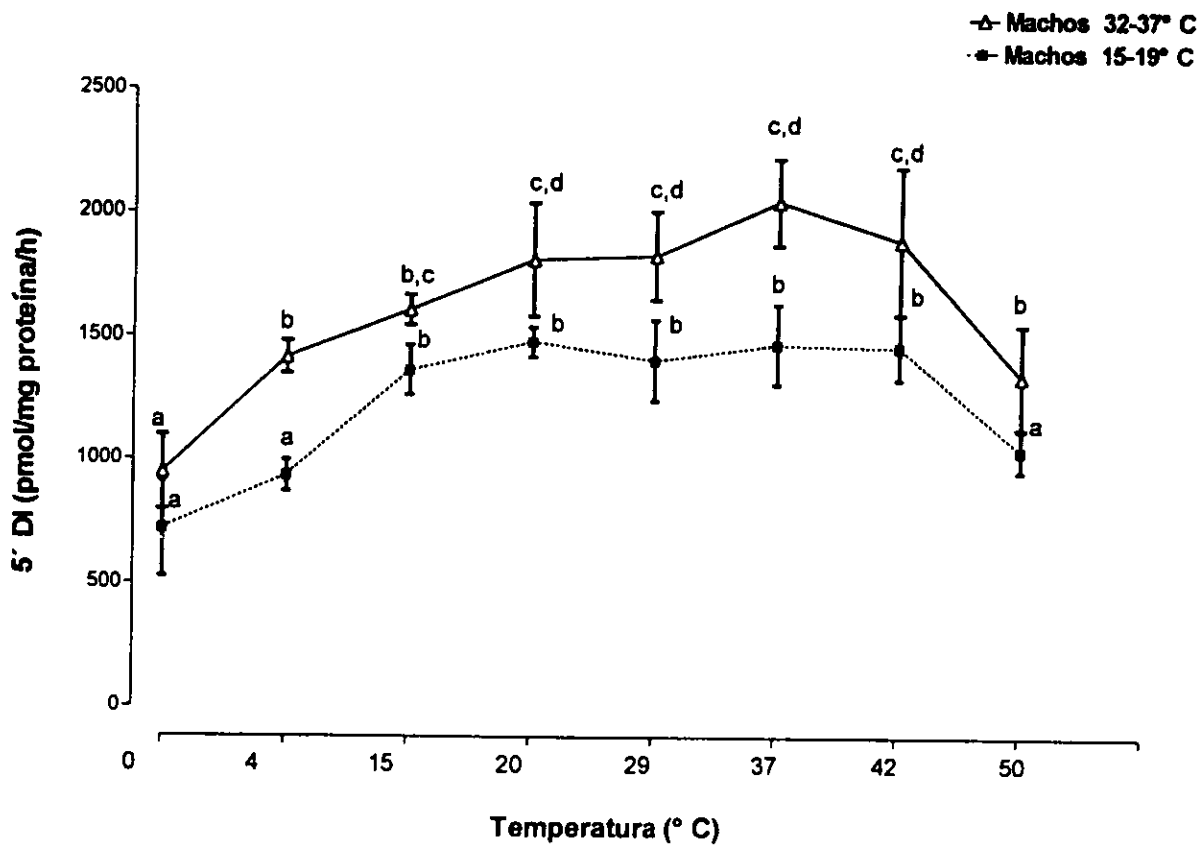


FIGURA 21. EFECTO DE LA TEMPERATURA EN MACHOS ACLIMATADOS A LOS DOS INTERVALOS DE TEMPERATURA EMPLEADOS. Los resultados muestran el promedio \pm D.E. de tres ensayos independientes realizados por duplicado. Las condiciones del ensayo, así como el manejo de los datos fueron iguales a los descritos en la **FIGURA 7**. Utilizando de 15 a 20 μ g de proteína.

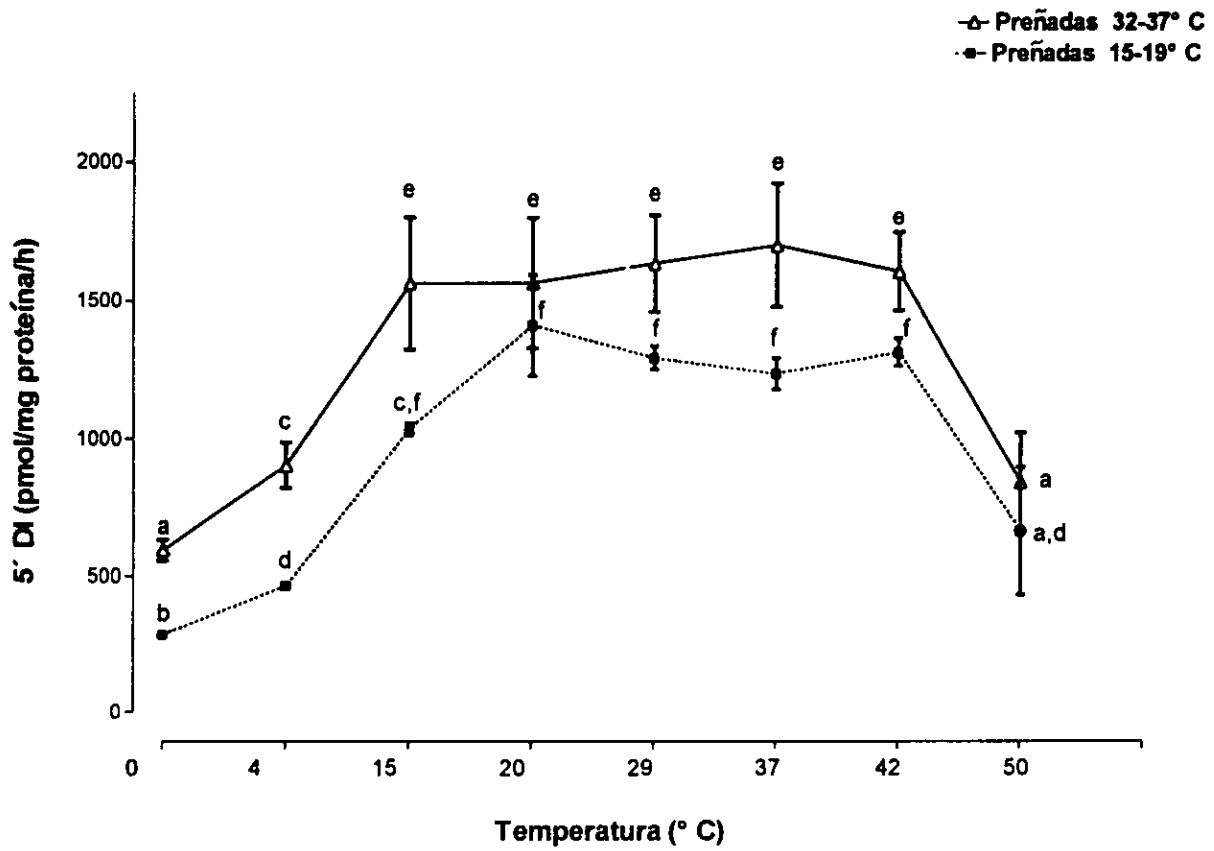


FIGURA 22. EFECTO DE LA TEMPERATURA EN HEMBRAS PREÑADAS ACLIMATADAS A LOS DOS INTERVALOS DE TEMPERATURA EMPLEADOS. Los resultados muestran el promedio \pm D.E. de tres ensayos independientes realizados por duplicado. Las condiciones del ensayo, así como el manejo de los datos fueron iguales a los descritos en la FIGURA 7. Utilizando de 15 a 20 μ g de proteína.

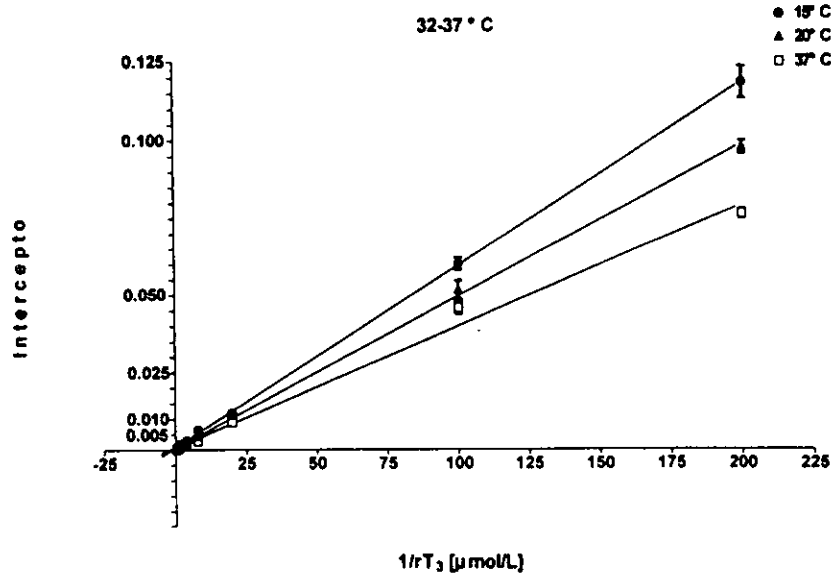
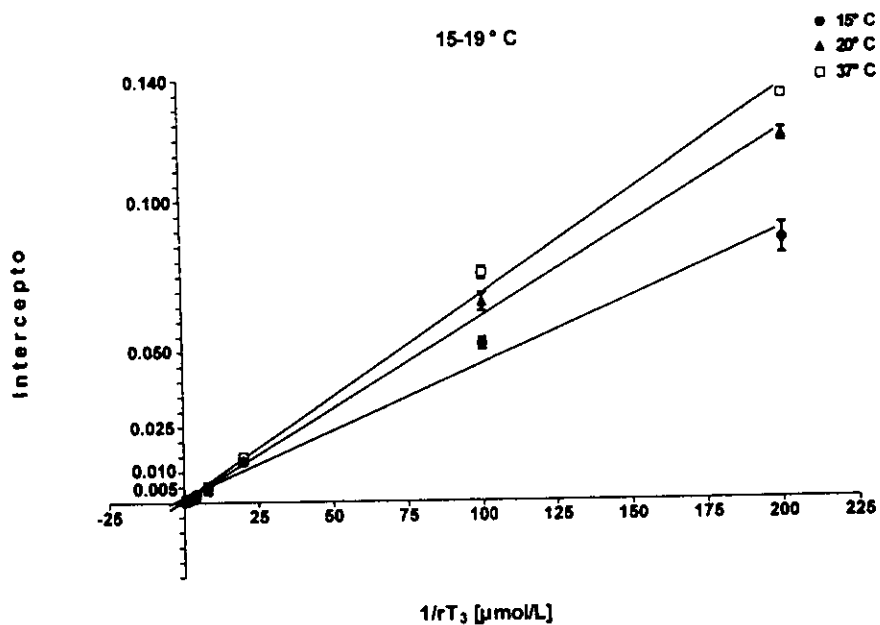


FIGURA 23. CINÉTICA DE LA ACTIVIDAD 5'DI HEPÁTICA. Las gráficas representan los interceptos de las dobles recíprocas en función de la concentración de sustrato (rT_3). En el panel superior en animales aclimatados de 15 a 19°C y en el inferior aclimatados entre 32-37°C, realizados a 15 (●), 20 (▲) y 37 (□) °C. El intervalo de rT_3 utilizado fue: de 0.005 a 2.0 $\mu\text{mol/L}$. Cada punto representa el promedio \pm D.E. de dos ensayos independientes realizados por duplicado, utilizando en cada uno, la mezcla de seis hígados de macho, utilizando de 15 a 20 μg de proteína, incubándose por 1h (ver TABLA 11).

