

03040



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**CENTRO DE NEUROBIOLOGÍA**  
Campus UNAM-UAQ Juriquilla, Qro.

**CLONACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL DNA  
COMPLEMENTARIO (cDNA) QUE CODIFICA  
PARA LA DESYODASA TIPO 1 EN EL HÍGADO DE**  
*Fundulus heteroclitus*

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE**

**MAESTRA EN CIENCIAS  
(NEUROBIOLOGÍA)**

**P R E S E N T A**

**Q. B. PATRICIA VILLALOBOS AGUILERA**

**DIRECTORA DE TESIS**

**DRA. AUREA OROZCO RIVAS**

**Noviembre del 2000**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



# Universidad Nacional Autónoma de México

CENTRO DE NEUROBIOLOGÍA  
Campus UNAM-UAQ Juriquilla

Los Miembros del Jurado de Examen de Grado certificamos que la tesis elaborada por: Patricia Villalobos Aguilera, cuyo título es: "*Clonación y caracterización del DNA complementario (cDNA) que codifica para la desyodasa tipo 1 en el hígado de Fundulus heteroclitus*" se presenta como uno de los requisitos para obtener el grado de Maestría en Ciencias (Neurobiología) y cumple con los criterios de originalidad y calidad requeridos por la División de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Presidente

Dr. Manuel Salas Alvarado

Secretario

Dra. María de la Luz Navarro Angulo

Vocal (Tutor)

Dra. Aurea Orozco Rivas

Primer suplente

Dr. Alfredo Varela Echavarría

Segundo suplente

Dr. Juan Rafael Riesgo Escovar

Aprobado por el Comité Académico

Dr. Raúl G. Paredes Guerrero  
Coordinador del Programa



# CENTRO DE NEUROBIOLOGIA

CAMPUS UNAM-UAQ JURIQUILLA APDO. POSTAL 1-1141 QUERETARO, QRO. 76001

TELS.: (525) 623-40-16 Y 17, FAX: 623-40-17

## MAESTRÍA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)

UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**ING. LEOPOLDO SILVA GUTIÉRREZ**

Director General de  
Administración Escolar  
Presente

Por este conducto me permito comunicarle que he revisado a satisfacción el trabajo escrito intitulado: **"CLONACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL DNA COMPLEMENTARIO (cDNA) QUE CODIFICA PARA LA DESYODASA TIPO 1 EN EL HÍGADO DE *Fundulus heteroclitus*"**, que presentó como un requisito para la obtención del grado de Maestra en Ciencias (Neurobiología) la alumna **PATRICIA VILLALOBOS AGUILERA**, con número de cuenta 99827520, cuyo plan de estudios realizó íntegramente.

Por lo anterior, en mi carácter de miembro del jurado revisor de la tesis, doy mi voto aprobatorio para que la alumna pueda obtener el grado correspondiente.

Sin otro particular, agradezco la atención que se sirva prestar a la presente.

Atentamente  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
Campus UNAM-UAQ, Juriquilla, Qro. a 22 de agosto del 2000

**DRA. MARÍA DE LA LUZ NAVARRO ANGULO**

**Esta tesis fue dirigida por la Dra. Aurea Orozco Rivas, y se realizó en el Laboratorio de Fisiología Evolutiva a cargo del Dr. Carlos M. Valverde Rodríguez del Centro de Neurobiología.**

**Este trabajo fue apoyado por:**

**Beca de Maestría CONACYT No. 130769**

**Beca de DGEP No. exp. 59991002, No cuenta: 99827520**

**Beca UAQ No. convenio: 106/109**

**Proyecto CONACYT 34311N**

**Proyecto DGAPA-PAPIIT IN227599**

## **DEDICATORIAS**

*A DIOS: MI ESPERANZA Y MI FORTALEZA.*

*" EN QUIEN ESTÁN ESCONDIDOS TODOS LOS TESOROS DE LA SABIDURIA Y EL  
CONOCIMIENTO" COL 2:3*

**A mi esposo: Tony, gracias por tu amor y apoyo incondicional.**

**A mis hijos: Antonio, Ricardo y Alberto por su alegría y comprensión.**

**A mis padres: Juan y Aurora, a quienes debo todo lo que soy.**

**A mi hermana y mis sobrinos: Lupita, Fernando e Israel, gracias por estar a mi lado.**

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Dra. Aurea Orozco Rivas, porque gracias a su excelente asesoramiento, dedicación y paciencia fue posible este trabajo. Aurea, tu ejemplo de perseverancia y confianza me motivaron a salir adelante, muchas gracias por tu amistad.

Al Dr. Carlos Valverde Rodríguez por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio, por su disposición para compartir sus conocimientos y revisar esta tesis; pero sobre todo por su gran calidad humana.

Al comité tutorial por pulir este trabajo a lo largo de las evaluaciones semestrales.

Dra. Aurea Orozco Rivas  
Dr. Alfredo Varela Echavarría  
Dr. Mauricio Díaz Muñoz

A cada uno de los miembros del jurado, porque gracias a sus acertadas sugerencias se mejoró este trabajo.

Presidente	Dr. Manuel Salas Alvarado
Secretario	Dra. María de la Luz Navarro Angulo
Vocal	Dra. Aurea Orozco Rivas
Primer suplente	Dr. Alfredo Varela Echavarría
Segundo suplente	Dr. Juan Rafael Riesgo Escovar

Al Dr. Michael Jeziorski, porque sus asesorías contribuyeron notablemente a lograr la calidad de este trabajo.

A la Dra. Carmen Aceves Velasco, por compartir sus conocimientos y por su gran disposición para prestarnos equipo y materiales de su laboratorio. Dra. Tana, gracias porque su entusiasmo fue un gran apoyo para mí.

A mi compañera Angeles Zavala González, por estar a mi lado en los momentos difíciles, gracias por tus consejos, tu gran apoyo y amistad.

A todas las personas que contribuyeron a la culminación de este proyecto: Dra. Marcela Sánchez Álvarez, Biol. Rita Rojas Huidobro, M.C. Gabriel Nava, Dr. Marco Cajero, T.L. Felipe Ortiz Cornejo y a todos mis Maestros, mil gracias.

A los que creyeron que podía alcanzar esta meta: Q.F.B. Martha C. López Regalado, Dr. Eduardo Castaño Tostado, Q.M. José Merced Esparza García y M.C. Helga Geovannini Acuña.

## ÍNDICE

<b>Índice</b> .....	i
<b>Índice de Figuras</b> .....	v
<b>Índice de Cuadros</b> .....	viii
<b>Abreviaturas</b> .....	ix
<b>Resumen</b> .....	xii
<b>Abstract</b> .....	xiii
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>ANTECEDENTES</b> .....	2
<b>I. Hormonas Tiroideas</b> .....	2
<b>II. Desyodasa</b> .....	11
<b>A. Caracterización Bioquímica</b> .....	12
<b>B. Caracterización Molecular</b> .....	12
<b>III. Desyodasa Tipo 1 (D1)</b> .....	15
<b>A. Localización Tisular</b> .....	15
<b>B. Distribución Subcelular</b> .....	15
<b>C. Anillo que Desyoda</b> .....	16
<b>D. Substrato Preferencial</b> .....	17
<b>E. Patrón Cinético</b> .....	17
<b>F. Inhibidores</b> .....	17
<b>G. Cofactor</b> .....	18
<b>H. Probable Función</b> .....	20
<b>I. Regulación</b> .....	20



IV. Clonación del cDNA que Codifica para la Desyodasa tipo 1 .....	21
A. Importancia del Selenio .....	22
B. Gen de la Desyodasa Tipo 1 .....	25
V. Fisiología Tiroidea en Peces .....	26
A. Efectos de las Hormonas Tiroideas .....	26
B. La Glándula Tiroides .....	28
C. Eje Hipotálamo-Hipófisis-Tiroides .....	29
D. Hormonas Tiroideas .....	30
E. Metabolismo de Hormonas Tiroideas .....	30
F. Desyodación .....	31
1. La Controversia Una o Dos Vías Desyodativas .....	31
2. Caracterización de la D1-ORD y sus Inconsistencias .....	32
3. Caracterización de la Vía IRD .....	32
4. Reevaluación de la Vía ORD en Salmónidos y sus Sorpresas .....	33
5. Regulación .....	34
G. Clonación del cDNA de las Desyodasas .....	35
<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....</b>	<b>37</b>
<b>HIPÓTESIS .....</b>	<b>39</b>
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>40</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>41</b>
I. Animales .....	41
II. Extracción de RNA Total .....	41
III. Obtención del DNA Complementario (RT) .....	43
IV. Amplificación del cDNA de la Desyodasa Tipo 1 (RT-PCR Touchdown) .....	44

V. Purificación de DNA de una Matriz de Gel de Agarosa .....	47
VI. Vector .....	48
VII. Ligación .....	49
VIII. Transformación .....	50
IX. Tamizaje de Colonias Blancas por PCR.....	52
X. Purificación del Plásmido (miniprep) .....	53
XI. Secuenciación de los Fragmentos Clonados .....	54
XII. Amplificación Rápida de los Extremos del cDNA (5' y 3' RACE) .....	55
A. 3' RACE .....	56
B. 5' RACE .....	57
XIII. Análisis de las Secuencias .....	57
<b>RESULTADOS</b> .....	59
I. Extracción de RNA Total .....	59
II. Obtención del DNA Complementario (RT).....	60
III. Amplificación del cDNA con los Oligos Degenerados (RT-PCR Touchdown)	60
IV. Identificación de Clonas con Fragmentos Amplificados en el RT-PCR	
Touchdown .....	61
V. Secuenciación de los Fragmentos Clonados (DI-1/DI-2) .....	62
VI. Extensión hacia el Extremo 3' del cDNA (3' RACE) .....	63
A. PCR para Identificar Clonas con el Fragmento DI-4/PA141 .....	65
B. Secuenciación del Fragmento DI-4/PA141 .....	66
VII. Amplificación hacia el Extremo 5' del cDNA (5' RACE) .....	68
A. PCR para Identificar Clonas con el Fragmento PA141/DI-6 .....	69