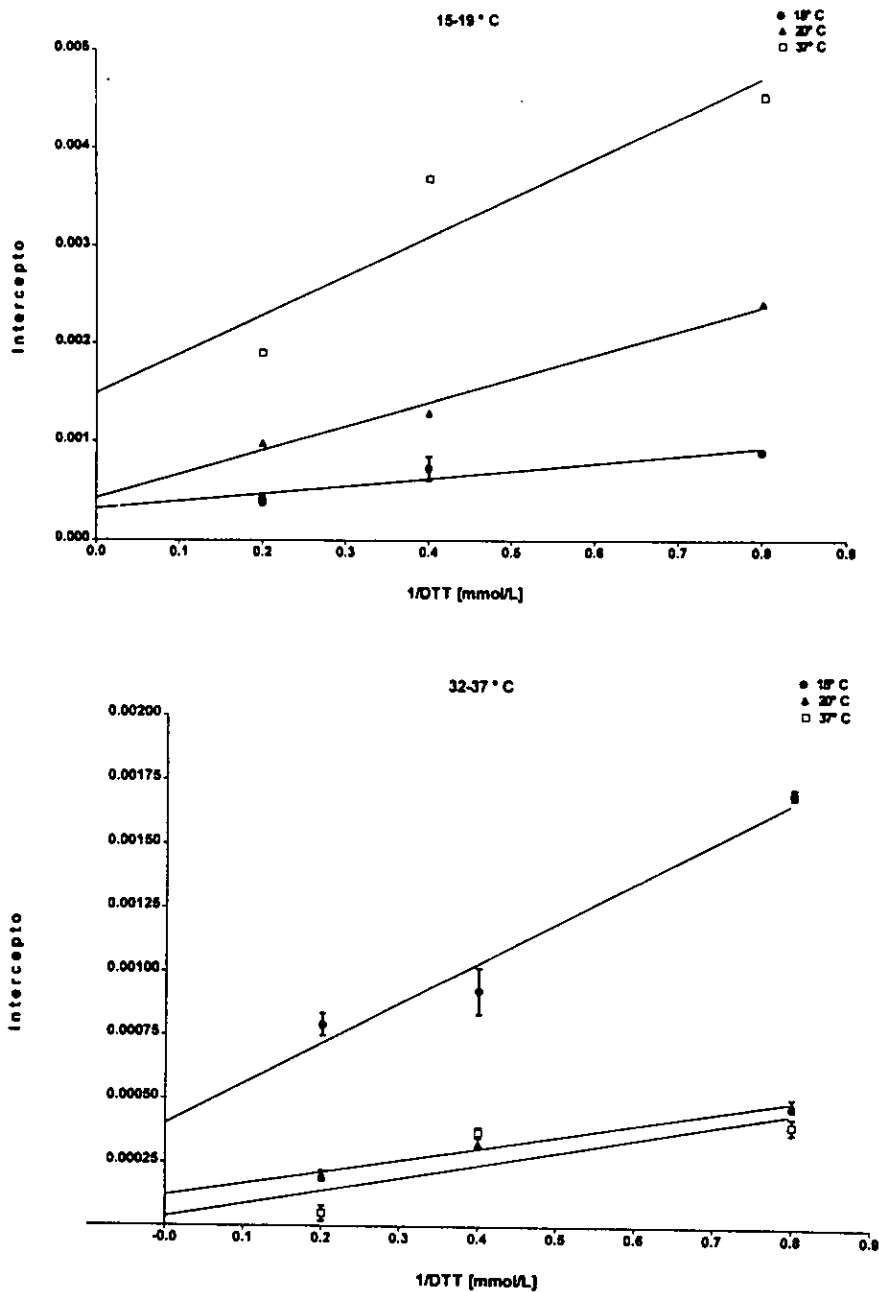


FIGURA 24. CINÉTICA DE LA ACTIVIDAD 5'DI HEPÁTICA. Las gráficas representan los interceptos de las dobles recíprocas en función de la concentración del cofactor (DTT). En el panel superior en animales aclimatados de 15 a 19°C y en el inferior aclimatados entre 32-37°C, realizados a 15 (●), 20 (Δ) y 37 (□) °C. El intervalo de rT₃ utilizado fue: de 0.005 a 2.0 μmol/L. Cada punto representa el promedio ± D.E. de dos ensayos independientes realizados por duplicado, utilizando en cada uno, la mezcla de seis hígados de macho, utilizando de 15 a 20μg de proteína, incubándose por 1h (ver TABLA 11).

pH y Temperatura

Este análisis representa un esquema mas cercano a las modificaciones pH-temperatura que pueden presentar estos sistemas *in vivo*. Así, se evaluó la influencia de estas dos variables sobre la actividad DI hepática. Además, aunque no se realizó ningún análisis lipídico, de manera indirecta se puede relacionar a estas dos variables con las transformaciones que sufren estos sistemas membranales a corto tiempo (a lo largo de un día). A continuación se presentan los resultados preliminares.

Se realizó un ensayo utilizando machos en la etapa no reproductiva, donde se analizó la actividad enzimática bajo los siguientes parámetros: En cada temperatura 0, 4, 15, 20, 29, 37, 42 y 50°C, se ensayó un intervalo de pH de 5.0-8.5, con intervalos de 0.5, lo que se muestra en la **FIGURA 25**. Se observó que la actividad enzimática presenta una termoestabilidad en el intervalo antes descrito de 15-42 °C y de pH de 5.5 a 8.0, (con excepción del pH 7.5 donde se observó un pequeño aumento en los 37°C). De esta manera, la menor actividad enzimática se encontró en 0, 4, 42 y 50°C independientemente del pH utilizado.

Esta serie de ensayos se realizaron en los animales aclimatados, junto con los resultados de animales control o "normales", (todos corresponden al mismo periodo de reproducción), representados en la **FIGURA 26**. Se puede apreciar que con el intervalo de pH utilizado los animales aclimatados (las dos grupos), exhibieron mayor actividad enzimática, teniendo los mayores valores los animales aclimatados de 32-37°C.

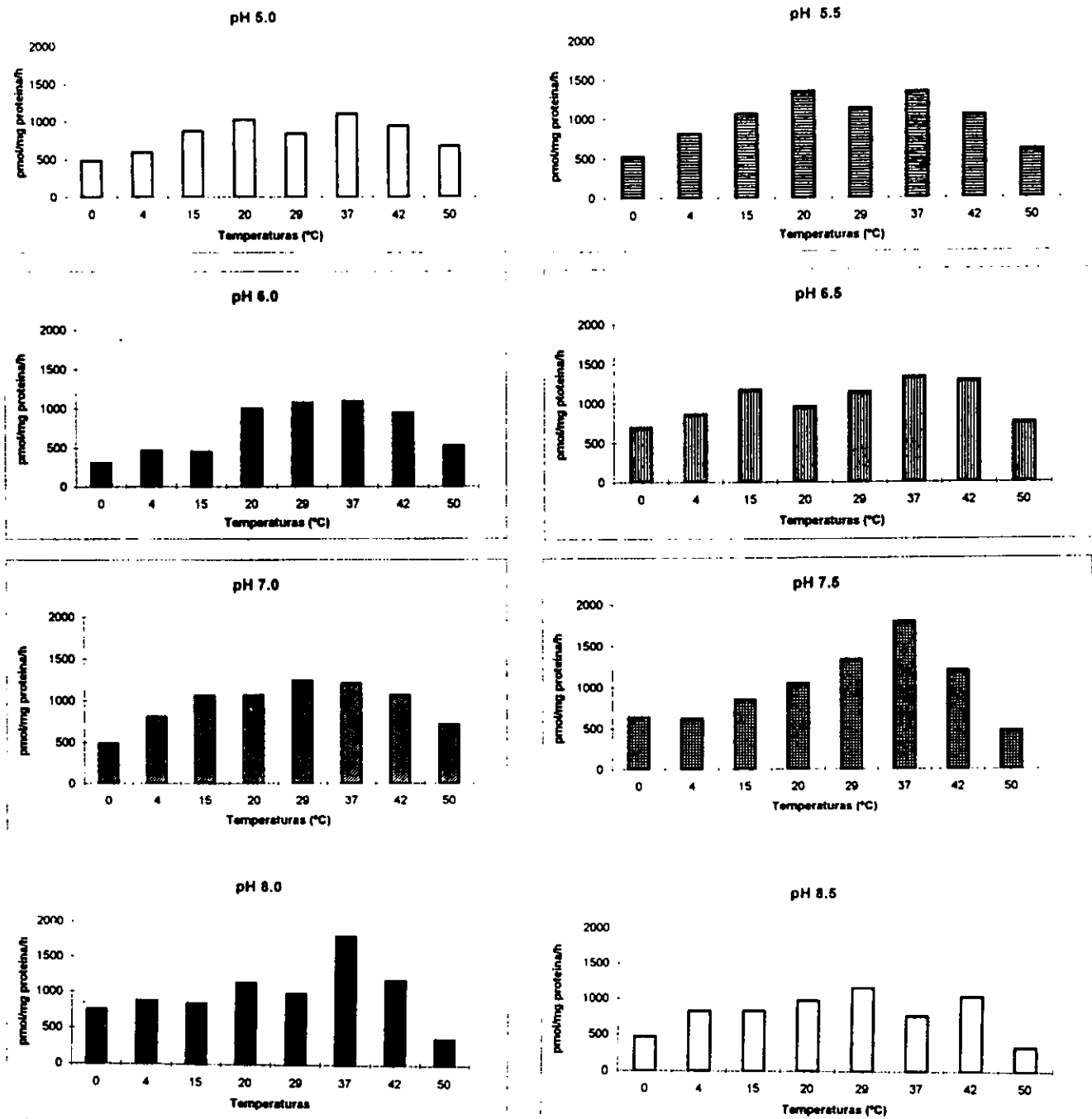


FIGURA 25. EFECTOS DE LA TEMPERATURA Y PH. La actividad enzimática se encuentra en función de las siguientes temperaturas: 0, 4, 15, 20, 29, 37, 42 y 50°C, y del intervalo de pH de 5 a 8.5, con incrementos de 0.5. Cada punto representa el promedio de dos mediciones realizadas en un ensayo. Se utilizó la mezcla de seis hígados de macho. Las condiciones del ensayo, así como el manejo de los datos fueron iguales a los descritos en la **FIGURA 7**. Utilizando de 15 a 20µg de proteína.

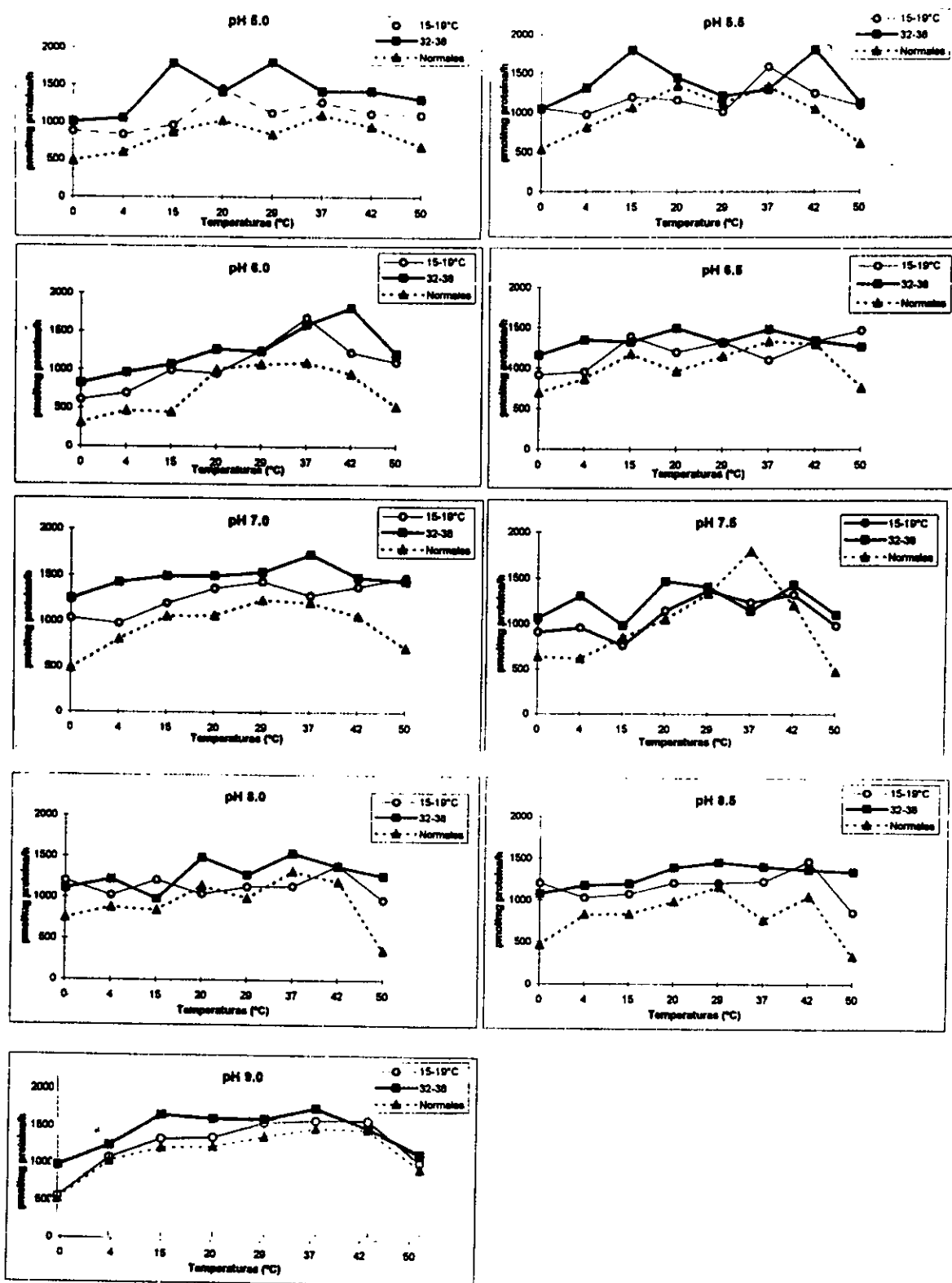


FIGURA 26. EFECTOS DE LA TEMPERATURA Y PH EN MACHOS ACLIMATADOS A LOS DOS INTERVALOS DE TEMPERATURA. La actividad enzimática se encuentra en función de las siguientes temperaturas: 0, 4, 15, 20, 29, 37, 42 y 50°C, y del intervalo de pH de 5 a 9.0, con incrementos de 0.5. Cada punto representa el promedio de dos mediciones realizadas en un ensayo. Se utilizó la mezcla de seis hígados de macho. Las condiciones del ensayo, así como el manejo de los datos fueron iguales a los descritos en la FIGURA 7. Utilizando de 15 a 20µg de proteína.