B. Secuenciación de Plásmidos con los Fragmentos Generados por el 5' RACE .....	71
<b>DISCUSIÓN</b> .....	80
I. Tamaño del Mensajero .....	80
II. Codón de Inicio de la Traducción ATG .....	82
III. Señal de Poliadenilación .....	83
IV. Codón TGA que Codifica para Se-Cys .....	84
V. Secuencia que Recodifica el Codón para la Selenocisteína Durante la Traducción (SECIS) .....	85
VI. La Selenoproteína Clonada es una Desyodasa Homóloga a las D1s de otros Vertebrados .....	87
A. Presencia del Residuo de Selenocisteína (Se-Cys) .....	88
B. Presencia de las Cisteínas en las Posiciones 124 y 194 .....	89
C. Presencia de los Residuos de Histidina en las Posiciones 158 y 174 .....	90
D. Presencia de la Fenilalanina en la Posición 65 .....	91
E. Análisis de Hidropatía .....	91
VII. El Hígado de <i>F. heteroclitus</i> Expresa la Desyodasa Tipo 1 .....	92
<b>CONCLUSIONES</b> .....	94
<b>PERSPECTIVAS</b> .....	95
<b>REFERENCIAS</b> .....	96

## ÍNDICE DE FIGURAS

1.	Principales efectos de las hormonas tiroideas en vertebrados .....	2
2.	Estructura de las hormonas tiroideas .....	4
3.	Morfología de la glándula tiroides en algunos vertebrados .....	4
4.	Folículos tiroideos en la glándula tiroides de mamíferos .....	5
5.	Biosíntesis de las hormonas tiroideas .....	6
6.	Regulación de la síntesis y secreción de hormonas tiroideas .....	8
7.	Vías metabólicas de la tiroxina .....	10
8.	Productos obtenidos a partir de la monodesyodación secuencial de tiroxina .....	11
9.	Mecanismo de reacción de la 5'D1 y efecto de la inhibición por PTU y por yodoacetato .....	18
10.	Cinética de reacción determinada para la D1 .....	19
11.	Características de los mRNAs de la D1 .....	23
12.	Secuencia de aminoácidos de la D1 en diferentes especies .....	24
13.	Estructura de los folículos tiroideos en peces .....	28
14.	Localización de los folículos tiroideos en teleósteos .....	29
15.	Pasos generales para la clonación y caracterización del cDNA que codifica para la desyodasa tipo1 en el hígado de <i>F. heteroclitus</i> .....	42
16.	Procedimiento para la obtención de RNA total del hígado de <i>F. heteroclitus</i> .....	43
17.	Síntesis de cDNA .....	45
18.	Obtención del fragmento inicial del cDNA que codifica para la D1 (RT-PCR Touchdown) .....	47
19.	Procedimiento para la purificación de DNA en gel de agarosa .....	48

20. Promotores, sitios de restricción y sitio de inserción en el pGEM-T .....	49
21. Ligación del cDNA en el plásmido pGEM-T .....	50
22. Preparación de células competentes .....	51
23. Transformación de células competentes .....	52
24. Posición de los iniciadores M13ff y M13rev empleados para PCR de colonias.....	53
25. Pasos generales del miniprep .....	54
26. Determinación de la secuencia de DNA por el método de Sanger .....	56
27. Amplificación de los extremos 3' y 5' del cDNA de la D1 de <i>F. heteroclitus</i>	58
28. Fragmentos obtenidos del RT-PCR Touchdown con los oligos degenerados DI-1/DI-2 .....	61
29. Identificación de clonas con fragmentos DI-1/DI-2 .....	62
30. Secuenciación de plásmidos con los fragmentos DI-1/DI-2 .....	64
31. Secuencia de nucleótidos y aminoácidos del fragmento inicial del cDNA (139 pb) que codifica para la desyodasa tipo 1 en el hígado de <i>F. heteroclitus</i> .....	65
32. Resultados del 3'RACE .....	66
33. Bandas obtenidas del PCR para identificar clonas con el fragmento generado del 3'RACE .....	67
34. Secuencia parcial del fragmento DI-4/PA141 .....	68
35. Secuencia completa de nucleótidos y de aminoácidos del fragmento DI-4/PA141 .....	69
36. Comparación de la estructura secundaria del elemento SECIS identificado en el mRNA de <i>F. heteroclitus</i> con el de la tilapia, la rata y el humano .....	70
37. Productos amplificados por el 5'RACE .....	71
38. Productos del PCR de colonias con fragmentos del 5'RACE .....	71
39. Secuencia parcial del extremo 5' del mensajero .....	72

40. Resultados del 5'RACE e identificación de clonas con el fragmento PA141/DI-7 .....	73
41. Secuencia de nucleótidos del cDNA que codifica para la D1 en el hígado de <i>F. heteroclitus</i> .....	74
42. Alineación del cDNA de la D1 de <i>F. heteroclitus</i> con los elementos SECIS identificados en el cDNA de la D1 del riñón de tilapia .....	75
43. Secuencia de nucleótidos y secuencia de aminoácidos deducida del cDNA que codifica para la D1 en el hígado de <i>F. heteroclitus</i> .....	76
44. Porcentaje de identidad de la secuencia de aminoácidos de la D1 de <i>F. heteroclitus</i> con la reportada en otros vertebrados .....	77
45. Comparación de la secuencia de aminoácidos de la desyodasa tipo 1 de <i>F. heteroclitus</i> con la reportada en otros vertebrados .....	78
46. Patrón de hidrofobicidad de la D1 de <i>F. heteroclitus</i> , tilapia y rata .....	79
47. Esquema de las características estructurales del cDNA clonado .....	80
48. Mecanismo propuesto para la incorporación de la selenocisteína .....	87
49. Secuencia de aminoácidos del sitio activo de las desyodasas tipo 1, 2 y 3 .	89

## ÍNDICE DE CUADROS

1. Principales efectos de las yodotironinas en mamíferos .....	3
2. Características de las desyodasas en mamíferos .....	13
3. Características moleculares y genómicas de las desyodasas .....	14
4. Tironinas circulantes en salmones migratorios .....	27
5. Parámetros cinéticos de la vía ORD en el hígado de trucha arcoiris, y <i>F. heteroclitus</i> respecto a los observados en mamíferos .....	34
6. Secuencia de nucleótidos del iniciador PA142 (oligo dT) empleado para la síntesis de cDNA.....	44
7. Secuencias de aminoácidos reportadas para la D1 en diferentes vertebrados .....	46
8. Características de los oligos degenerados DI-1 y DI-2 .....	46
9. Resultados de la extracción de RNA total del hígado de <i>F. heteroclitus</i> .....	59
10. Tamaño de los cDNAs clonados para la D1 en vertebrados .....	81

## ABREVIATURAS

<b>cDNA</b>	Ácido desoxirribonucleico complementario
<b>cDNAs</b>	Ácidos desoxirribonucleicos complementarios
<b>5'D</b>	5' desyodasas
<b>5D</b>	5 desyodasas
<b>D1</b>	Desyodasa tipo 1
<b>D1-mRNA</b>	Ácido ribonucleico mensajero que codifica para la desyodasa tipo 1
<b>D1-cDNA</b>	Ácido desoxirribonucleico complementario para la desyodasa tipo 1
<b>D1s</b>	Desyodasas tipo 1
<b>D2</b>	Desyodasa tipo 2
<b>D2s</b>	Desyodasas tipo 2
<b>D3</b>	Desyodasa tipo 3
<b>D3s</b>	Desyodasas tipo 3
<b>DIT</b>	Diyodotirosina
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>Ds</b>	Desyodasas
<b>DTT</b>	Ditiotreitol
<b>fD1</b>	Secuencia de aminoácidos de la D1 hepática de <i>F. heteroclitus</i>
<b>GSH</b>	Glutación reducido
<b>GSSG</b>	Glutación oxidado
<b>GTG</b>	Tioglucosa aúrica
<b>HT</b>	Hormonas tiroideas
<b>HHT</b>	Eje hipotálamo-hipófisis-tiroides



<b>IRD</b>	Desyodación del anillo interno
<b>K<sub>i</sub></b>	Constante de inhibición
<b>K<sub>m</sub></b>	Constante de Michaelis-Menten
<b>MIT</b>	Monoyodotirosina
<b>mRNA</b>	Ácido ribonucleico mensajero
<b>mRNAs</b>	Ácidos ribonucleicos mensajeros
<b>ORD</b>	Desyodación del anillo externo o fenilo
<b>ORF</b>	Marco abierto de lectura o región codificante
<b>PCR</b>	Amplificación en cadena de la polimerasa
<b>PTU</b>	Propiltiouracilo
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>3'RACE</b>	Amplificación rápida hacia el extremos 3'
<b>5'RACE</b>	Amplificación rápida hacia el extremos 5'
<b>rT<sub>3</sub></b>	Triyodotironina reversa
<b>RT</b>	Técnica de transcripción inversa
<b>RT-PCR</b>	Transcripción inversa y amplicación en cadena de la polimerasa
<b>Se</b>	Selenio
<b>Se-cys</b>	Aminoácido Selenocisteína
<b>SECIS</b>	Secuencia de inserción para Se-cys
<b>T<sub>2</sub></b>	Diyodotironina
<b>T<sub>3</sub></b>	Triyodotironina
<b>T<sub>4</sub></b>	Tiroxina o tetrayodotironina
<b>TBG</b>	Globulina transportadora de hormonas tiroideas
<b>TBPA</b>	Prealbúmina transportadora de hormonas tiroideas

<b>TGA</b>	Codón para inserción de selenocisteína
<b>TgB</b>	Tiroglobulina
<b>TPO</b>	Tiroperoxidasa
<b>TRE</b>	Elemento que responde a hormonas tiroideas (secuencias de DNA localizadas en regiones reguladoras de los genes blancos).
<b>TRH</b>	Tiroliberina
<b>TRs</b>	Receptores a hormonas tiroideas
<b>TR<math>\beta</math></b>	Receptor $\beta$ a hormonas tiroideas
<b>TR<math>\beta</math>s</b>	Receptores $\beta$ a hormonas tiroideas
<b>TSH</b>	Hormona Estimulante de la Tiroides o tiotropina
<b>TTR</b>	Transtiretina
<b>Vmax</b>	Velocidad máxima