IX DISCUSION

Este trabajo se enfocó a analizar de manera sistematizada en el hígado de ectotermos, las posibles adaptaciones enzimáticas que ocurren en la vía desyodativa de activación o vía ORD, en respuesta a la temperatura de ensayo (*in vitro*) y/o a la del hábitat (aclimatación). Hasta donde sabemos, este es el primer trabajo en donde además de reportar la caracterización cinética de las desyodasas que catalizan la vía ORD en el hígado de hembras, hembras preñadas y machos de las lagartijas endémicas *Sceloporus grammicus microlepidotus*, se documenta la posible expresión de formas/variantes enzimáticas termo-inducidas.

Caracterización de la Vía ORD

Utilizando los controles positivos adecuados (placenta de rata y cerebro de embrión de pollo), así como las condiciones óptimas de ensayo (Kaplan y Shaw, 1984, Valverde-R, *et al* 1993), los resultados de este trabajo muestran claramente que en el hígado de la lagartija, la vía ORD solo se encuentra catalizada por la desyodasa tipo I (DI). En efecto, con base en los parámetros analizados y los criterios operacionales actualmente aceptados *i.e.* sustrato preferencial *in vitro* (rT3), requerimientos del cofactor, susceptibilidad a inhibidores como PTU y GTG y patrón cinético, la vía ORD en el hígado de la lagartija esta catalizada por una enzima que exhibe características semejantes a las reportadas para la DI en mamíferos y aves (Leonard y Visser 1986, Galton 1988, Kohrle 1992, McNabb 1992). Estos resultados confirman y amplían la información de los dos únicos trabajos que conocemos en los cuales se analizó la actividad desyodativa total en el hígado de reptiles (Darras *et al* 1994, Wong, *et al* 1993), y apoyan la noción de que excluyendo a los teleósteos (Orozco *et al* 1997) y anfibios (Becker *et al* 1997), en el resto de los vertebrados la vía hepática ORD esta catalizada exclusivamente por la desoyodasa tipo I (McNabb 1992). Igualmente, coinciden con la propuesta, de que a partir de un antepasado común entre las subclases sinápsida y diápsida, se originaron tanto aves como mamíferos (McFarland, 1985). Además, en este mismo contexto y aunque no forma parte de esta tesis, es pertinente señalar que se evaluó la actividad 5'DII en otros tejidos tanto de lagartijas adultas: cerebro, piel y placenta; como en embriones: piel, hígado y cerebro. Los resultados preliminares (no se incluyen en la tesis) mostraron que, con excepción del cerebro de embrión, el resto de los tejidos no presentan actividad 5'DII.

Por otra parte, es importante enfatizar que la caracterización cinética y sistematizada de esta actividad enzimática reveló, que en los reptiles, la DI exhibe características funcionales que son peculiares a este grupo de vertebrados. En efecto, nuestros resultados muestran que el hígado de esta especie de lagartija expresa la actividad específica DI mas alta reportada hasta la fecha. Este hallazgo coincide con datos reportados en forma resumida para otro tipo de lagartija *Agama* (Darras *et al* 1994).

Aunque nuestros resultados no permiten por el momento, ofrecer una explicación fundamentada, es posible que esta elevada actividad DI hepática en la lagartija, tenga relación con: 1) las concentraciones de sustrato, ya que se sabe que en otra especie del mismo género (*Sceloporus undulatus*), las concentraciones circulantes de tironinas (T4 y T3) son de aproximadamente el doble en comparación con ratas (John- Alder, 1991, Chopra 1992) y 2) la sorprendente ausencia de actividad DII en órganos que en otros vertebrados adultos sí la expresan, vgr., cerebro. En este contexto es pausable proponer que en la lagartija, la actividad ORD hepática supla la ausencia de actividad DII en éstos órganos. Por otro lado, aunque no se evaluó la concentración de catecolaminas, datos en la literatura nos permiten sugerir que ésta ausencia de DII, se puede relacionar a la baja concentración circulante de noradrenalina (NA) - encargada de estimular a la DII-, ya que en reptiles las glándulas adrenales secretan principalmente epinefrina que representa del 60 al 80% de las catecolaminas (Chester-Jones, et al 1987).

Dimorfismo

La afinidad (Km) para el sustrato fue semejante para uno y otro sexo independientemente de la temporada de reproducción, y aunque el valor de esta constante es mayor en las hembras preñadas, esta diferencia no es significativa. Las constantes aparentes para rata resultaron muy similares a lo previamente reportado para esta especie (Körhlie J. 1992). Sin embargo, los resultados de la presente tesis muestran claramente que la actividad DI hepática en la lagartija *S. grammicus*, exhibe un dimorfismo estacional, que se puede apreciar en los resultados de la Vmáx y la eficiencia catalítica, siendo los machos los que presentan la mayor actividad (Vmáx) en el periodo de reproducción, que ocurre de mayo a julio (Guillette y Casas-Andreu 1980), lo anterior explica la desviación estándar obtenida, en el resto del año no se observaron diferencias con las hembras. Este comportamiento se observa en las gráficas donde la D.E. de machos fue muy grande debido a que se esquematiza el promedio de los ensayos llevados a cabo con colectas realizadas a lo largo de 1.5 años. Este hallazgo concuerda con la bien conocida interrelación funcional de la actividad gonadal y tiroidea en diferentes reptiles monoéstricos (Lynn 1970, Haldar-Misra y Thapliyal, 1981; John-Alder 1984a, Kar y Chandola-Saklani 1985a, Fleury et al 1987, Leatherland 1987, Chandola-Saklani y Kar 1990). De la misma manera, éstos resultados coinciden con el dimorfismo reportado para ratas, donde el macho tiene mayor actividad enzimática DI que la hembra. Este dimorfismo se ha atribuido a una acción directa de los esteroides sexuales, ya que la testosterona aumenta la actividad mientras que el estrógeno la disminuye (Harris, et al 1979). Recientemente se ha propuesto, que la testosterona puede estar involucrada en la regulación de la expresión del gen de la DI (Miyashita et al 1995).

En conjunto, estos resultados indican que al igual que en el resto de vertebrados, las hormonas tiroideas son determinantes en la operación/instalación de procesos funcionales específicos durante periodos críticos del individuo, como es el caso de la función reproductora y apoyan la noción de que la

función mas antigua y básica de las hormonas tiroideas esta relacionada con el crecimiento, maduración y diferenciación del organismo. Además, también indican un alto grado evolutivo de éstas lagartijas (i.e. características morfológicas y cariotípicas), y apoyan la propuesta que desde un punto de vista filogenético, ellas se encuentran cercanas a los mamíferos (Sites J, 1992; Mc Farland, *et al*, 1995).

Termodependencia y pH

Uno de los principales hallazgos de esta tesis consistió en la sorprendente estabilidad catalítica que exhibe la actividad DI en un amplio intervalo de temperatura y pH. El intervalo de temperatura (15°C a 42°C) y de pH (5.0 a 9.0), en el que actúa la enzima 5'D-I del hígado de lagartijas, es significativamente más amplio que el que exhibe la isoenzima hepática de rata (37 a 42°C y 6.5 a 7.5 respectivamente). Estos resultados son consistentes con una serie de hechos ya bien establecidos acerca de la fisiología adaptativa de los ectotermos (Prosser y Nelson 1981, White y Somero, 1982; Hochachka y Somero, 1984), de los cuales se discutirán con mayor amplitud aquellos que están directamente relacionados al tema central de la tesis.

Compensación Térmica

El hallazgo de que la DI en el hígado de la lagartija mantenga su actividad a lo largo de todo el intervalo de temperatura ensayado, es consecuente con la estrategia termoregulatoria de estos reptiles, cuyo intervalo térmico natural y temperatura corporal, abarca precisamente estos extremos de temperatura (Patterson, 1992), y en la cual utilizan primordial pero no exclusivamente, mecanismos de termoregulación etológica, i.e. el asoleo (Avery, 1976). En este mismo contexto e independientemente de las diferencias metodológicas, nuestros resultados son consistentes con el único otro estudio que conocemos en el cual se analiza la actividad desyodativa hepática total (T4-ORD) en una especie de serpiente *Elaphe taeniura* (Wong CC, *et al* 1993). La actividad hepática se analizó con las siguientes temperaturas 4, 24, 37 y 56°C. La máxima actividad enzimática DI se encontró a los 37°C y en el resto de las temperaturas ensayadas ésta actividad fue mínima. Este "pico" de actividad enzimática en la T4-ORD de la serpiente puede estar relacionado a la temperatura natural que estas especies enfrentan (Stidworthy J 1974), así como a que filogenéticamente se considera que las serpientes son lagartijas sin extremidades, extremadamente especializadas, lo que también concuerda con la amplia diversidad presente en cada uno de los ordenes de los reptiles (Mc Farland, *et al*, 1985). De la misma manera, nuestros resultados están de acuerdo con la dependencia térmica que exhiben los sistemas de desyodasas en peces teleósteos (Johnston e Eales 1995, Fenton *et al* 1997, Orozco *et al* 1997).

Compensación Térmica y pH

Con respecto al pH, los resultados de esta tesis coinciden con lo reportado en serpientes, en las cuales la vía T4-ORD es activa en el intervalo de 4 a 8 (Wong, 1993). En comparación, en las ratas, se observó un aumento significativo $p < 0.01$ en el intervalo de 6.5 a 7.5, lo que concuerda con los datos citados en la literatura para ratas (Leonard, 1991) y para teleósteos (tilapias, Mol KA, et al 1997).

La interdependencia pH-temperatura en diferentes sistemas enzimáticos (con enzimas puras) de ectotermos ha sido ampliamente documentada (Yancey y Somero 1978, Hochachka y Somero 1984, Hazel 1993, Somero 1995). Estos trabajos han mostrado el papel crucial que juega el estado de protonación de los grupos imidazol de histinida de las enzimas para la compensación térmica de su actividad catalítica (sección 3.0 de Introducción). Así, por ejemplo, en teleósteos y otros vertebrados el sitio activo de la lactato dehidrogenasa del piruvato tiene los aa ARG e HIS y se ha demostrado que la ARG permite a la enzima funcionar en un pH fisiológico, mientras que la HIS es crucial en los extremos del pH (Yancey y Somero, 1978). Estos estudios han llevado a proponer que la temperatura ambiental altera a los moduladores que regulan la expresión de variantes enzimáticas térmicamente inducidos (Poly, 1997).