## RESUMEN

Las hormonas tiroideas (HT) ejercen su efecto en todos los tejidos, y son indispensables para el desarrollo y la regulación del metabolismo energético. La glándula tiroides produce el 100 % de los niveles circulantes de tiroxina ( $T_4$ ), el 20 % de triyodotironina ( $T_3$ ) y menos de 1 % de triyodotironina reversa ( $rT_3$ ). Mediante la desyodación de la  $T_4$  se produce la hormona bioactiva ( $T_3$ ) o la inactiva ( $rT_3$ ) que requiere cada célula. Esta reacción es catalizada por las desyodasas (Ds) y bioquímicamente se han identificado tres tipos enzimáticos: D1, D2 y D3. Hasta ahora el estudio de la desyodación en peces apoya la idea de que estos vertebrados expresan D1 en el riñón. Recientemente, en nuestro laboratorio se reportó actividad D1 y D2 en el hígado de *Fundulus heteroclitus*. Este hallazgo coloca al hígado de este pez como un excelente modelo para el estudio de la función y regulación de la expresión de estas enzimas. También en nuestro laboratorio se clonó el cDNA que codifica para la D2 en el hígado de este pez; y en el presente trabajo se describe la clonación y caracterización del cDNA que codifica para la D1 en el mismo. Utilizando la técnica de RT-PCR y oligos degenerados diseñados a partir de las secuencias de aminoácidos conservados de la D1 en otros vertebrados, se amplificó un fragmento inicial correspondiente a la región del sitio activo de la D1. A partir del fragmento inicial y utilizando 5' y 3' RACEs, aislamos los fragmentos restantes del cDNA. En ellos se identificaron los rasgos característicos de los cDNAs reportados para la D1 en otros vertebrados, tales como: 1) la presencia del codón UGA que codifica para el aminoácido selenocisteína (Se-Cys); 2) en la región 3' no traducida del cDNA se identificó la secuencia SECIS necesaria para la inserción de Se-Cys y 3) la secuencia de aminoácidos obtenida de este cDNA mostró 48 % de identidad con las D1s reportadas en otros vertebrados, y 34 % y 38 % con las secuencias de la D2 y de la D3 respectivamente. Con todas estas evidencias proponemos que el cDNA clonado codifica para la selenoproteína D1 en el hígado de *Fundulus heteroclitus*. Los hallazgos de este estudio sugieren que la enzima D1 ha conservado sus rasgos estructurales por ser fundamental en la regulación de la bioactividad de las HT.

## ABSTRACT

Under normal conditions the thyroid gland secretes 100 % of  $T_4$ , 20 % of  $T_3$  and less than 1 % of the circulating  $rT_3$ . As judged by its affinity to thyroid hormone (TH) receptors, it is known that  $T_4$  acts as a prohormone, and that its activation or inactivation depends on its peripheral conversion by deiodination. This metabolic pathway is organ-specific and represents a fine regulation of TH supply, depending on the need of each cell. Deiodination is catalyzed by deiodinases which, through a tissue specific modulation, activate or inactivate TH. Three deiodinases have been biochemically characterized. Both deiodinases D1 and D2 catalyze the activating pathway, while inactivation is catalyzed by the D3 deiodinase. These enzymes have been apparently highly conserved in terms of structure and function throughout vertebrate evolution. It is now known that deiodinases are selenoproteins that contain an in-frame TGA codon which codifies for the modified aminoacid selenocysteine, located in the active site as well as a selenocysteine insertion sequence (SECIS) element located in the 3' UTR. Biochemical studies have shown that the vertebrate adult liver expresses D1 activity exclusively. Despite the reported lack of presence of D1 in teleostean liver, we have shown hepatic co-expression of D1 and D2 deiodinase activities in some teleosts. Here we report the cloning of the D1 cDNA from the liver of *Fundulus heteroclitus*. D1 conserved sequences from other vertebrates allowed the design of degenerate primers specific to the active site of the enzyme. RT-PCR was used to amplify specific cDNA fragments from *F. heteroclitus* liver, which were extended using standard cloning techniques to isolate the full length cDNA. The full length D1 clone is ~1.3 kb. This cDNA presents the D1 characteristic features: 1) an in frame TGA codon that encodes selenocysteine, 2) the consensus selenocysteine insertion sequence (SECIS) 220 pb upstream of the poly(A) tail, and 3) 48 % identity at the aminoacid level with other D1s. The current data suggest that D1 has been highly conserved in evolution by its importance in the regulation of thyroid hormone action.

## INTRODUCCIÓN

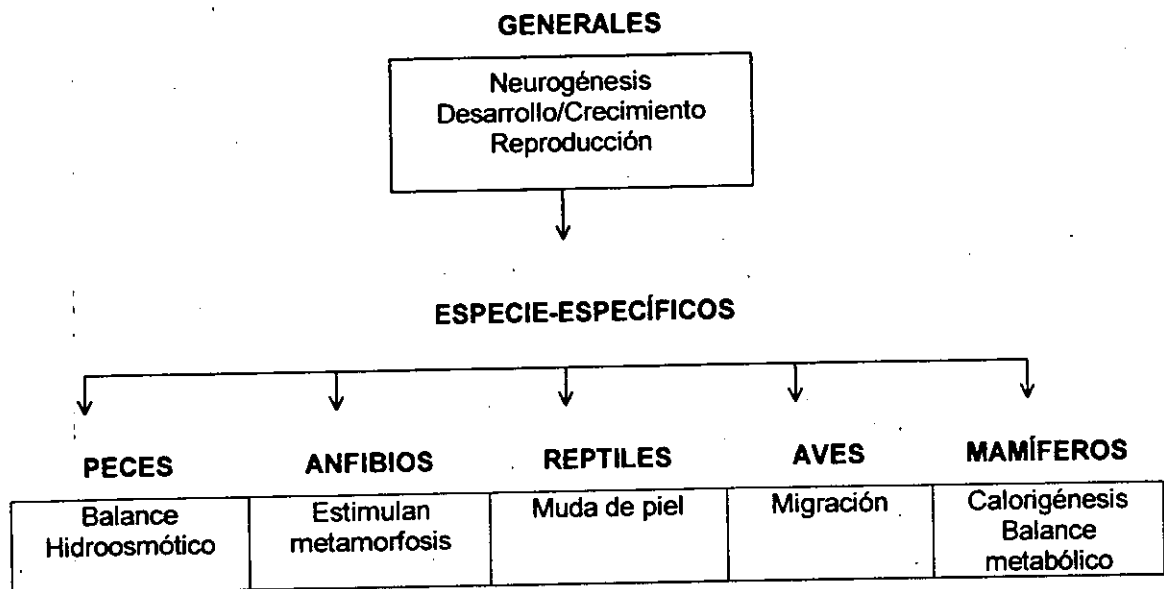
Sin duda el estudio de los factores que regulan la desyodación periférica es uno de los retos en la investigación de la fisiología tiroidea contemporánea. En efecto, en los últimos 20 años se ha descubierto que la desyodación periférica de las hormonas tiroideas (HT) determina, a nivel órgano-específico, la bioactividad de estas hormonas. Sin embargo, y no obstante la importancia y el interés que estos hallazgos han generado, hasta la fecha poco se ha avanzado en el entendimiento de los mecanismos que participan en la regulación de la actividad de las desyodasas. En este contexto, y en base a los antecedentes específicos que se describen más adelante, este trabajo consistió en la clonación y caracterización del ácido desoxirribonucleico complementario (cDNA) que codifica para la desyodasa tipo 1 (D1) en el hígado del pez teleósteo *F. heteroclitus*. Lo anterior forma parte de un proyecto más amplio encaminado a estudiar la regulación de la vía de activación de las HT, utilizando como modelo experimental algunas especies de teleósteos.

Aún cuando la expresión de la D1 se ha detectado en el hígado de las especies de mamíferos, aves y reptiles estudiadas, en el hígado de algunos peces teleósteos sólo se había reportado actividad desyodativa tipo 2 (D2). Por esta razón se había propuesto que la D1 no se expresaba en el hígado de los teleósteos. Recientemente en nuestro laboratorio se caracterizó bioquímicamente la actividad desyodativa D1 y D2 en el hígado de *F. heteroclitus* y se encontraron algunas diferencias en la cinética de la D1 y D2 con respecto a su contraparte hepática en mamíferos. Estas diferencias funcionales se pueden ahora analizar utilizando las técnicas de la biología molecular. En efecto, el análisis de la estructura del DNA complementario (cDNA) y de la secuencia de aminoácidos que codifica, permitirá identificar las bases estructurales que podrían explicar las diferencias bioquímicas observadas entre la D1 del hígado de *F. heteroclitus* con la de otros vertebrados.

## ANTECEDENTES

### I. HORMONAS TIROIDEAS

Entre la amplia variedad de mensajeros químicos que los seres vivos utilizan para coordinar e integrar sus funciones, las HT ocupan un lugar muy relevante. En los vertebrados estas biomoléculas además de ser indispensables para la neurogénesis, el desarrollo, el crecimiento y la reproducción, participan de manera especie específica en procesos fisiológicos tan variados como los que se indican en la figura 1.



**Figura 1. Principales Efectos de las Hormonas Tiroideas en Vertebrados**

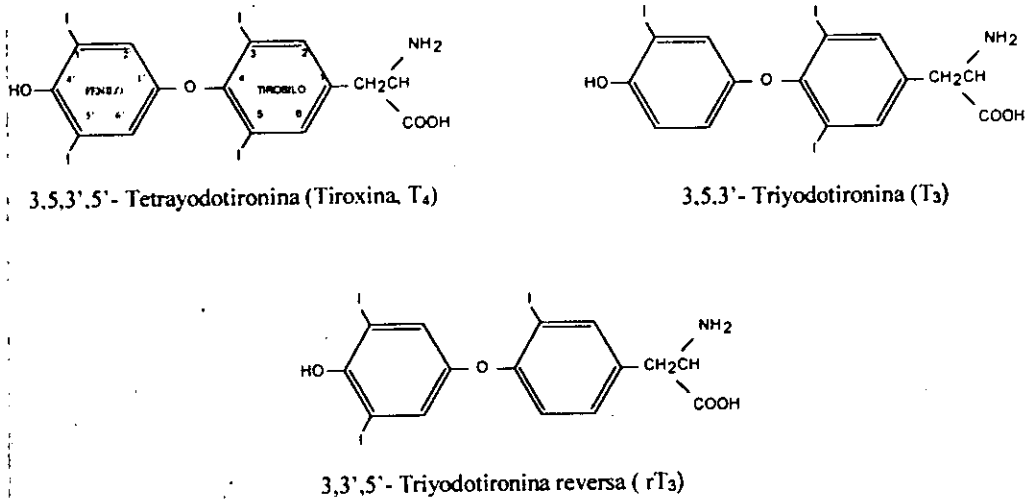
Los mamíferos han sido las especies en donde más se ha estudiado la fisiología tiroidea. Actualmente se reconoce que en este grupo de vertebrados, las HT participan en un gran número de eventos fisiológicos actuando en prácticamente todas las células del organismo (Cuadro 1).