En este contexto y en relación a la estabilidad catalítica (térmica y pH) que exhibe la actividad DI del hígado de la lagartija es importante enfatizar los siguientes hechos: a) La DI tiene cuatro residuos HIS ubicados en las posiciones 158, 174, 186 y 286; b) las HIS 158 y 174, cercanas al sitio activo (Se-Cys), son esenciales para la unión con el sustrato (Berry, 1992b); c) las HIS 186 y 283 no participan en la reacción y su remoción no afecta a la actividad; d) El PTU, inhibidor acompetitivo para el sustrato y competitivo para el cofactor, se une de manera covalente al sitio activo y forma un puente disulfuro con el residuo cisteína (Mol JA, et al 1984, Sun, et al 1997); e) el PTU también previene la alcalinización del grupo sulfidrilo (SH) de la enzima, cuya elevada reactividad puede obedecer a la formación de un puente de hidrógeno con el grupo imidazol de una HIS vecina; f) Otros inhibidores de la actividad DI como los colores dietilpirocarbonato (DEP) y el rosa de bengala interactúan específicamente con los grupos HIS de la molécula (Mol JA, et al 1984). Sobre estas bases, así como por los resultados observados en ésta tesis en los experimentos de aclimatación (véase mas adelante). Se puede proponer que la constante de disociación de la selenio-cisteína (Se-cys) con los residuos de HIS vecinos al sitio activo, contribuye al estado de protonación necesario para que la unión con el sustrato ocurra a lo largo del régimen térmico analizado, preservándose así la K_m y la estabilidad catalítica de la enzima.

Compensación Térmica y Lípidos

Otro aspecto que se debe considerar en la compensación de la actividad catalítica y las relaciones de pH-temperatura, es el de la participación de los lípidos en éstos procesos fisiológicos. Se

sabe que cambios en la temperatura y en el microambiente iónico celular por tiempos cortos, alteran el estado físico de los lípidos del sistema celular de membranas (Poly, 1997). Por otro lado, se sabe que la desyodasa 5'DI tiene un dominio transmembranal (Toyoda et al 1995b), y se localiza en el retículo endoplásmico rugoso (RER) y en el aparato de Golgi (AG), por lo que la estructura terciaria de la proteína, necesariamente se altera en respuesta a los cambios ocurridos en los lípidos. Sin embargo, la actividad enzimática se puede mantener debido a que presentan los grupos imidazol en las histidinas, así los resultados de cambios de estos dos parámetros en la actividad *in vitro* FIGURA 25, muestran que la actividad DI hepática de la lagartija se mantiene constante en el intervalo de 15 a 42°C, y se encuentra disminuida en los extremos analizados 0-4 y 42-50. En el extremo inferior (0 y 4°C), el empaquetamiento de los lípidos se encuentran en estado "todo trans", es decir sólido-cristalino, y en 42 y 50°C, los lípidos están en gel-cristalino. Además, en los extremos mencionados del intervalo utilizado las enzimas están próximas a una desnaturalización. Esto es, la relativa fluidez de una membrana depende de que unas zonas presenten una u otra fase, esta diferencia de fases es lo que permite que se den una gran cantidad de funciones en las membranas celulares (Gurr, 1991). Por lo que se puede suponer que al cambiar las condiciones de temperatura en el medio, cambiará toda la membrana presentando las fases que arriba se explicaron, dando por consiguiente una pérdida o falta total de la función. Aunado a lo anterior, los cambios en el pH, tienen influencia la conformación de las cabezas polares de los lípidos y también se debe afectar la relación estructural de los lípidos con los carbohidratos asociados.

Estos mismos resultados pueden dar un reflejo de lo que sucede en los diferentes regímenes térmicos que enfrentan estos animales a lo largo de un ciclo diurno, donde se da una constancia en la actividad enzimática.

En el ensayo de diferentes pH con una sola temperatura (FIGURA 13), que se usa para la caracterización enzimática, no es biológicamente realista, sin embargo, en el de múltiples pH y temperaturas presenta un esquema más cercano a las modificaciones que pueden presentar estos sistemas *in vivo*. En la FIGURA 26, los resultados preliminares mostraron que se mantiene la actividad tanto en los animales "normales" (no se sometieron a ningún régimen térmico), -FIGURA 25, discutida anteriormente-, como los aclimatados. En los aclimatados se da una conservación de la homeoviscosidad, mencionada arriba, en este ensayo se puede apreciar, que en todos los pH probados se da una actividad constante en el intervalo de 15 a 42 y en los extremos, por ejemplo, con 50°C la actividad disminuye, lo que se debe a que con estas condiciones de pH y temperatura las proteínas ya se encuentran parcial- o totalmente desnaturalizadas. Sin embargo, hay un cambio en la actividad específica al cambiar el pH, esto se puede deber a que se provoca cambios en la carga de los lípidos, que a su vez tienen efecto en el pK de los grupos imidazol (que cambian cuando están adyacentes a grupos con carga + o - de los lípidos) dando como resultado estos cambios en la actividad 5'DI hepática en los machos. Este efecto de cambio en las cargas de los lípidos adyacentes a las enzimas, también

pueden provocar cambios conformacionales en las enzimas, dando como resultado una estabilidad térmica en la actividad enzimática.

Constantes cinéticas *in vitro* e *in vivo* (aclimatación)

Se utilizaron tres diferentes temperaturas en la caracterización de las constantes verdaderas de Michaelis-Menten (Figuras 14-20), se observaron curvas típicas de saturación y un patrón cinético de tipo "ping-pong", lo que representa otro parámetro de comprobación del tipo enzimático presente en el tejido hepático de lagartijas. Los resultados (TABLA 10), muestran una relación directa entre la K_m y la temperatura, que claramente representa una compensación térmica inmediata, de tipo modulación térmica positiva (Hochachka y Somero, 1971, 1984). Donde la mayor afinidad (K_m) se presentó con 37°C , esta es una enzima que trabaja cerca de su $V_{m\acute{a}x}$, la cual tiene una capacidad de reserva mínima y por lo tanto es muy costosa para la célula. Las K_m de temperaturas menores fueron muy similares lo que representa una relación óptima entre la K_m y la concentración fisiológica de sustrato, esto es congruente con la temperatura preferida de esta especie que es de $18-20^\circ\text{C}$, donde se sabe que éstas lagartijas tienen un desarrollo óptimo.

Los valores de K_m verdaderas para lagartijas y ratas son muy similares a los obtenidos en las constantes aparentes y, en el caso de la rata, son iguales a los reportados en la literatura (Chopra, 1991). Las constantes de afinidad de lagartijas fueron de 2 a 4 veces mayores que las de rata. Lo anterior se relaciona con las concentraciones de sustrato y aunque en este trabajo no se evaluaron las concentraciones circulantes de tironinas, se puede hacer una correlación con los datos en la literatura. La lagartija *Sceloporus undulatus*, tiene de aproximadamente el doble de las concentraciones circulantes de tironinas (T_4 y T_3) que en la rata (John-Alder, 1991, Chopra, 1992). Respecto a las concentraciones de rT_3 no existen trabajos publicados en ningún reptil, pero se sabe que las concentraciones de esta hormona son proporcionales a la T_4 .

Durante los eventos de activación en la catálisis enzimática, la energía libre de los complejos enzima sustrato se incrementa, formando el complejo activado. A la diferencia entre la energía libre de los complejos enzima-sustrato inactivos y activos, se le denomina energía libre de activación (ΔG^\ddagger), el valor ΔG^\ddagger representa la energía libre de la reacción. Los estudios de termodinámica de activación catalítica, han revelado que los valores ΔG^\ddagger de las reacciones enzimáticas de ectotermos, son consistentemente menores (cientos de calorías/mol) que los correspondientes a las reacciones homólogas de aves y mamíferos. Estas diferencias que modifican notablemente las eficiencias catalíticas de enzimas homólogas, se deben a un aumento en la formación de enlaces débiles durante la generación de los complejos activados enzima-sustrato en los sistemas de ectotermos (al aumentar los enlaces débiles se incrementa la estabilidad termal y desciende la eficiencia catalítica). De hecho, la conformación de las enzimas de endotermos es más rígida que sus homólogos de ectotermos, lo cual

dificulta la formación de enlaces débiles, durante los procesos de activación catalítica, esto indica que durante los procesos de activación, la adición de los enlaces débiles se deben romper para que la enzima adopte la conformación necesaria para la catálisis (Low y Somero, 1974, Hochachka y Somero 1984). Lo anterior se aprecia en la eficiencia catalítica observada la cual en mamíferos fue de 2 a 3 veces mayor que en lagartijas (TABLA 10).

No solo las interacciones de enzima sustrato se ven afectados por la temperatura, sino que también las interacciones de enzima - modulador y enzima - cofactor (Hochachka y Somero, 1971), lo anterior se aprecia en las TABLAS 10 y 11.

En el análisis cinético de la aclimatación se utilizaron las mismas temperaturas descritas arriba, esto se hizo porque las condiciones de ensayo deben ser realistas, por lo menos una de las temperaturas de ensayo debe ser la temperatura a la que los animales se hayan aclimatado (Poly, 1997).

Los resultados cinéticos de la aclimatación fueron:

1) Con el intervalo de bajas temperaturas (15-19°C), exhibió el mismo comportamiento que en las cinéticas *in vitro* (realizadas con animales de campo sin aclimatar). Esta semejanza refleja el intervalo de temperatura de su medio y coincide con la temperatura preferida. Esta modulación térmica positiva, concuerda con lo reportado para diferentes sistemas enzimáticos de diferentes ectotermos, (Hochachka y Somero, 1969, 1971, 1984).

Con una temperatura por abajo de la mínima crítica, la Km se incrementa dramáticamente, estas formas enzimáticas son sumamente ineficientes. Sin embargo, después de un periodo de aclimatación, estas especies por lo general migran hacia temperaturas aún mas frías. Para explicar ésta paradoja, muchos estudios de aclimatación al frío sugieren que un mecanismo básico, no es la biosíntesis de mayores concentraciones de un mismo tipo de enzima, sino la biosíntesis de un nuevo tipo de enzima, probablemente en grandes cantidades, que están mejor adaptadas para realizar la catálisis a bajas temperaturas (Hochachka y Somero, 1969).

2) Con el intervalo de altas temperaturas resultó en una modulación térmica negativa -ver TABLA 11-, (menor temperatura, mayor afinidad (Km), con concentraciones fisiológicas constantes de sustrato), mediciones de HTs en el campo han mostrado que en el verano es cuando los niveles de T3 y T4 aumentan significativamente con respecto a los de invierno (John-Alder, 1984a), como a éstos animales se les mantuvo en temperaturas constantes de 32-37°C, se puede suponer que las concentraciones de HTs se mantuvieron constantes, además, cuando se aclimatan a temperaturas diferentes a las de su hábitat, esta modulación térmica representa la estrategia de la mayoría de los ectotermos.

Además de la compensación térmica, el comportamiento cinético indica que están presentes por lo menos dos formas o variantes enzimáticas cinéticamente diferentes. A) Las Km mínimas y B) Las Km óptimas. Respecto a las primeras se obtuvieron dos: una "fría" que presenta la mayor afinidad a los 15°C, mientras que la "caliente" tiene la mayor afinidad a los 37°C. A pesar de tener prácticamente la misma Km, no se excluye la posibilidad que se trate de dos formas o variantes diferentes.

Respecto a la adaptación evolutiva, es evidente que depende de cambios cualitativos más que cuantitativos, la temperatura en la que aparece la máxima afinidad (Km), se encuentra desplazada en el intervalo de temperatura de la especie y representa la mínima o máxima temperatura de su hábitat. La selección no favorece a la aparición de variantes con una Km extremadamente baja, ya que funciona cerca o a su V_{máx}, por lo que funcionalmente es muy "costosa" para la célula (Hochachka y Somero, 1984).

Podemos proponer que la acción combinada de A y B en todo el intervalo térmico que esta especie enfrenta en su hábitat natural generará una constancia en la actividad enzimática. Lo anterior se puede apreciar en las FIGURAS 21 y 22, donde se observó que la respuesta enzimática no varío en los intervalos térmicos utilizados y además no hay diferencias dimórficas (por el periodo de la colecta).

Los valores de Km máximas (mínimo valor) de las formas o isotipos "frías" y "calientes" fueron similares a los de rata (TABLA 10 y 11), por lo que es congruente con la conservación de la Km en diferentes especies, cuando ésta constante es evaluada bajo condiciones similares i.e. temperatura, pH, concentración de sustrato (Hochachka y Somero, 1984; Hazel, 1993, Poly, 1997).