La estructura química de las HT es homóloga en todos los vertebrados estudiados hasta la fecha (Fig. 2).

**Cuadro 1. Principales Efectos de las Yodotironinas en Mamíferos**

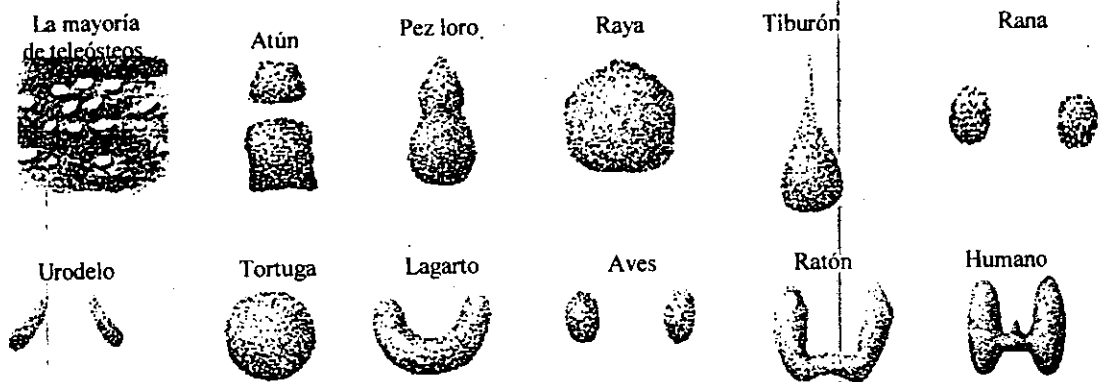
<b>CALORIGÉNESIS</b>	Favorecen la glucólisis y el consumo de oxígeno. Estimulan la síntesis de las subunidades $\alpha$ y $\beta$ de la bomba $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPasa dependiente. Controlan síntesis de termogenina (UCP) en la grasa parda.
<b>METABOLISMO DE VITAMINAS</b>	Participan en la síntesis de vitamina A. Inhiben la fosforilación de tiamina y aumentan la demanda de otros componentes del complejo B
<b>CRECIMIENTO Y DIFERENCIACIÓN CELULAR</b>	<b>ESTIMULAN:</b> Crecimiento somático. Producción de GH. Maduración del sistema nervioso. Osificación epifisaria.
<b>SISTEMA NERVIOSO CENTRAL</b>	Esenciales (período crítico) en desarrollo y maduración neuronal. Modulan la velocidad de conducción-excitabilidad y regulan patrones conductuales.
<b>METABOLISMO DE CARBOHIDRATOS</b>	<b>AUMENTAN:</b> Absorción y utilización de glucosa. Glucogenólisis. Degradación de insulina.
<b>SISTEMA CARDIOVASCULAR</b>	Efecto inotrópico y cronotrópico. Sinergismo con catecolaminas.
<b>METABOLISMO DE LÍPIDOS</b>	<b>ACELERAN:</b> Síntesis, degradación y excreción biliar de colesterol y ácidos biliares.
<b>SISTEMA HEMATOPOYÉTICO</b>	Participan en la síntesis de hemoglobina. Absorción de $\text{B}_{12}$ y ácido fólico.
<b>METABOLISMO PROTEÍNICO</b>	Anabolismo/catabolismo (dependiendo de los niveles).
<b>METABOLISMO MUSCULAR</b>	Inhiben conversión de creatina a fosfocreatina.
<b>METABOLISMO HIDROELECTROLÍTICO</b>	Aumentan filtración glomerular. Diuresis de sodio extracelular.
<b>FUNCIÓN HIPOFISIARIA</b>	Regulan la síntesis y secreción de las hormonas TSH, GH, FSH, LH y PRL.
<b>FUNCIÓN REPRODUCTORA</b>	<b>GÓNADAS:</b> Necesarias para la diferenciación gonadal. <b>GLÁNDULA MAMARIA:</b> Esenciales para la diferenciación funcional de primordios alveolares. Forman parte del complejo galactopoyético.
<b>APARATO GASTROINTESTINAL-HÍGADO</b>	<b>REGULAN:</b> Velocidad tránsito intestinal. Depleción glucógeno hepático.

TSH, hormona estimulante de la tiroides; GH, hormona del crecimiento; FSH, hormona foliculo estimulante; LH, hormona luteinizante; PRL, prolactina (Gómez et al. 1990).



**Figura 2. Estructura de las Hormonas Tiroideas.** Las HT son moléculas que se caracterizan por contener yodo y su precursor es el aminoácido tiroxina, por lo cual son llamadas yodotironinas. Al anillo interno o tirosilo se le llama así por conservar el residuo de alanina característico de la tiroxina. El anillo externo se identifica como fenilo por el grupo p-hidroxilo que presenta. La posición de los átomos de yodo en los anillos determina la bioactividad de estas hormonas. Por desyodación de la T<sub>4</sub> se puede obtener T<sub>3</sub> ó rT<sub>3</sub>, por lo que se considera a la T<sub>4</sub> como una prohormona. La T<sub>3</sub> es la molécula responsable de la mayoría de los efectos mientras que la rT<sub>3</sub> carece de actividad.

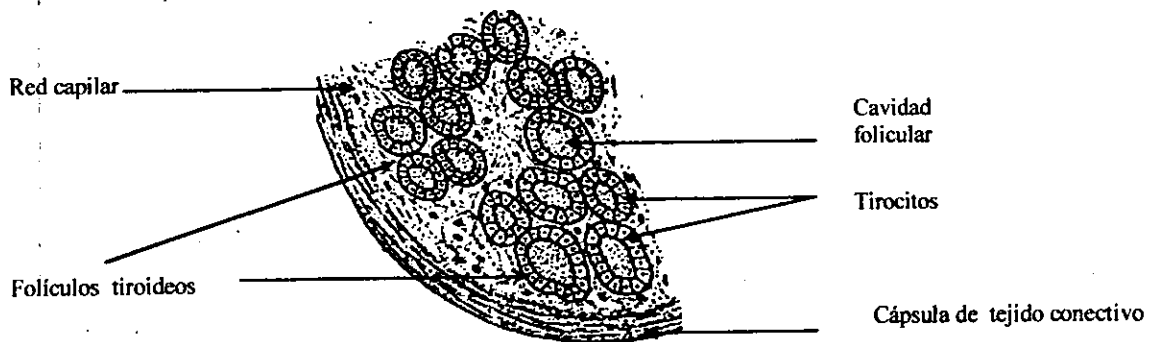
Las hormonas tiroideas son producidas en la glándula tiroides. En los mamíferos la tiroides se encuentra en la parte anterior del cuello rodeando parcialmente la tráquea. La forma de la glándula en los vertebrados depende de la agregación folicular y es característica de cada clase (Fig. 3).



**Figura 3. Morfología de la Glándula Tiroides en Algunos Vertebrados.** (Gorbman & Bem, 1983).



La glándula tiroidea está formada por un gran número de folículos encapsulados en tejido conectivo rodeados de una red capilar muy densa. La unidad anatómica y funcional de la glándula tiroidea es el folículo tiroideo. El folículo es una estructura esférica que está formada por una monocapa de células epiteliales (tirocitos) que rodean a la cavidad folicular (Fig. 4).

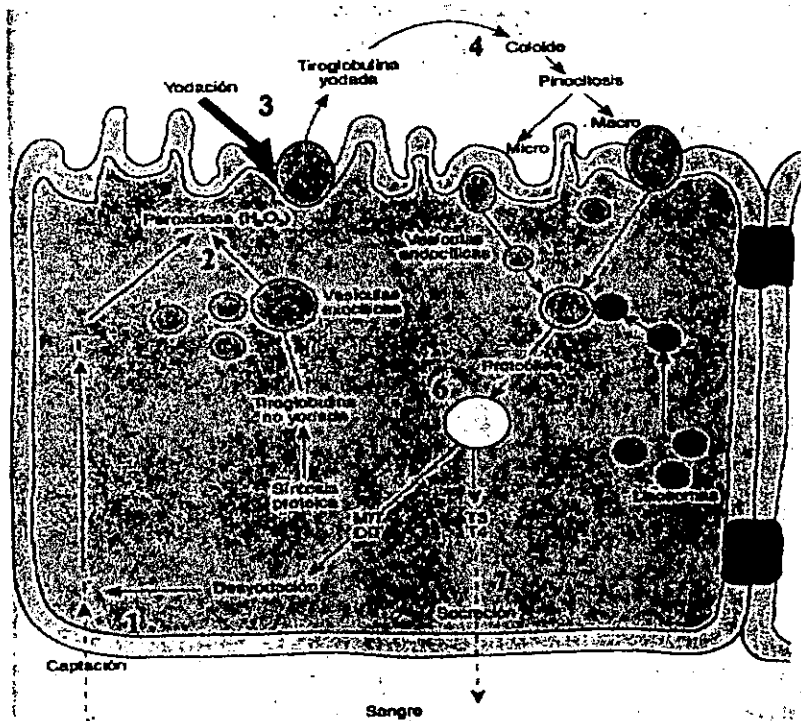


**Figura 4. Folículos Tiroideos en la Glándula Tiroidea de Mamíferos.** Se observan: los folículos tiroideos, los tirocitos y la cavidad folicular.

El tirocito es una célula especializada en la captación de yodo. Este proceso está mediado por un mecanismo energético denominado genéricamente bomba de yodo (DeGroot & Taurog, 1979; Guyton, 1992; Escobar et al.1992). La cavidad folicular de los folículos tiroideos está llena de un material viscoso llamado coloide y constituye un reservorio de las hormonas tiroideas secretadas por los tirocitos. El coloide está constituido principalmente por una glucoproteína específica de la glándula tiroidea llamada tiroglobulina (TgB) que sirve de soporte para la síntesis y almacenamiento de las HT. A diferencia del resto de las células endócrinas conocidas en los vertebrados, las células tiroideas o tirocitos, exhiben una organización que es característica de los tejidos exócrinos. En efecto, estas células epiteliales cuyo principal producto de síntesis proteínica es la TgB, transportan vectorialmente a esta proteína hacia la cavidad folicular apical del folículo tiroideo. A lo largo de esta vía de transporte la TgB se pliega, se dimeriza y

es glucosilada, fosforilada y sulfatada. Además, entre estas modificaciones postranscripcionales, la molécula de TgB es yodada. Esta organización del yodo en la molécula de TgB rica en residuos de tirosina, juega un papel fisiológico dual: mantiene las reservas de dicho micronutriente, y es a la vez un paso crucial en la síntesis de las hormonas tiroideas.

Así, para la biosíntesis de HT se requiere: el aporte dietético del yodo y el transporte activo de éste al interior del tirocito, la yodación de los residuos de tirosina en la tiroglobulina y el acoplamiento entre yodotirosinas para formar yodotironinas (Fig. 5).



**Figura 5. Biosíntesis de las Hormonas Tiroideas.** 1) captación o transporte activo del yodo al interior del tirocito. 2) Por acción de las peroxidases el ión yoduro ( $I^-$ ) es convertido en "yodino" ( $I^+$ ) o ácido hipoyodoso (HIO), una forma reactiva capaz de unirse o "yodar" a los residuos de tirosina presentes en la tiroglobulina (TgB). 3) La tiroperoxidasa (TPO) cataliza la yodación de la TgB en la membrana apical y se forman las yodotirosinas: monoyodotirosina (MIT) y diyodotirosina (DIT). 4) MIT y DIT permanecen unidas a TgB en el coloide constituyendo un reservorio de precursores de HT. 5) En respuesta a la demanda de HT el coloide es endocitado y las vesículas endocitadas se fusionan con lisosomas. 6) En los fagolisosomas resultantes se forman las yodotironinas mediante el acoplamiento de dos residuos yodotirosilo (MIT o DIT) y se liberan de la TgB por proteólisis. En esta reacción de acoplamiento participa el peróxido de hidrógeno y la TPO, y depende de la estructura terciaria de la TgB. 7) Las HT al llegar a la membrana basal se liberan aparentemente por difusión. Parte de la  $T_4$  puede ser recapturada y desyodada hacia  $T_3$ . El yodo liberado en forma de MIT y DIT también se reutiliza. (Hove & Broucke, 1980).

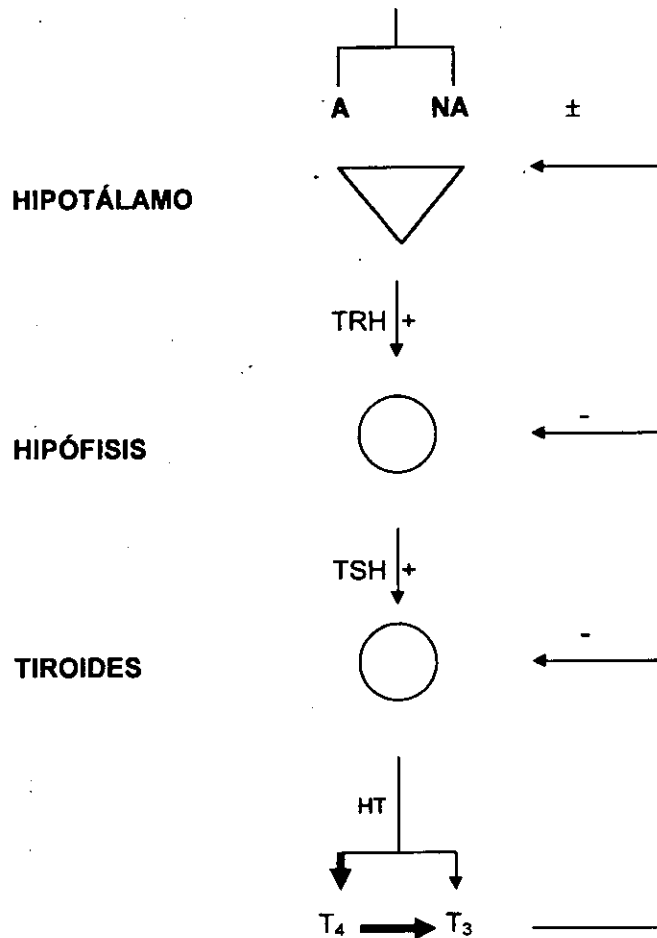
En condiciones normales la glándula tiroides secreta al torrente sanguíneo el 100 % de la tiroxina ( $T_4$ ) circulante, el 20 % de la triyodotironina ( $T_3$ ) y menos del 1 % de la triyodotironina reversa ( $rT_3$ ) y de la diyodotironina ( $T_2$ ) (Escobar et al. 1992). El 80 % restante de la  $T_3$  es producido por desyodación periférica (Larsen et al. 1998).

La síntesis y secreción de las HT elaboradas por la glándula tiroides está sujeta a un estricto sistema de control y regulación. Este sistema se denomina eje hipotálamo-hipófisis-tiroides (eje HHT), y en él intervienen una cascada de señales nerviosas y endócrinas (neurohumorales) para el control de la síntesis y secreción de la tirotropina u hormona estimulante de la tiroides (TSH) por los tirotrópos en la adenohipófisis. La cascada culmina en los tirocitos de la glándula tiroides en donde la TSH controla y regula la síntesis y liberación de HT a la circulación (Fig. 6).

Por su naturaleza hidrofóbica las HT se unen a proteínas transportadoras para mantenerse en la circulación. Las proteínas séricas sintetizadas en el hígado que juegan un papel importante en el transporte de las hormonas tiroideas son: la globulina transportadora de HT (TBG); la albúmina (Alb); la prealbúmina transportadora de HT (TBPA) y la transtiretina (TTR). En humanos la proteína que presenta mayor afinidad por las HT es la TBG (Robbins et al. 1978; Robbins & Bartalena, 1986). De la cantidad total de HT circulantes sólo una pequeña fracción queda libre (0.018-0.016 %). La unión de las hormonas tiroideas con las proteínas transportadoras no sólo determina su biodisponibilidad, también influye sobre su metabolismo, excreción y actividad biológica (Robbins, 1991; McNabb, 1992). Las HT unidas a proteínas son metabólicamente inactivas y se considera que constituyen un sistema de almacenamiento.

Para ejercer sus efectos fisiológicos, las HT tienen que penetrar al interior celular y unirse a sus receptores. Aún cuando las HT son moléculas hidrofóbicas, éstas no penetran a las células por simple difusión. Recientemente se ha sugerido la participación de un mecanismo celular activo para la internalización de las HT. Se trata de un mecanismo especial de endocitosis mediado por receptor, conocido como potocitosis, que es de alta afinidad, capacidad limitada y parcialmente

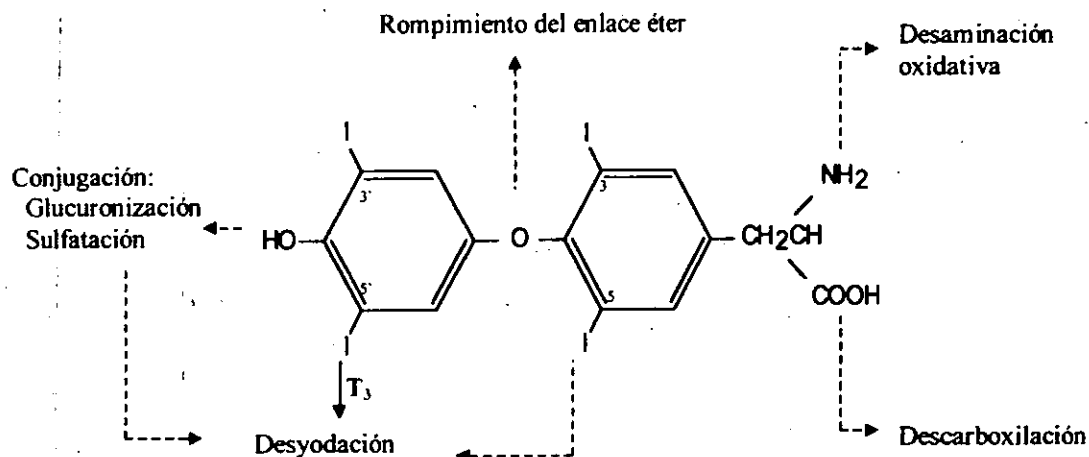
dependiente de energía (Krenning & Docter 1986; Pontecorvi & Robbins, 1986). Se ha descrito que el transportador es el mismo para la  $T_4$  y  $T_3$  en la adenohipófisis (Everts et al. 1994), mientras que en el hígado es diferente (Docker & Krenning, 1990; Köhrle, 1999).



**Figura 6. Regulación de la Síntesis y Secreción de Hormonas Tiroideas.** La TRH hipotalámica induce la síntesis y liberación de la TSH hipofisiaria. La TSH estimula a los tirocitos para que sinteticen y secreten HT a la circulación. Cuando los niveles circulantes y la concentración intracelular de  $T_3$  y  $T_4$  son altos, se inhibe la síntesis y secreción de TSH por la estimulación de la transcripción de la piroglutamil-amino peptidasa (PGAP), enzima que degrada la TRH en los tirotropos. También en el hipotálamo la  $T_3$  modifica la velocidad de recambio de adrenalina (A) y noradrenalina (NA). Las neuronas TRHergicas del hipotálamo son reguladas principalmente por aferencias adrenérgicas. La concentración intracelular de HT establece mecanismos de retroacción que regulan la operación del eje. TRH, tiroliberina; TSH; tirotropina.

Los numerosos y variados efectos biológicos de las HT, se deben a que aumentan la síntesis de diversas proteínas estructurales y funcionales que son responsables de los efectos finales observados. Los receptores a hormonas tiroideas ( $T_3$  Receptors, TRs) son proteínas localizadas en el núcleo o en la mitocondria. Cuando las HT se unen a estos receptores se activa el proceso de modulación de la transcripción de genes específicos (Baxter & Funder, 1979; De Groot & Taurog, 1979; Tata, 1980; Weinberg et al. 1986). Aunque la mayoría de los efectos de las HT son ejercidos a través del mecanismo anterior, la  $T_3$  también tiene efectos rápidos a nivel de la membrana celular (uniéndose a receptores de membrana, a canales iónicos o mecanismos asociados al citoesqueleto), o como modulador de la acción de proteínas o enzimas dependientes de ligando (Davis, 1991; Davis & Davis, 1996; Leonard & Farwell, 1997). La  $T_4$  carece de actividad tiromimética por la vía de interacción con TRs, pero se ha mostrado que puede tener efectos directos como modulador de mecanismos asociados al citoesqueleto (Leonard & Farwell, 1997). En estudios recientes se ha mostrado que la 3,5-diyodotironina ( $T_2$ ), producto de la desyodación del anillo externo de la  $T_3$ , ejerce algunos efectos característicos de la  $T_3$  tales como calorigénesis, inhibición de los niveles séricos de TSH, así como incrementar los de GH en animales hipotiroideos (Moreno et al. 1998). Lo anterior sugiere que esta molécula tiene algunos efectos biológicos mediados por su unión a TRs y no se descarta la idea de que pueda ejercer efectos extranucleares (Lanni et al. 1996; Moreno et al. 1998). A la fecha a la  $rT_3$  no se le conoce ningún efecto biológico.