Km mínimas

Los resultados mostraron que en la aclimatación al frío y en los animales del campo, el comportamiento de la Km es inverso a la temperatura. La aparente incongruencia entre los niveles de HTs que se sabe disminuyen con bajas temperaturas (John-Alder, 1984a) y los altos valores de la Km (mínima afinidad) con 15°C - TABLAS 10 y 11- (la Km se define como la concentración de sustrato específico al que una enzima produce la mitad de su velocidad máxima), se puede deber al transporte, esto es, las HTs son transportadas dentro de las células por medio de caveolas (sección 1.3), la integridad y función de las éstas caveolas, depende de la concentración de colesterol libre en la capa externa de las membranas plasmáticas (Fielding y Fielding, 1995). Por otro lado se sabe que en los reptiles, a diferencia de aves y mamíferos, los niveles de colesterol libre no se ven afectados por las bajas temperaturas, ni por el estado tiroideo i.e. hipo-, hipertiroidismo (Thapliyal, 1980), por lo que a pesar de bajar los niveles séricos de HTs, el sistema de transporte permanece siendo eficiente, esto conduce a una concentración mayor de HTs intracelulares, y a valores mayores en la Km. En el caso opuesto, con altas temperaturas, en reptiles al igual que endotermos, los niveles de colesterol disminuyen en el hipertiroidismo con alta temperatura (Jacob y Oommen, 1990), las concentraciones

séricas de HTs son mayores, sin embargo aunque el sistema de transporte no es tan eficiente, tendría mas o menos la misma concentración intracelular que en el frío, dando resultados similares (TABLA 11).

Por otro lado se sabe que los lípidos cambian sustancialmente de acuerdo a la temperatura (White y Somero, 1982; Gur, 1991) y al estado tiroideo (Hoch 1988). En la aclimatación al frío, se producen mayor cantidad de lípidos insaturados y una menor de saturados (aunque no todos los lípidos sufren los mismos cambios, por lo general se observa una heterogeneidad en la respuesta), la ventaja radica en el hecho de que un doble enlace introduce una curvatura de aproximadamente 30° en la cadena acilica, por lo que los ácidos grasos insaturados adoptan una conformación expandida, se empaquetan de una manera menos eficiente y consecuentemente poseen niveles de ruptura menores que sus homólogos saturados (Gur, 1991, Hazel, 1993). De esta manera se conserva la homeoviscosidad y por tanto las funciones relacionadas con la membrana (Wodke, 1981). Las temperaturas de 15 y 37° utilizadas en las cinéticas corresponden a los intervalos de temperaturas frías y calientes empleados, lo que lleva a resultados muy similares (TABLA 11). En éstos ensayos, al utilizar diferentes temperaturas, esto debe alterar la fluidez y propiedades de la membrana (*in vitro*), alterando a su vez a las enzimas lo que debe contribuir a las diferencias observadas en las características cinéticas.

Un aspecto que se debe considerar para suponer que las variantes enzimáticas estudiadas en éste trabajo no solo se deben a variaciones no genéticas (i.e. pH y cambios lipídicos explicados anteriormente), sino también a genéticas, es que la expresión de variantes térmicamente inducidas, se ha sugerido por muchos investigadores que se puede deber a un polimorfismo genético (Poly, 1997). En el género *Sceloporus grammicus* se sabe que presentan 78 diferentes cariotipos, (de 32 hasta 43-45 cromosomas), en el caso particular de *Sceloporus grammicus microlepidotus* (empleado en este trabajo), presenta un cariotipo 2n de 32-31 a 34-33 cromosomas, con loci polimórficos de con valores altos de 14.3 y con una heterocigocidad promedio muy baja, de 0.02 (Arévalo et al, 1991; Sites JR et al, 1992). Por otro lado, se sabe que las lagartijas utilizadas en este trabajo corresponden a una zona de transición de dos diferentes poblaciones (Méndez de la Cruz F, comunicación personal, manuscrito en preparación).

Nuestros resultados cinéticos obtenidos a partir de homogenados hepáticos están sujetos a una corroboración posterior a medida que se cuente con una mayor pureza de éstas enzimas, sin embargo, en un esfuerzo para identificarlas y en base a la clasificación de Somero (1995), los resultados del presente trabajo sugieren que se trata de variantes enzimáticas de tipo homólogo ortólogo (sección 3.1), esto es por las diferencias encontradas en los valores de Km, con las tres temperaturas empleadas y por el polimorfismo genético de éste género. En numerosos sistemas estudiados, se sabe que los homólogos ortólogos de especies adaptadas a diferentes regímenes térmicos, las respuestas de Km vs temperatura difieren en formas que reflejan la temperatura corporal absoluta y los intervalos de

temperaturas corporales que los animales normalmente enfrentan (Somero, 1995), lo que representa la versatilidad del genoma bajo diferentes presiones de selección, que permiten a esta especie adaptarse a diferentes hábitats geográficos.

Aunque nuestros resultados no permiten dar una sugerencia fundamentada, la generación de éstos homólogos ortólogos se pueden deber a diferentes mecanismos: 1) Procesos de cladogénesis y anagénesis; 2) Cambios puntuales en el gen en posiciones distantes al sitio activo de la enzima, (que en comparación con otras enzimas, como es el caso de LDH, sugieren que son cambios evolutivos muy recientes de 10,000 a 15,000 años), 3) Cambio conformacional del sitio activo. En base a un reporte reciente de LDH demostraron que ortólogos homólogos con secuencia idéntica de aa tienen diferencias en Km y estabilidad térmica debido al re - arreglo tridimensional de las moléculas (Fields y Somero 1997). En el caso de las desyodasas ya que presentan un dominio transmembranal, es posible que las variaciones en los lípidos influyan en la configuración terciaria de las desyodasas. 4) Variación genética co-dominante, en esta se expresan al mismo tiempo diferentes genes (y alelos de cada uno) dando como resultado una variación fenotípica, en éste caso probablemente se expresen de manera conjunta a la desyodasas otros alelos, por ejemplo epistáticos.

Podemos concluir que, las desyodasas exhiben formas o variantes enzimáticas térmicamente inducidas. Sin embargo, por las razones antes expuestas, probablemente se deban a cambios tanto genéticos y no genéticos (o epigenéticos), lo que merece estudios posteriores. En conjunto estas dos estrategias responden a la necesidad de una multiplicidad molecular que responda a las presiones de selección de los organismos, en una determinada situación fisiológica.

X CONCLUSIONES

- Se realizó la caracterización cinética de la vía ORD en el hígado de machos, hembras y hembras preñadas de lagartijas endémicas *Sceloporus grammicus m.*
- La vía ORD en el hígado de lagartijas se encuentra catalizada exclusivamente por una desyodasa tipo I (DI), y no presenta a la tipo II.
- Las lagartijas presentan la actividad DI hepática más alta reportada para vertebrados.
- La actividad DI hepática es dimórfica y estacional, siendo mayor (en la $V_{m\acute{a}x}$), en los machos.
- En términos operacionales i.e. Sustrato preferencial (rT_3), requerimientos de cofactor (mmol/L) y susceptibilidad a inhibidores (PTU y GTG), la DI hepática de lagartijas exhibe propiedades similares a las reportadas para mamíferos.
- Las constantes cinéticas verdaderas, evaluadas con tres temperaturas diferentes, exhibieron una relación directa entre K_m y temperatura, lo que representa una compensación térmica inmediata de tipo modulación positiva.
- La enzima DI hepática de lagartijas presenta una estabilidad catalítica un amplio intervalo térmico (15 a 42°C) y de pH (5 a 9).
- La respuesta enzimática DI a las temperaturas de aclimatación no vario entre los sexos.
- Las constantes cinéticas verdaderas variaron de acuerdo a las temperaturas, sugiriendo la aparición de formas y/o variantes enzimáticas termo-inducidas o termo-dependientes.
- El análisis cinético de la enzima DI en los animales aclimatados mostró que el comportamiento enzimático es significativamente diferente en los dos intervalos térmicos estudiados. Este comportamiento, junto con los resultados de ensayos de temperatura-pH sugieren que se trata de formas y/o variantes enzimáticas térmicamente dependientes que pueden tener ya sea una base genética o epigenética.
- Los resultados de los animales aclimatados sugieren que se están expresando conjuntamente dos o mas formas o variantes enzimáticas termo-dependientes.

XI PERSPECTIVAS

Los resultados de ésta tesis abren una nueva línea de investigación en el estudio y comprensión de la fisiología tiroidea en vertebrados. En este contexto, nuestros hallazgos plantean diversas preguntas pertinentes tanto al campo particular de la fisiología evolutiva de la familia de las desyodasas, como al mas general del control y regulación de la función tiroidea en los vertebrados ectotermos. Así, y utilizando enfoques y herramientas analíticas que van desde la biología molecular hasta la fisiología experimental se pueden plantear los siguientes proyectos:

- Análisis de la composición lipídica de microsomas hepáticos y la correlación con la estructura - función de las desyodasas.
- Clonación y Secuenciación del mRNA que codifica para DI en el hígado de diferentes miembros del género *Sceloporus*.
- Correlación de diferentes cariotipos con la expresión de variantes enzimáticas en procesos de aclimatación.
- Relación entre la actividad desyodativa y los diferentes tipos de reproducción en lacértidos (ovíparos, ovovivíparos y vivíparos). Dentro de los vivíparos relacionar la fisiología tiroidea (tipos de desyodasas) con cada uno de los tipos de placenta, ya que exhiben pseudoplacentas (coriovitelinas y/o corioalantoideas) y placentas verdaderas.

XI BIBLIOGRAFIA

- Alberts B, Bray D; Lewis J. 1991. La Biología Molecular de la Célula. Interamericana. México: 350-360.
- Anderson RGW. 1993. Potocytosis of Small Molecules and Ions by Caveole. Trends in Cell Biology. 3. 3: 69-72.
- Andrews RM, Méndez de la Cruz FR and Villagrán Santa Cruz M. 1997. Body Temperatures of Female *Sceloporus grammicus*: Thermal Stress or impaired Mobility?. Copeia (1): 108-115.
- Anguiano B, Aceves C, Navarro L, Ramirez 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: 1: 504-508.
- Arévalo E, Porter CA, González A, Mendoza F, Camarillo JL, and Sites JW. 1991. Population cytogenetics and evolution of the *Sceloporus grammicus* complex (Iguanidae) in central Mexico. Herpetological Monographs 5: 79-115.
- Avery RA .1976. Thermoregulation, metabolism and social behaviour in Lacertidae. En Bellaris A d'A and Cox CB (eds) Morphology and Biology of Reptiles. Academic Press Inc, pp 245-259
- Baldwin J and Hochachka PW. 1970. Functional Significance of Isoenzymes in Thermal Acclimatization. Acetylcholinesterase from Trout Brain. Biochem. J. 116: 883 - 887.
- Becker KB, Stephens KC, Davey JC, Schneider MJ and Galton VA. 1997. The type 2 and 3 Iodothyronine Deiodinases Play Important roles in coordinating development in *Rana catesbeiana* tadpoles. Endocrinology 138: 2989-2997.
- Behne D, Kyriakopoulos A, Meinhold H and Kohrle J. 1990. Identification of Type I Iodothyronine 5'Deiodinase as Selenoenzime. Biochem. Biophys Res. Commun. 173: 1143-1149.
- Bellabarba, D, Peterson RE, Sterling K. 1968. An Improved Method for Chromatography of Iodothyronines. J. Clin Endocr. Met. 28: 305-307.
- Berry M J, Kieffer JD; Harney JW and Larsen PR. 1991a. Selenocysteine Confers the Biochemical Properties Characteristic of the Type I Iodothyronine Deiodinase. The Journal of Biological Chemistry. 266. 22: 14155-14158.
- Berry MJ ,Kieffer JD and Larsen PR. 1991b. Evidence that Cysteine, not Selenocysteine, is in the Catalytic Site of Type II Iodothyronine Deiodinase. Endocrinology. 129. 1: 550-552.
- Berry MJ, Banu L; Larsen PR. 1991c. Type I Iodothyronine Deiodinase is a Selenocystein-Containing Enzyme. Nature. 349: 438-440.
- Berry MJ and Larsen PR. 1992a. The Role of Selenium in Thyroid Hormone Action. Endocrine Reviews. 13. 1: 207-209.
- Berry MJ. 1992b. Identification of essential histidine residues in rat type I iodothyronine deiodinases. J Biol Chem 267:18055-18059.
- Berry MJ, Banu LH and Larsen PR 1993. Functional characterization of the eukaryotic SECIS element which direct selenocysteine insertion at UG codons. EMBO J 12:3315-3322.
- Brand MD, Couture P, Else PL; Withers KW and Hulbert AJ. 1991. Evolution of energy metabolism. Biochem J. 275:81-86.
- Bradford MM. 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.
- Callard IJ; Giannoukos G; Charnock-Jones DS; Benson S, Paolucci M. 1994. Hormone regulation of vitellogenin genes and the evolution of viviparity. Perspectives in Comparative Endocrinology: 325-332.
- Chandola-Saklani A; Kar A. 1990. Evidence for the role of thyroxine as a hormone in the physiology of a Lizard. Gen Comp Endocrinol 78: 173-179.
- Chester-Jones I, Ingleton PM and Phillips JG. 1987. Hormonal Control of Metabolism. En Chester-Jones I, Ingleton PM & Phillips JG (eds). Fundamentals of Comparative Endocrinology. Plenum Press. New York and London. Capitulo 18: 623-660.
- Chiu KW and Lynn WG.1970. The role of the thyroid in skin-shedding in the shovel-nosed snake *Chionactis occipitalis*. Gen Comp Endocrinol 14: 467-474.
- Chiu KW and Wong KL. 1973. Radioiodine metabolism in the snake thyroid. Acta Endocr (Kbh) Suppl 177: 156
- Chiu KW and Wong CC. 1975. Deiodinating Activity of the Liver and Kidney Tissue in the Reptile. Comp Biochem Physiol. 52B, 359-361.