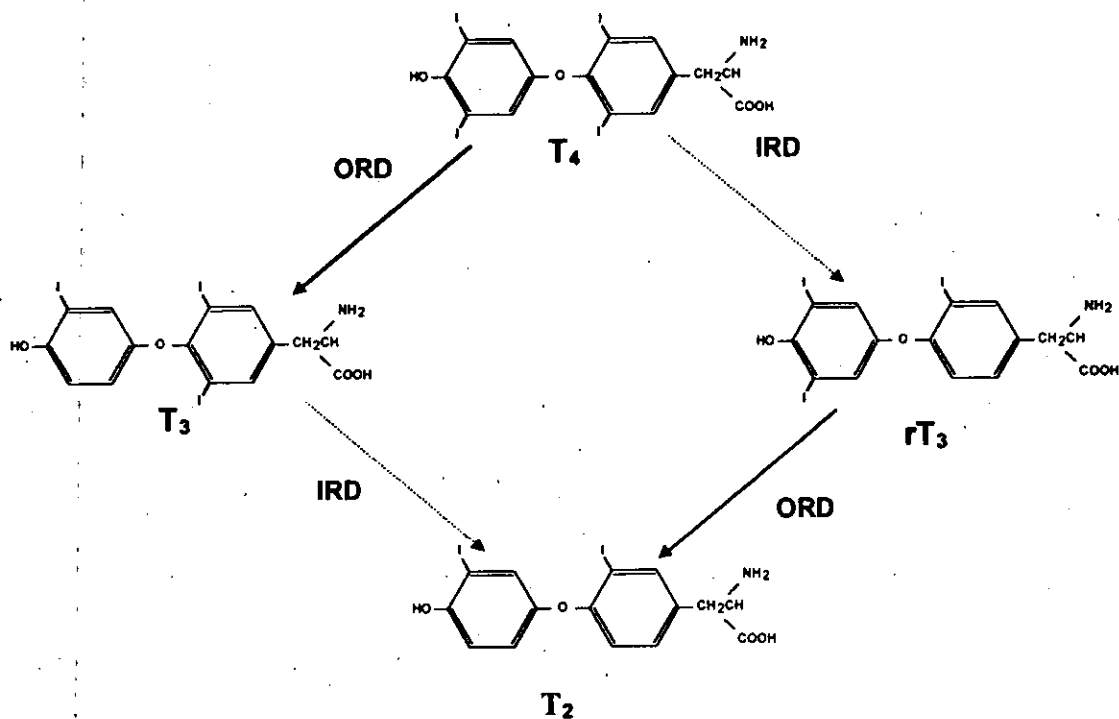
Las vías metabólicas extratiroideas por las que se transforman las HT pueden ser: desyodación, conjugación, desaminación oxidativa y descarboxilación (Chopra et al. 1978). Estas vías son importantes en la activación, desactivación, degradación y excreción de estas hormonas (Fig. 7).



**Figura 7. Vías Metabólicas de la Tiroxina.** Todas las vías metabólicas señaladas con líneas discontinuas inactivan a la tiroxina. La desyodación en la posición 5' ó 3' constituye la única vía metabólica de activación, porque produce a la  $T_3$ , hormona responsable de los efectos biológicos. Bajo condiciones fisiológicas, la ruptura del enlace éter y la desaminación oxidativa de la cadena lateral son vías metabólicas menores comparadas con la desyodación y la conjugación.

La desyodación consiste en la remoción progresiva de los átomos de yodo de las HT. Mediante la desyodación periférica de la  $T_4$  las células son capaces de ajustar a sus necesidades metabólicas la cantidad de hormona tiroidea activa ( $T_3$ ) o inactiva ( $rT_3$ ) que requieren. La desyodación ocurre prácticamente en todos los tejidos y constituye un proceso de regulación órgano-específico de la concentración intracelular de hormonas tiroideas (Valverde et al. 1998). Debido a la importancia biológica de las hormonas tiroideas existen diversos mecanismos que regulan su actividad. En efecto, además del control neuroendocrino a través del eje HHT, existe la desyodación periférica mediante la cual las células son capaces de ajustar a sus necesidades metabólicas la cantidad de hormona tiroidea activa que requieren (Valverde & Aceves, 1989). Actualmente se sabe que existen dos vías desyodativas. La primera es la llamada vía 5' (5'D) u ORD (Outer Ring Deiodination) porque involucra la monodesyodación del anillo fenilo o externo de la yodotironina. Por esta vía la  $T_4$  se convierte en  $T_3$  y la  $rT_3$  en 3,3'-diyodotironina (3,3'- $T_2$ ). La segunda vía es denominada 5 (5D) ó IRD (Inner Ring Deiodination) porque desyoda el anillo tirosilo o interno de la yodotironina. A través de esta vía la  $T_4$  se transforma en  $rT_3$  y la  $T_3$  en 3,3'- $T_2$  (Fig. 8). Por sus implicaciones fisiológicas se ha considerado a la ORD como la vía de activación, ya que da lugar a la  $T_3$ , que

como se mencionó es la hormona metabólicamente más activa. En contraste la vía IRD se denomina vía de desactivación, porque a través de esta vía, la  $T_4$  se transforma en la triyodotironina inactiva ó  $rT_3$  y la  $T_3$  se degrada a la diyodotironina  $3,3'$ - $T_2$  (Chopra et al. 1978; Engler & Burger, 1984).



**Figura 8. Productos Obtenidos a Partir de la Monodesyodación Secuencial de Tiroxina.** Las flechas con línea continua representan la vía de activación (ORD) y las flechas con línea discontinua muestran la vía de desactivación (IRD) (Modificado de Leonard, 1991).

## II. DESYODASAS

Las vías desyodativas están catalizadas por tres enzimas denominadas desyodasas. La desyodasa tipo 1 (D1) puede catalizar la vía de activación o la de inactivación ya que a partir de  $T_4$  puede formar  $rT_3$  ó  $T_3$ . La desyodasa tipo 2 (D2) participa exclusivamente en la vía de activación, ya que elimina un átomo de yodo del anillo externo de la  $T_4$  produciendo  $T_3$ . La desyodasa tipo (D3), cataliza únicamente la vía de inactivación. Así, la bioactividad de las hormonas tiroideas depende en gran medida de la actividad de las desyodasas (Valverde et al. 1998).

**A. CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA.** A la fecha las desyodasas no se han aislado ni purificado. Los métodos tradicionales de purificación de proteínas en parte han fracasado porque la concentración de estas enzimas es extremadamente baja en los tejidos y son proteínas integrales de la membrana. Sin embargo utilizando métodos bioquímicos, se han estudiado sus características fisicoquímicas y cinéticas, principalmente en mamíferos (Cuadro 2). A partir de estos trabajos se sabe que las desyodasas se diferencian de acuerdo a los siguientes criterios: 1) la reacción que catalizan; 2) el sustrato preferencial; 3) la sensibilidad al propiltiouracilo (PTU) y otros inhibidores; 4) requerimiento de cofactor. (Visser et al. 1978, 1982, 1991; Köhrle, 1999). Utilizando como marcador específico de las enzimas el N-bromoacetil- $T_3$  radiactivo se ha identificado su masa molecular y sus subunidades. Los factores que participan en la regulación de la actividad desyodativa han sido poco estudiados y actualmente se considera que la regulación depende de: 1) el aporte y la disponibilidad del sustrato (hipertiroidismo-hipotiroidismo), 2) el aporte y el balance energético del organismo (principalmente de carbohidratos y proteínas) y 3) algunos mensajeros neuroendocrinos (Brown et al. 1991; Cyr et al. 1988; Kaplan, 1980; Kühn et al. 1993).

**B. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR.** Utilizando las técnicas de la biología molecular, recientemente se ha logrado la caracterización molecular de los ácidos ribonucleicos mensajeros (mRNAs) que codifican para las tres enzimas desyodasas, y con la secuencia deducida de aminoácidos se ha avanzado en el conocimiento de las relaciones estructura-función de estas moléculas (Cuadro 3), (St Germain et al. 1990; Berry et al. 1991a).

Aún cuando la D1, la D2 y la D3 son fundamentales para la función tiroidea, por los objetivos particulares de esta tesis, a continuación se revisa en detalle únicamente la información referente a la D1.



Cuadro 2. Características de las Desyodasas en Mamíferos

CARACTERÍSTICAS	D1	D2	D3
REACCIÓN QUE CATALIZAN	ORD e IRD	ORD	IRD
SUBSTRATO PREFERENCIAL	$rT_3 \gg T_4 \gg T_3$	$T_4 > rT_3$	$T_3(\text{sulfato}) > T_4$
Km	0.5 $\mu\text{M}$	1-2 nM	5-20 $\mu\text{M}$
COFACTOR Km	5 mM	25 mM	~ 70 mM
CINÉTICA DE REACCIÓN	Ping-pong	Secuencial	Secuencial
SITIO ACTIVO	Se-cys, phe, his	Se-cys	Se-cys
MASA MOLECULAR	55 000 kDa Subunidad 27 kDa	200 000 kDa Subunidad 29 kDa	? Subunidad 32 kDa
INHIBIDORES:			
TIOLUCOSA AÚRICA	++++	+	-
PTU	++++	±	-
YODOACETATO	++++	+	?
ÁCIDO IOPANOICO	++++	++++	++++
FLAVONOIDES	++++	+++	+++
DISTRIBUCIÓN EN ÓRGANOS	Tiroides, riñón, hígado, hipófisis eutiroides, SNC	SNC, hipófisis, BAT, pineal, suprarrenal	Placenta, SNC, piel
LOCALIZACIÓN SUBCELULAR	Hígado: RE Riñón: MP	MMic	MMic
PROBABLE FUNCIÓN	Proveer $T_3$ circulante	Autoconsumo	Desactivación tisular de $T_4$ y $T_3$
HIPOTIROIDISMO	↓ Hígado	↑ Todos los tejidos	↓
HIPERTIROIDISMO	↑ Hígado	↓ Todos los tejidos	↑

SNC, sistema nervioso central; BAT, tejido graso pardo; RE, retículo endoplásmico; MP, membrana plasmática; MMic, membrana microsomal; Se-cys, selenocisteína; Km, constante de Michaelis; PTU, 6-propil-2-tiouracilo. (Leonard, 1991; Köhrle et al. 1991; St Germain, 1994; Köhrle, 1999).