- Chiu KW and Wong CC. 1977. Peripheral Iodotyrosine De-Iodinating Activity of the non-mammalian species. *Acta Endocrinol. Suppl.* 212: 169.
- Chiu KW and Wong CC 1984 Circulating Iodothyronines in snakes. *Abs 7TH Int. Congr. Endocrinol. Excerpta Medica*: 434 p.
- Chopra IJ, Wu SY, Nakamura Y, Solomon DH. 1978. Monodeiodination of 3,5,3'Triiodothyronine and 3,5',5'Triiodothyronine to 3,3'Diiodothyronine *in vitro*. *Endocrinology*. 102: 1099-1106.
- Chopra, IJ. 1991. New Insights into Thyroid Hormone Deiodination. En Wu SY (ed.) *Thyroid Hormone Metabolism*. Blackwell Scientific Publication. Oxford. 3: 41-54.
- Chopra, IJ. 1992. Nature, Sources, and Relative Biological Significance of Circulating Thyroid Hormone En Werner and Ingbar's *The Thyroid*. 6th edition. L. Braverman, MD; R.D. Utiger, M.D. eds. JB Lippincott Co. Philadelphia. Chpt 7: 127-143.
- Cossins AR, Prosser CL. 1978. Evolutionary adaptation of membranes to temperature. *Proc Natl Acad. Sci. USA*. 75: 2040-2043
- Cossins AR, Bowler K. 1987. *Temperature Biology of Animals*. London: Chapman & Hall, 399pp.
- Crawford DL, Constantino HR, Powers DA. 1989a. Lactate dehydrogenase-B cDNA from the teleost *Fundulus heteroclitus*: Evolutionary Implications . *Mol. Biol. Evol* 6: 369-383.
- Crawford DL, Powers DA, 1989b. Molecular basis of evolutionary adaptation at the lactate dehydrogenase- B locus in the fish *Fundulus heteroclitus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 9365-9369.
- Crawford DL, Powers DA. 1992. Evolutionary adaptation to different thermal environments via transcriptional regulation . *Mol. Biol. Evol.* 9: 8069-813
- Crawshaw WLI. 1979. Responses to rapid temperature change in vertebrate ectotherms. *Am. Zool.* 19: 225-237
- Crawshaw LI, Wollmuth LP, O'Connor CS, Rausch RN and Simpson L. 1990. Body temperature regulation in vertebrates: comparative aspects and neuronal elements. En *Thermoregulation: Physiology and Biochemistry*, Schönbaum E and Lomax P (eds). Pergamon Press. New York. 209 pp.
- Darras VM, Mol K, Visser TJ, Kühn ER. 1994. Presence of high and low-Km iodothyronine deiodinases in different vertebrate classes. En 17th European Congress of Comparative Endocrinology. Cordoba Spain 5-10: 121
- Davey JC, Becker KB, Schneider MJ, St Germain DL and Galton VA 1995. Cloning of a cDNA for the type II iodothyronine deiodinase *JBC* 270: 26786-26789.
- Davis, PJ. 1992. Cellular Actions of Thyroid Hormones En: Werner and Ingbar's *The Thyroid* 6th edition. L. Braverman, MD; R.D. Utiger, M.D. eds. JB Lippincott Co. Philadelphia. Cph 9: 190-203.
- De Haën C and Neurath H. 1976. Biochemical and Biophysical Perspectives in Marine Biology. Vol. 3 DC Malins and JR Sargent eds. Academic Press. New York.
- Deme D, Virion A, Pommier J. 1985. NADPH-Dependent Generation of H₂O₂ in a Thyroid Particulate Fraction Requires Ca²⁺. *FEBS Lett.* 186: 107-109.
- Dummont, JE, Vassart G , Refetoff S. 1989. *Thyroid Disorders in The Metabolic Basics of Inherited Disease II*. Mc Graw Hill. New-York. Chap 73: 1843-1879.
- Dunlap KD. 1995. Hormonal and Behavioral Responses to food and water deprivation in a lizard (*Sceloporus occidentalis*): Implications for assessing stress in a natural population. *J. Herpetology*.29(3): 345-351.
- Dupy, C, Virion A, Pommier J. 1986. Solubilization and Characteristics of the thyroid NADPH-dependent H₂O₂ generating system. *Biochem Biophys Res Commun.* 141: 839.
- Eckert R. 1988. Energética animal y relaciones con la Temperatura. en *Fisiología Animal. Mecanismos y Adaptaciones*. Interamericana Madrid. Cap. 16: 556-606.
- Edelhoeh H. 1965. The Structure of Thyroglobulin and Its Role in Iodination. *Recent Prog Horm Res.* 21 1.
- Emmerson CH, Bambini G, Alex S, Castro E, Roti E and Braverman LE. 1988. The Effect of Thyroid Dysfunction and Fasting on Placenta Inner Ring Deiodinase Activity in the Rat. *Endocrinology*. 122. 3: 809-816.
- Engler DA, Burger G. 1984. The Deiodination of Iodothyronines and of Their Derivates in Man. *Endocrine Rev.* 5: 151-184.
- Erickson LE, Fredriksson G. 1990. Phylogeny and Ontogeny of the Thyroid Gland. *The Thyroid Gland* Raven, New York: 1-35.
- Erickson LE. 1981. Exocytosis and Endocytosis in the Thyroid Follicle Cell. *Mol Cell Endocrinol.* 22: 1-7.

- Eyeson KN. 1970. The role of the thyroid in Reproduction of the west african lizard, *Agama agama*. Gen Comp. Endocrinol. 15:1-5.
- Faramarz IB. 1988. Thyoid Thermogenesis: Regulation of (Na⁺ + K⁺)-Adenosine Triphosphatase and Active Na, K Transport. Amer. Zool. 28: 363-371.
- Farwell AP, Lynch RM; Okuliez WC; Comi A and Leonard J. 1990. The Actin Cytoskeleton Mediates the Hormonally Regulated Translocation of Type I Iodothyronine 5'Deiodinase in Astrocytes. The Journal of Biological Chemistry. 256. 30: 18546-18553.
- Feake HC, Oppenheimer JH. 1995. Thermogenesis and Thyroid Function. Annu. Rev. 15:263-91.
- Fekkes D, Hennemann G, Visser TJ. 1982. Inhibition of Iodothyronine Deiodinase by Phenolphthalein Dyes. FEBS Lett. 137: 40-44.
- Fekkes D, Hennemann G, Visser TJ. 1983. Properties of detergent dispersed iodothyronines 5 and 5' deiodinase activities from rat liver. Biochem Biophys Acta 742:324-333.
- Fenton B, Orozco A, Valverde-R C. 1997. Kinetic characterization of skin inner-ring deiodinative pathway and its correlation with circulating levels of reverse tri-iodothyronine in developing rainbow trout. J Endocrinol. 154: 547-554.
- Fielding PE and Fielding CJ. 1995. Plasma membrane caveolae mediate the efflux of cellular free cholesterol. Biochemistry 34: 14288-14292.
- Fields PA and Somero GN. 1997. Amino acid sequence differences cannot fully explain interspecific variation in thermal sensitivities of gobiid fish A4-Lactate dehydrogenases (A4-LDHS). J. Exp Biol 200:1839-1850.
- Fischer DA, Klein AH. 1981. Thyroid Development and Disorders of Thyroid Function in the Newborn. N Engl. J Med. 304: 702.
- Fleury F et Naulleau G. 1987. Relations entre l'hivernage et la reprise des activités endocrines, testiculaire et thyroïdienne, chez *Vipera aspis* L (reptilia, Viperidae). Gen Comp Endocrinol 68: 271-277.
- Galton VA. 1988. Iodothyronine 5'-deiodinase activity in the amphibian *Rana catesbina* at different stages of the life cycle. Endocrinology. 122: 1746-1750.
- Gangong WF. 1976. Manual de Fisiología Médica. El Manual Moderno (5ª ed). México: 230-273.
- Garland T and Carter P. 1994. Evolutionary Physiology. Annu. Rev. Physiol. 56: 579 - 621.
- Graves JE, Somero GN. 1982. Electrophoretic and functional enzymic evolution in four species of eastern Pacific barracudas from different thermal environments. Evolution 36: 91-106.
- Graves JE, Rosenblatt RH, Somero GN. 1984. Kinetic and electrophoretic differentiation of lactate dehydrogenases of teleost species-pairs from the Atlantic and Pacific coast of Panama. Evolution 37:30-37.
- Greer MA, Murakami M and Tanaka K. 1991. Neuroendocrine relations in thyroid hormone metabolisms . En: Thyroid Hormone Metabolism. Regulation and Clinical Implication. Blackwell scientific Publications Inc. Boston: 321-335.
- Guerrero JM, Puig-Domingo M and Reiter J. 1988. Thyroxine 5'-deiodinase activity in pineal gland and frontal cortex: nighttime increase and the effects of either continuous light exposure or superior cervical ganglionectomy. Endocrinology 122: 236-241.
- Guillette LJ Jr and Casas-Andreu G. 1980. Fall reproductive activity in the high altitude mexican lizard *Sceloporus grammicus microlepidotus*. J. Herpetol. 14: 143-147.
- Gur MI, Harwood JL. 1991. Lipid Biochemistry. An Introduction. Chapman & Hall. London 406pp.
- Haldar-Misra C and Thapliyal JP. 1981. Thyroid in Reproduction of Reptiles. Gen and Comp Endocrinol. 43: 537-542
- Ham WA. 1975. Tratado de Histología. Interamericana. México: 261-279.
- Harris AR, Vgenakis AG, Braverman LE. 1979. Sex-Related differences in outer ring monodeiodination of thyroxine and 3,3',5'-triiodothyronine by rat liver homogenates Endocrinology. 1041: 645-652
- Hazel JR, Prosser CL. 1974. Molecular mechanisms of temperature compensation in poikilotherms. Physiol Rev. 54: 620-77.
- Hazel JR. 1993. Thermal Biology. En The Physiology of Fishes. Evans TH (ed) CRC Marine Sciences. Boca Raton USA pp: 427-467
- Hazel JR. 1995. Thermal Adaptation in Biological Membranes: Is Homeoviscous Adaptation the Explanation?. Annu. Rev. Physiol. 57: 19-42.
- Hennemann G and Docter R. 1990. Plasma Transport Proteins and Their Role in Tissue Delivery of Thyroid Hormones. En Greer MA (ed). The Thyroid Gland. Raven Press Ltd. New York Chp 6: 221-231.

- Hines SS, Philipp DP, Childress WF, Whitt GS. 1983. Thermal kinetic differences between allelic isozymes of malate dehydrogenase (MDH-B locus) of largemouth bass, *Micropterus salmoides*. *Biochem Genet.* 21:1143-1151.
- Hoch, H, Lewallen CG. 1974. Low Affinity Binding of Thyroxine to Proteins of Human Serum. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 38: 663-668.
- Hoch, FL. 1988. Lipids and Thyroid Hormones. *Prog. Lipid Res.* 27: 199-270.
- Hochachka PW and Somero GN. 1969. Biochemical Adaptation to the Environment. in *Fish Physiology. Vol VI. Environmental Relations and Behavior.* Hoar W.S. and D.J. Randall eds. Academic Press. San Diego: 99-156.
- Hochachka PW. 1971. Physiological and Biochemical Adaptation: An Introduction. *A. Zool, II:* 81 - 82.
- Hochachka PW and Somero GN. 1973. *Strategies of Biochemical Adaptation.* Philadelphia: W. B. Saunders.
- Hochachka PK; Somero GN. 1984. Temperature Adaptation. in *Biochemical Adaptation.* Princeton University Press, Princeton New Jersey. Chpt 11: 355-450.
- Huang TS, Chopra IJ, Beredo A, Solomon DH and Chua Teco GN. 1985. Skin Is an Active Site for the Inner Ring Monodeiodination of Thyroxine to 3, 3'5'-triiodothyronine. *Endocrinology.* 117. 5: 2106-2113.
- Hwang GC, Watabe S, Hashimoto K. 1990. Changes in carp myosin ATPase induced by temperature acclimation. *J. Comp. Physiol. B* 160:233-239.
- Ichikawa K and Hashikume K. 1991. Cellular Binding Proteins of Thyroid Hormones. *Life Sciences.* 49: 1513-1522.
- Imanaka T, Shibasaki M, Takagi M. 1986. A new way of enhancing the thermostability of proteases. *Nature* 324:695-697
- IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature (CBN). Recommendations 1976*. 1978. Nomenclature of Multiple Forms of Enzymes. *Eur. J. Biochem* 82: 1-3.
- Jacob V and Oomen VO. 1990. Intermediary Metabolism in a Lizard, *Calotes versicolor*: Role of Thyroid Hormones. *Gen Comp. Endocrinol.* 77: 324-336.
- John Alder HB. 1984a. Seasonal variations in activity, aerobic energetic capacities, and plasma thyroid hormones (T₃ and T₄) in an Iguanid lizard *J Comp Physiol B* 154:409-419.
- John Alder HB. 1984b. Reduced aerobic capacity and locomotory endurance in thyroid deficient lizards. *J. Exp. Biol.* 109: 175-189.
- John Alder HB. 1990. Thyroid Regulation of Resting Metabolic Rate and Intermediary Metabolic Enzymes in a Lizard (*Sceloporus occidentalis*). *Gen. Comp. Endocrinol* 77:52-62.
- John Alder HB. 1991. Interactive Effects of Thyroid and Experimental Location on Running Endurance, Tissue Masses and Enzyme Activities in Captive versus Field-Active Lizards (*Sceloporus undulatus*) *Gen Comp Endocrinol.* 81:120-132.
- Johnston CE, Eales JG. 1995. Effects of acclimation and assay temperature on outer- and inner-ring thyroxine and 3,5,3'-Triiodo-L-thyroxine deiodination by liver microsomes of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *J. Exp Zool* 272: 426-434.
- Joss B and John-Alder HB. 1989. Thyroxine 5'-Deiodinase activity in a lizard *Sceloporus occidentalis*. *Amer. Soc. Zool.* 44A:201
- Kaplan MM, Shaw EA. 1984 a. Type II Iodothyronine 5'-Deiodinase by Human and Rat Placenta *in vitro*. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.* 59. 2: 253-257.
- Kaplan MM. 1984b. The Role of Thyroid Hormone Deiodination in the Regulation of the Hypothalamo-Pituitary Function. *Neuroendocrinology.* 38: 254-260.
- Kaplan MM. 1986. Regulatory influences on iodothyronine deiodination in animal tissues. En Henneman G (ed). *Thyroid Hormone Metabolism.* Decker Inc. New York.: 231-253.
- Kaplan MM, Pan C, Gordon PR, Lee JK and Gilchrest BA. 1988. Human Epidermal Keratinocytes in Culture Convert Thyroxine to 3,5,3'-Triiodothyronine by Type II Iodothyronine Deiodination: A Novel Endocrine Function of the Skin. *J. Clinical Endocrinology and Metabolism.* 66. 4 :815-822.
- Kar A and Chandola-Saklain A. 1985a. Circulating thyroid hormone concentrations in relation to seasonal events in the male Indian garden lizard, *Calotes versicolor*. *Gen Comp Endocrinol* 60: 14-19.
- Kar A and Chandola-Saklain A. 1985b. Extrathyroidal Conversion of thyroxine to Triiodothyronine in *Calotes versicolor*. *Gen Comp Endocrinol* 59:214-218.
- Koehn RK. 1969. Esterase heterogeneity: Dynamics of a Population. *Science* 163: 943 - 944.
- Körhle J, Brabant G, Hesh RD. 1987. Metabolism of the Thyroid Hormones. *Hormone Res.* 26: 58-78.

- Köhrle J, Hesch RD, Leonard JL. 1992. Intracellular Pathways of Iodothyronine Metabolism. En Werner and Ingbar's The Thyroid. 6th edition. L. Braverman, MD; R.D. Utiger, M.D. eds. JB Lippincott Co. Philadelphia. Cph 8:144-189.
- Köhrle J. 1994. Thyroid hormone, deiodination in target tissues. A regulatory role for the trace element selenium?. *Exp Clin Endocrinol* 102:63-89.
- Larsen PR, Silva JE, Kaplan MM. 1981. Relationships Between Circulating and Intracellular Thyroid Hormones. Physiological and Clinical Implications. *Endocrinol Rev.* 87: 102-108.
- Larsen PR. 1991. Physiological signals regulating local activation of the thyroid hormone. En Wu SY (ed) thyroid hormone metabolism. Regulation and clinical implications. Blackwell Scientific publications. Boston pp:167-180
- Lazar MA 1993 Thyroid hormone receptors, multiple forms, multiple possibilities *Endocrinol Rev* 14:184-193.
- Leatherland JF. 1987. Thyroid Hormones and Reproduction. En *Hormones and Reproduction in Fishes Amphibians and Reptiles*. Eds.: Norris DO and Jones ER. Plenum Press: 411-431.
- Leonard JT, Visser TJ. 1986. Biochemistry of Deiodination. En *Thyroid Hormone Metabolism*. G. Hennemann (ed.). Marcel Dekker INC. New York and Basel Part II. Metabolism. Capítulo 6: 189-229.
- Leonard JL, Visser TJ. 1991. Biochemical Basis of Thyroid Hormone Deiodination. En Wu SY (ed). *Thyroid Hormone Metabolism*. Blackwell Scientific Publications Oxford. 1:1-28.
- Licht P and Denver RJ. 1988. Effects of TRH on Hormone Release from Pituitaries of the Lizard, *Anolis carolinensis*. *Gen Comp Endocrinol* 70: 355-362.
- Low PS and Somero GN. 1974. Temperature adaptation of enzymes: A proposed molecular basis for the different catalytic efficiencies of enzymes from ectotherms and endotherms. *Comp Biochem Physiol* 49B: 307-312.
- Low, MG. 1989. The glycosyl-phosphatidylinositol anchor of membrane proteins. *Biochim Biophys Acta* 988: 427-454.
- Luna M, Guzmán G, Navarro L, Sánchez de la Peña S and Valverde-R C. 1995. Circadian rhythm of the type II 5'-deiodinase activity in the rat hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Endocrine* 3: 597-601
- Lynn WG, McCormick JJ and Gregorek JC (1965) Environmental temperature and thyroid function in the lizard *Anolis carolinensis*. *Gen Comp. Endocrinol.* 5, 587-595.
- Lynn WG 1970. The Thyroid in "The biology of the Reptilia, C Gans ed. Academic Press.3:201-234.
- Maia AL, Berry MJ, Sabbag R, Harney JW and Larsen PR. 1995. Structural and Functional differences in the dio 1 gene in mice with inherited type I deiodinase deficiency. *Mol Endo* 9: 969-980
- Mandel SJ, Berry MJ, Kieffer JD, Harney JW, Warne RL and Larsen PR. 1992. Cloning and *in vitro* expression of the human selenoprotein, type I iodothyronine deiodinase. *J. Clin. Endocrinol & Metab.* 75: 1133-1139
- Matthews BW. 1987. Genetic and structural analysis of the protein stability. *Biochemistry* 26:6885-6888.
- Matthews BW. 1993. Structural and genetic analysis of protein stability. *Annu. Rev. Biochem* 62:139-160.
- Mc Farland W, Pough FH, Cade TJ, Heiser JB. 1987. *Vertebrate Life*. John Wiley & Sons. New York: 113-182.
- McNabb FMA. 1992. Mechanism of Action of Thyroid Hormones. En: *Thyroid Hormones*. Cap. 8, Prentice Hall. *Endocrinology Series*. New Jersey. 116: 135-160.
- Méndez de la Cruz, FR. 1989. Estudio comparativo de la reproducción tipología y aloenzimas de dos poblaciones cercanas de *Sceloporus grammicus* de la Sierra del Ajusco, México. Tesis Doctoral. Fac Ciencias, UNAM. México.
- Merritt RB. 1972. Geographic Distribution and Enzymatic Properties of Lactate dehydrogenase allozymes in the fathead minnow, *Pimephales promelas*. *Amer. Nat.* 106:174 - 184.
- Miyashita Kn Murakami M, Iriuchijima T, Takeuchi T, Mori M. 1995. Regulation of rat liver type I iodothyronine deiodinase mRNA levels by testosterone. *Mol Cell Endocrinol* 115: 161-167.
- Mol, JA, Docter R, Henneman G, Visser TJ. 1984. Modification of rat liver iodothyronine 5'-deiodinase activity with diethylpyrocarbonate and rose bengal; evidence for an active site histidine residue. *Biochem Biophys Res Commun* 120: 28-36
- Mol KA, Van der Geyten S, Darras VM, Visser TJ and Kühn. 1997. Characterization of Iodothyronine Outer Ring and Inner Ring Deiodinase Activities in the Blue Tilapia, *Oreochromis aureus*. *Endocrinology*. 128: 1787-1793.

- Nikodem VM, Petty KJ, Mitsuhashi T and Desvergne B. 1990. Structure and Mechanism of Action of Thyroid Hormone Receptors En: The Thyroid Gland. Monte A. Greer (ed.). Raven Press Ltd. New York Cap. 10: 301-321.
- Nishiyama M, Matsubara N, Yamamoto K, Iijima S, Uozumi T, Beppu T. 1986. Nucleotide sequence of the malate dehydrogenase gene of *Thermus flavus* and its mutation directing an increase in enzyme activity. J. Biol. Chem. 261: 14178-14183.
- Norris, DO. 1997. Vertebrate Endocrinology. (3th Ed.) Academic Press. New York. 634 pp.
- Nunez JJ. 1988. Mechanism of Action of Thyroid Hormones. En Hormones and Their Action Part I Elsevier Science Publishers. New York. Cap. 5: 61-79.
- Nunez J, Pommimer J. 1982. Formation of Thyroid Hormones. Vitam Horm. 89: 175-178.
- Ohmaya Y, Hayashi H., Kondo T, Kondo Y. 1987. Thyroglobulin Structure Necessary for Hormone Formation: Identification of a "donor" Residue in the Primary Structure of Bovine Thyroglobulin Subunit. Ann Endocrinol. 48: 141-145.
- Oppenheimer JH. 1992. Thyroid Hormone Action and the Molecular Level. En: Werner and Ingbar's The Thyroid. 6th edition. L. Braverman, MD; R.D. Utiger, M.D. eds. JB Lippincott Co. Philadelphia. Cap. 10: 204-224.
- Oppenheimer JH; Schwartz HL and Strait A. 1994. Thyroid Hormone Action 1994: The plot thickens. Eur. J Endocrinol 130: 15-24
- Orozco A, Silva JE 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.
- Patterson JW. 1992. Seasonal variation in field body temperatures of the lizard *Mabuya striata punctatissima*. Amphibia-Reptilia 13: 243-250.
- Place AR and Powers DA. 1979. Genetic variation and relative catalytic efficiencies: Lactate dehydrogenase B allozymes of *Fundulus heteroclitus*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 76: 2354-2358.
- Poly WJ. 1997. Nongenetic Variation, Genetic-Environmental Interactions and Altered Gene Expression I. Temperature, photoperiod, diet, pH and sex-related effects. Comp. Biochem. Physiol. 117A: 11-66.
- Porter CA and Sites JW. 1985. Normal disjunction in Robertsonian heterozygotes from a highly polymorphic lizard population. Cytogenet Cell Genet 39: 250-257.
- Powers DA, Ropson I, Brown DC, Van Beneden R, Cashon R et al, 1986. Genetic variation in *Fundulus heteroclitus*: geographic distribution. Am Zool. 26: 131-144.
- Powers DA, Smith M, Gonzalez-Villaseñor I, DiMichelle L, Crawford D, et al. 1993. A multidisciplinary approach to the selectionist/neutralist controversy using the model teleost, *Fundulus heteroclitus*. En D Futuyama, Antonovics J (Eds). Oxford Surveys in Evolutionary Biology,. Oxford: Oxford Univ. Press, 9:43-107.
- Prosser CL and Nelson DO. 1981. The role of nervous systems in temperature adaptation of poikilotherms. Ann. Rev. Physiol 43: 281-300.
- Prosser CL. 1991. Temperature in Environmental and Metabolic Animal Physiology. (4 ed.). Wiley-Liss Inc. Pub. New York. Chpt 3: 109-157.
- Rahn H, and Reeves RB. 1980. Protons, proteins and Claude Bernad's "Fixité du milieu intérieur" En: Coloque Claude Bernard (Fondation Singer-Polinac). Paris: Masson: 263-272
- Refetoff S, Robin NI and Fang VS. 1970. Parameters of Thyroid Function in Serum of 16 Selected vertebrates Species: A Study of PBI, Serum T4, Free T4, and the Pattern of T4 and T3 Binding to Serum Proteins. Endocrinology. 86: 793-805.
- Reeves RB. 1972. An imidazole alphasat hypothesis for vertebrate acid-base regulation: tissue carbon dioxide content and body temperature in bullfrogs. Respir. Physiol. 14: 219-236
- Reeves RB. 1977. The interaction of body temperature and acid-base balance in ectothermic vertebrates. Annu. Rev. Physiol. 39: 559-586
- Ribeiro RCF, Kushner PJ and Baxter JD. 1995. The nuclear hormone receptor gene superfamily. Ann Rev Med 46: 443-456.
- Rosenberg IN. 1991. An overview of thyroid hormone deiodinases. En Wu SY (Ed) Thyroid Hormone Metabolism. Regulation and Clinical Implications. Blackwell Scientific Publications, Boston. pp: 29-40
- Roti E, Fang SL, Green K, Emerson CH, Braverman LE. 1981. Human Placenta Is an Active Site of Thyroxine and 3,3',5'Triiodothyronine Tyrosyl Ring Deiodination. J. Clin Endocrinol. Metab. 53. 3: 498-501.