**Cuadro 3. Características Moleculares y Genómicas de las Desyodasas**

	D1	D2	D3
<b>CLONACIÓN</b>	Hígado Rata: St. Germain, 1990 parcial Rata: Berry, 1991a Humano: Mandel, 1992 Perro: Toyoda, 1994 Ratón: Maia, 1995 Gallo: Van der Geyten, 1997 Glándula Mamaria Rata: Navarro, 1997 Riñón Tilapia: Sanders, 1997	Secuencia parcial Rana: Davey, 1995 Rata: Davey, 1995 Humano: Croteau, 1996 <i>F. heteroclitus</i> : Valverde, 1997 Secuencia completa Humano: Buettner 1998 Gallo: Gereben, 1999 Ratón: Davey, 1999 <i>F. heteroclitus</i> : Orozco, 1999	<i>X. Laevis</i> : St. Germain, 1994 Rata: Croteau, 1995 Rana: Becker, 1995 Humano: Salvatore, 1995 Pollo: Van der Geyten, 1997 Tilapia: Sanders, 1999
<b>CARACTERÍSTICAS mRNA</b>	TGA en ORF SECIS forma 1 mRNA de ~ 2.1 kb	2 TGA en ORF SECIS forma 2 mRNA de ~ 5 a 8 kb	TGA en ORF SECIS forma 2 mRNA de ~ 3 kb
<b>GEN</b>	Ratón 15 kb 4 exones 3 intrones 2 sitios TRE (100-700 pb)	Ratón intrón de 8.5 kb Fundulus intrón de 4.7 kb	Ratón 1 exón de ~ 1.8 kb
<b>GEN EN HUMANO</b>	1p32 – p33 17.5 kb, 4 exones	14q24.3 7.4 kb, 2 exones	14q32
<b>EXPRESIÓN</b>	Hígado, riñón y tiroides	Roedores: SNC, hipófisis, BAT Humanos: Placenta, músculo esquelético, corazón y tiroides	Desarrollo: diferentes tejidos  Adulto: Placenta, piel, SNC, útero
<b>REGULACIÓN POR HT</b>	Hipertiroidismo ↑ mRNA y actividad Hígado, riñón, tiroides e hipófisis anterior  Mecanismos pretraduccionales	↓ Hipertiroidismo  ↑ Hipotiroidismo  Mecanismos pre y post traduccionales	Hipertiroidismo  ↓ Piel  Hipotiroidismo  ↑ Cerebro
<b>REGULACIÓN POR OTROS MENSAJEROS</b>	↑ Testosterona Hígado machos  Citocinas  ↓ Tiroides  Sistema simpato adrenal  ↑ Glándula mamaria	Insulina, glucagón, catecolaminas  ↑ BAT  Catecolaminas, glucocorticoides, AMPc  ↑ Astrocytos  ↓ GH	Factores de crecimiento, retinoides, estrés  ↑

TGA, codon de inserción de selenocisteína (Se-cys); ORF, marco abierto de lectura; SECIS, secuencia para la inserción de Se-cys; SNC, sistema nervioso central; BAT, tejido graso pardo; GH, hormona de crecimiento; cAMP, AMP cíclico; TRE, elementos de respuesta a hormonas tiroideas; A, adrenalina; NA, noradrenalina.

### III. DESYODASA TIPO 1 (D1)

**A. LOCALIZACIÓN TISULAR.** La D1 es una enzima ampliamente distribuida en todo el organismo, con la posible excepción de las gónadas y el bazo (Leonard & Visser, 1986; Köhrle et al. 1991). Su actividad es mayor en órganos de recambio metabólico elevado como el hígado, el riñón, la glándula tiroides, la hipófisis y la glándula mamaria lactante, siendo los dos primeros los órganos más estudiados. Actividad D1 menor se ha observado en el músculo esquelético, el corazón, el intestino, el bazo, el pulmón, la glándula mamaria, la grasa blanca, los linfocitos y la glándula salival (Chopra, 1978; McCann et al. 1984; Aceves & Valverde, 1989; Leonard & Köhrle, 1996). Aún cuando se sabe que la  $T_3$  generada por la D1 es exportada al torrente sanguíneo, hasta la fecha no se conocen los mecanismos por los cuales esto ocurre. En este contexto se sabe que el hígado contribuye con la mayor proporción de la  $T_3$  circulante, seguido por el riñón y la tiroides. En esta última la actividad D1 es estimulada por TSH (Ishii et al. 1983; Köhrle, 1990; Toyoda et al. 1992; Köhrle et al. 1995).

**B. DISTRIBUCIÓN SUBCELULAR.** La distribución subcelular de la D1 es aún controvertida y varía de órgano a órgano. En el hígado de rata la D1 purifica con las enzimas marcadoras para el retículo endoplásmico, mientras que en el riñón la enzima está asociada con proteínas de la membrana plasmática como la bomba de  $Na^+/K^+$  dependiente de ATP. En el caso de la corteza cerebral se ha asociado a membranas sinaptosomales. En otros tejidos como la hipófisis, la tiroides y el músculo esquelético, la información es muy limitada (Chopra, et al. 1978; Leonard & Visser, 1986; Köhrle et al. 1991). Se ha observado que tanto la actividad como el marcaje específico de la enzima D1 con N-bromoacetil [ $^{125}I$ ] $T_3$  (BrAc $T_3$ ) son inhibidos por el pretratamiento con tripsina, mientras que los tratamientos para la liberación específica de proteínas del lumen no las afectan. Lo anterior sugiere que la D1 es una proteína transmembranal con su sitio activo orientado hacia el citoplasma (Schoenmaker et al. 1989). El sitio activo está localizado a la mitad de la proteína, pero los dominios transmembranales y el extremo amino terminal del

lumen son esenciales para el funcionamiento adecuado de la enzima (Toyoda et al. 1995c).

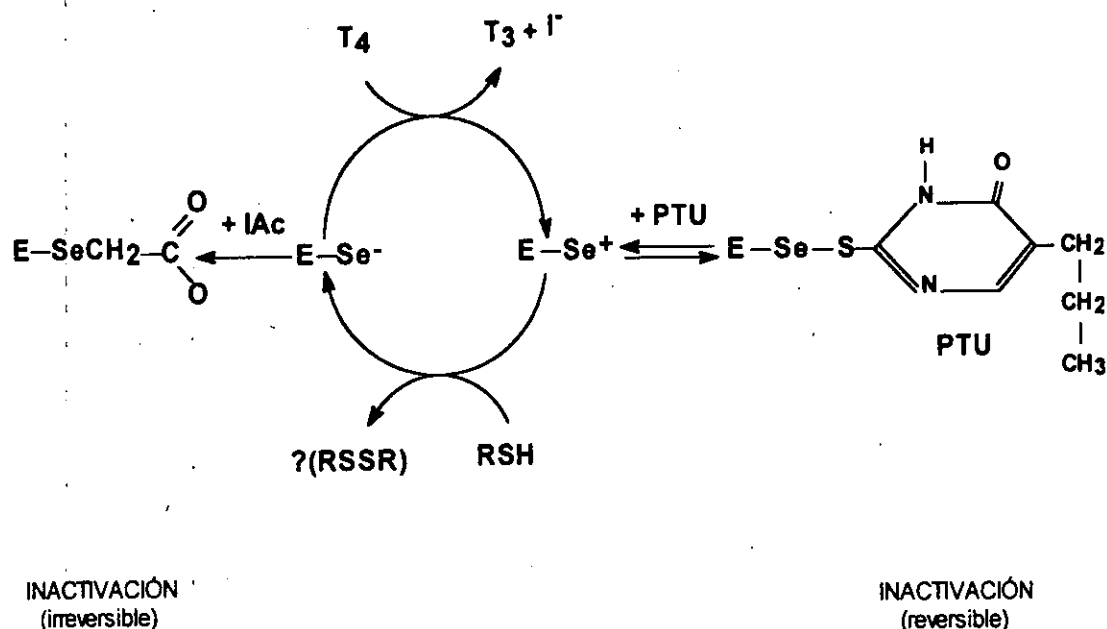
**C. ANILLO QUE DESYODA.** La enzima puede catalizar las vías ORD e IRD, y se sabe que estas actividades pueden ser reguladas diferencialmente (Moreno et al. 1994). Se ha observado que esta enzima puede desyodar el anillo externo –fenólico- o el anillo interno –tirosilo-, dependiendo de las condiciones intracelulares como el pH y la disponibilidad del substrato. Por ejemplo, a pH ácido o neutro (6.5-7.5), la D1 desyoda preferencialmente el anillo externo; mientras que el pH óptimo para la desyodación del anillo interno es ligeramente alcalino (Visser et al. 1978; Kaplan, 1984; Leonard & Visser, 1986; Köhrle et al. 1991). En condiciones fisiológicas estables la D1 desyoda preferentemente al anillo fenólico. Los aminoácidos presentes en el sitio activo de la enzima son los responsables de que la D1 desyode preferentemente uno u otro anillo dependiendo del pH (Köhrle & Hesch, 1984; Toyoda et al. 1994; Sanders et al. 1997; Sun et al. 1997; Croteau et al. 1998). Otros estudios han mostrado que mediante la vía ORD la D1 puede remover el yodo de la posición 5' ó 3' del anillo fenólico a partir de  $T_4$ ,  $T_3$ ,  $rT_3$ , 3,3'- $T_2$ , 3',5'- $T_2$ , y 3'- $T_1$  (Visser et al. 1991; Toyoda et al. 1997). Además de su actividad catalítica dual, otro de los rasgos característicos de la D1 en la mayoría de las especies es su marcada preferencia por la  $rT_3$  como substrato de la vía ORD *in vitro*, así como su elevada eficiencia en la desyodación de las diferentes yodotironinas sulfatadas. La sulfatación de las HT tiene un profundo efecto sobre la susceptibilidad a la desyodación. La vía IRD de la  $T_3$  es fuertemente favorecida por la sulfatación. Las D1s de humano y de rata son 40 veces más eficientes para desyodar la  $T_3$  sulfato ( $T_3S$ ) por la vía IRD que la  $T_3$  no sulfatada (Visser et al. 1983). La D1 desyoda el anillo externo o interno de la  $T_4$  con una eficiencia semejante (Visser et al. 1978); mientras que la desyodación del anillo interno de la  $T_4$  sulfato ( $T_4S$ ) es 400 veces más eficiente que la de la  $T_4$  (Mol & Visser, 1985). La sulfatación de la  $rT_3$  casi no tiene efecto en la desyodación.