- Roti E, Fang SL, Braverman E and Emerson CH. 1982. Rat Placenta Is an Active Site of Inner Ring Deiodination of Thyroxine and 3,3',5-Triiodothyronine. *Endocrinology*. 110. 1: 34-37.
- Safran M, Leonard JL. 1991. Comparison of the Physicochemical Properties of the Type I and Type II Iodothyronine 5'-Deiodinase. *J. Biol. Chem.* 266: 3233-3238.
- Sanders JO P, Van der Geyten S, Kaptein E, Darras VM, Kühn ER, Leonard JL and Visser TJ. 1997. Characterization of a propylthiouracil-insensitive type I Iodothyronine deiodinase. *Endocrinology*. 138: 5153-5160.
- Santini F, Hurd RE and Chopra IJ. 1992 a. A Study of Metabolism of Deaminated and Sulfoconjugated Iodothyronines by Rat Placental Iodothyronine 5-Monodeiodinase. *Endocrinology*. 131. 4: 1689-1694.
- Santini F, Chopra IJ, Hurd E; Solomon DH and Chua Teco GN. 1992 b. A Study of the Characteristics of the Rat Placental Iodothyronine 5-Monodeiodinase: Evidence That It Is Distinct from the Rat Hepatic Iodothyronine 5'-Monodeiodinase. *Endocrinology*. 130. 4: 2325-2331.
- Schwantes MLB, Schwantes AR. 1982a. Adaptive features of ectothermic enzymes I. Temperature effects on the malate dehydrogenase from a temperate fish *Leiostomus xanthurus*. *Comp. Biochem. Physiol* 72B:49-58.
- Schwantes MLB, Schwantes AR. 1982b. Adaptive features of ectothermic enzymes II. The effects of acclimation temperature on malate dehydrogenase of the spot, *Leiostomus xanthurus*. *Comp. Biochem. Physiol* 72B:59-64.
- Segal JA, and Crawford DL. 1994. LDH-B enzyme expression: the mechanism of altered gene expression in acclimation and evolutionary adaptation. *A. Physiol. Soc.* R1150-R1153.
- Seljelid R, Reith A, Nakken KF. 1970. The Early Phase of Endocytosis in Rat Thyroid Follicle Cells. *Lab Invest.* 23: 595-598.
- Sharifi J and St Germain DL. 1992. The cDNA for the Type I Iodothyronine 5'-Deiodinase Encodes an Enzyme Manifesting Both High Km and Low Km Activity. *The Journal of Biological Chemistry*. 267. 1: 12539-12544.
- Sites JW Jr., Archie JW, Cole JC, Flores OV. 1992. A Review of Phylogenetic Hypothesis of the Genus *Sceloporus* (*Phrynosomatidae*): Implications for Ecological and Evolutionary Studies. *Bulletin of the American Museum of Natural History*. American Museum of Natural History. 213: 110 pp.
- Stidworthy J. 1974. *Snakes of the world*. Grosset & Dunlap Po. New York. pp 160
- Somero GN, Lowery MS, Roberts SJ. 1991. Compartmentation of animal enzymes: physiological and evolutionary significance. *Am. Zool* 31: 493-503.
- Somero GN. 1995. Proteins and Temperature. *Annu. Rev. Physiol*, 57:43-68
- St Germain D, Schwartzman RA, Croteau W, Kanamori A, Wang Z, Brown DD, Galton VA (1994a) A thyroid hormone-regulated gene in *Xenopus laevis* encodes a type III iodothyronine 5-deiodinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 7767-7771
- St Germain D (1994b) Biochemical study of type III iodothyronine deiodinase. In Sing-Yung W, Visser TJ (eds) *Thyroid Hormone Metabolism. Molecular Biology and Alternative Pathways* New York CRC Press, pp 45-65
- St Germain DL. 1994c. Iodothyronine Deiodinases. *TEM*. 5. 1: 84-85.
- St Germain DL (1995) Thyroid hormone deiodination. In Kohler PO (ed) *Current Opinion in Endocrinology and Diabetes*. Vol 2 No 5: 421-428.
- Sterling and Lazarous. 1977. The Thyroid and Its Control. *Ann Rev Physiol*. 39: 349-372.
- Sun. BC, Hamey JW, Berry M and Larsen PR. 1997. The role of active site cysteine in catalysis by type I iodothyronine deiodinase. *Endocrinology*. 138: 5452-5458.
- Takasu N, Shinichi O, Komiya I and Yamada T. 1992. Requirements of Follicle Structure for Thyroid Hormone Synthesis; Cytoeskeletons and Iodine Metabolism in Polarized Monolayer Cells on Collagen gel and Double Layered Follicle - Forming Cells. *Endocrinology*. 131. 3: 1143-1148.
- Tanabe OY, Ishii I and Tamaki Y. 1969. Comparison of Thyroxine-Binding Plasma Proteins of Various Vertebrates and Their Evolutionary Aspects. *Gen and Comp Endocrinol*. 13: 14-21.
- Teichert T and WE. Wodtke. 1992. Acyl-CoA: cholesterol acyltransferase and 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase in carp liver microsomes: effect of cold acclimation on enzyme activities and on hepatic and plasma lipid composition. *Biochem Biophys Acta* 1165: 211-21
- Thapliyal JP. 1980. *Thyroid in Reptiles and Birds*. En: *Hormones, Adaptation and Evolution*, Japan Sci. Soc. Press, Tokyo/Springer-Verlag, Berlin: 241-250.

- Tyurin VA, Kagan VE, Shukolyukov SA, Klaan NK, Nivikov NK, Azizova OA. 1979. Thermal stability of rhodopsin and protein-lipid interactions in the photoreceptor membranes of homeothermic and poikilothermic animals. *J. Therm Biol.* 4: 203-208
- Toyoda N, Harney JW, Berry MJ and Larsen PR (1984) Identification of critical amino acids for 3,5,3' triiodothyronine deiodination by human type 1 deiodinase based on comparative functional-structural analysis of the human, dog and rat enzymes. *JBC* 269: 20239-20334
- Toyoda N, Zavacki AM, Maia AL, Harney JW and Larsen PR (1995a). A novel retinoid X receptor independent thyroid hormone response element is present in the human type I deiodinase gene. *Mol Cell Biol* 15: 5100-5112.
- Toyoda N, Berry MJ, Harney JW and Larsen PR (1995b). Topological analysis of the integral membrane protein, type 1 iodothyronine deiodinase (D1) *JBC* 270:12310-12318.
- Valverde-R C; Aceves C y Navarro L. 1993. Hormonas a la medida y para toda ocasión. *Ciencia y Desarrollo.* 111: 22-33.
- Valverde-R c, Croteau W, LaFleur G, Orozco A and ST. Germain. DL. 1997. Cloning and Expression of a 5'-Iodothyronine deiodinase from the liver of *Fundulus heteroclitus*. *Endocrinology.* 138 (2): 642-648.
- Van Herle AJ, Vassart G, Dumont JE. 1979. Control of Thyroglobulin Synthesis and Secretion. *N Engl J Med.* 301: 239-242.
- Vandenhove E, Vandembroucke MF. 1980. Secretion of Thyroid hormones in The Thyroid Gland. Raven. New York:6
- Virion A, Courtin F, Pommier J. 1985. Spectral Characteristics and Catalytic Properties of Thyroid Peroxidase-H₂O₂ Compounds in the Iodination and Coupling Reactions. *Arch Biochem Biophys.* 242: 41
- Visser TJ, Kaplan MM, Larsen PR. 1982. Kinetic Evidence Suggesting Two Mechanism for Iodothyronine 5'-Deiodinase in Rat Cerebral Cortex. *Proc. Nalt. Acad. Sci.*79: 5080-5085.
- Visser TJ. 1988. Metabolism of Thyroid Hormone En: Hormones and Their Actions Part I. Elsevier Science Publishers BV (Biomedical Division). New York. Cap. 6: 81-103.
- Watt, WB. 1977. Adaptation at Specific Loci. I. Natural Selection on Phosphoglucose Isomerase of *Colias* butterflies: Biochemical and Population Aspects. *Genetics.* 87: 177 - 194
- Weintraub BD, Stannard BS, Manger JA.1985. Glycosylation and Posttranslational Processing of Thyroid-Stimulating Hormone: Clinical Implications. *Recent Prog Horm Res.* 41: 577-580.
- White FN and Somero G. 1982. Acid - Base Regulation and Phospholipid Adaptations to Temperature: Time Courses and Physiological Significance of Modifying the Milieu for Protein Function. *Physiol. Rev.* 62: 40-90
- Wilhoft, DC 1958. The effect of temperature on thyroid histology and survival in the lizard *Sceloporus occidentalis*. *Copeia* 4:265-276.
- Wilkinson AJ, Fersht AR, Blow DM, Carter P, Winter G. 1984. A large increase in enzyme-substrate affinity by protein engineering . *Nature* 307: 187-188.
- Wodtke E. 1978. Lipid Adaptation in liver mitochondrial membranes of carp acclimated to different environmental temperatures. *Biochimica et Biophysica Acta,* 529: 280-291.
- Wodtke E. 1981. Temperature adaptation of biological Membranes. Compensation of the molar activity of cytochrome c oxidase in the mitochondrial energy transducing membrane during thermal acclimation of the carp (*Cyprinus carpio L.*). *Biochem Biophys Acta* 640:710-720.
- Wolff J. 1964. Transport of Iodide and Other Anions in the Thyroid Gland. *Physiol Rev.* 44: 45-50.
- Wolff J. 1983. Congenital Goiter with Defective Iodine Transport. *Endocrinol Rev.* 4: 240-245.
- Wong CC and Chiu KW. 1987. Putative Thyroid Hormone Receptors in red Blood cells of some reptiles. *Gen Comp Endocrinol* 66: 434-440.
- Wong KL; Chiu KW; and Wong CC. 1975. The effect of thyroid hormones on the oxygen consumption of the liver tissue in the Squamate reptiles. *Comp Biochem Physiol* 52B: 355-358.
- Wong CC, Lam KY, Chiu KW. 1993. The extrathyroidal conversion of T₄ to T₃ in the striped racer snake, *Elaphe taeniura*. *J. Comp. Physiol. B* 163: 212-218.
- Yancey PH and Somero GN. 1978. Temperature dependence of intracellular pH: its role in the conservation of piruvate apparent Km values of vertebrate lactate dehydrogenases. *J.Comp. Physiol.* 125: 129-134.
- Yen PM and Chin WW. 1994. New advances in understanding the molecular mechanisms of thyroid hormone action. *TEM* 5:65-72.