**D. SUBSTRATO PREFERENCIAL.** Debido a que a través de la D1 hepática se produce la mayor proporción de la  $T_3$  circulante (Chopra, 1996; Köhrle, 1996) se cree que en condiciones normales el substrato preferencial *in vivo* es la  $T_4$ . A continuación se presenta lo que se ha observado en los estudios *in vitro*, respecto a la especificidad de la D1. Basándose en el valor de la relación  $V_{max}/K_m$  como medida de la eficiencia de la reacción, la  $rT_3$  es el substrato preferencial de la D1. La eficiencia de la desyodación de la  $T_4$  es 700 veces menor en el hígado (Visser et al. 1979) y 27 veces menor en el riñón (Leonard & Rosenberg, 1980), en comparación a la desyodación de la  $rT_3$ . Se desconoce cuál es la causa de esta preferencia en el hígado y el riñón de rata. Los valores reportados de la  $K_m$  son de 2-4  $\mu M$  para la  $T_4$  y desde 0.06 – 0.35  $\mu M$  para la  $rT_3$  en el hígado de rata y humano (Visser et al. 1979, 1988). Estos estudios han mostrado que el substrato preferencial de la actividad 5'D1 es:  $rT_3 > T_4 > 3',5'-T_2 > 3,3'-T_2$ , con  $K_m$  aparente en el rango  $\mu M$  y con requerimientos relativamente bajos de cofactor (5 – 8 mM) (Leonard, 1991).

**E. PATRÓN CINÉTICO.** La desyodación es un proceso substitutivo en el cual el átomo de yodo es reemplazado por uno de hidrógeno y esta reacción puede ser considerada como un proceso de liberación de yodo. La reacción procede de acuerdo al mecanismo catalítico llamado "ping-pong". Este mecanismo es característico en enzimas que existen en dos formas interconvertibles y cada forma muestra diferente afinidad por cada uno de los substratos. En la figura 9 se muestra el mecanismo de reacción propuesto para la D1, en donde se asume que existe una forma oxidada ( $E-Se^+$ ) y una reducida ( $E-Se^-$ ) de la enzima.

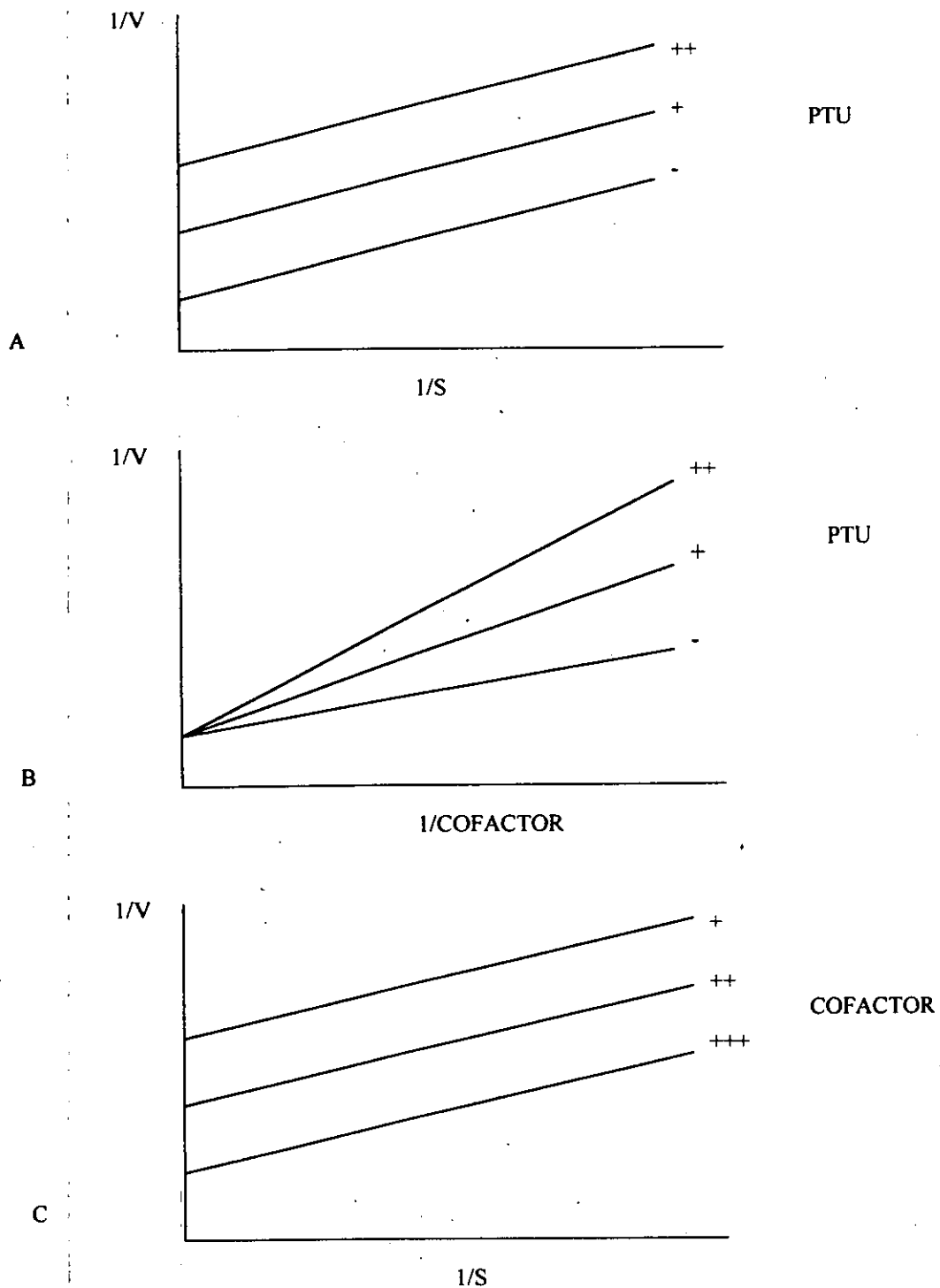
**F. INHIBIDORES.** Estudios previos muestran que hay substratos análogos que inhiben de manera competitiva la actividad D1. Los valores de  $K_i$  para las diferentes yodotironinas son semejantes a los valores respectivos de la  $K_m$  (Leonard & Visser, 1986). La substitución de la cadena de alanina en las yodotironinas por N-acetil alanina o por ácido acético induce una mayor efectividad en la inhibición. El N-bromoacetil- $T_3$  a concentraciones muy bajas causa una inhibición irreversible en la desyodación en hígado de rata (Mol et al. 1984). Otros inhibidores de la D1 son los

agentes bloqueadores de grupos sulfhidrido, como el yodoacetato (IAC) y sales de oro como la tioglucosa áurica (ATG). Ya que los sustratos protegen a la enzima en contra de estos compuestos de manera competitiva, el grupo al que se unen estos compuestos debe localizarse en el sitio activo (Visser et al. 1976; Leonard & Visser, 1984). Fármacos como el 6-propil-2-tiouracilo (PTU) inhiben la actividad D1 mediante la unión covalente de su grupo sulfhidrido con la enzima. Esta inhibición es no competitiva con el sustrato y competitiva con el cofactor (Fig. 10), lo cual indica que el PTU solamente reacciona con una forma intermedia de la enzima inducida por el sustrato y no con la enzima nativa (Visser, 1979; Leonard & Visser, 1986).



**Figura 9. Mecanismo de Reacción de la 5'D1 y Efecto de la Inhibición por PTU y por Yodoacetato.** Se muestra la primera mitad de la reacción de desyodación de la tironina a través de la remoción de un átomo de yodo del anillo externo. Esto coincide con la reducción del carbono, que contiene el yodo en la posición 5', mediante la transferencia de dos electrones a un sulfhidrido en o cerca del sitio activo de la enzima que es oxidado a sulfenil  $-S^+$  liberando un protón. Posiblemente con este grupo sulfenil se forma un intermediario muy lábil ES-I con una nueva liberación de yodo. La reducción de estos grupos funcionales generalmente por los tioles, regenera el sitio catalítico y prepara a la D1 para otra ronda de desyodación (Modificado de Köhrle et al. 1991).

**G. COFACTOR.** Todas las desyodasas *in vitro* son estimuladas por cofactores con grupos tiol, como el ditioneitol (DTT). Numerosos estudios han intentado, sin éxito, identificar el sistema cofactor que participa en la transferencia del hidrógeno *in vivo*.



**Figura 10. Cinética de Reacción Determinada Para la D1.** Gráficas de doble recíproca: A) Las líneas paralelas muestran una inhibición acompetitiva del PTU respecto al sustrato, B) Inhibición competitiva del PTU respecto al cofactor y C) Efecto de la concentración del sustrato en la actividad dependiente del cofactor (Modificado por Leonard, 1991).

En algunos reportes se ha propuesto al glutatión reducido (GSH) como el posible cofactor fisiológico ya que es el tiol intracelular no proteínico más abundante. Sin embargo en estudios *in vitro* y comparado con el DTT, el GSH tiene un efecto pobre sobre la activación de la enzima (Kaplan, 1984; Leonard & Visser, 1986; Visser et al. 1976; Visser et al. 1978). Los sistemas de óxido-reductasa dependientes de NADPH como la tiorredoxina y la glutarredoxina, pueden sustituir parcialmente a los tioles reducidos en la reacción D1 (Sawada et al. 1986). Se ha observado una gran activación de la enzima con los ditiolos de elevado potencial redox, como el etanediol, el 2,3-ditiopropanol, el ditiotreitól y el ditioueritreitól, mientras que la activación fue menos efectiva con los monotioles como el mercaptoetanol. Se desconoce la razón por la cual los ditiolos son más potentes pero parece depender de su habilidad para formar puentes disulfuro intramoleculares (Goswani & Rosenberg, 1988; Sawada et al. 1986).

**H. PROBABLE FUNCIÓN.** Se considera que mediante la actividad de la D1 se produce  $T_3$  para exportación, es decir, genera  $T_3$  que pasa al torrente sanguíneo. De todos los órganos que contienen esta enzima, el hígado es el responsable de llevar a cabo alrededor del 40 % de toda la desyodación del organismo y aporta el 70 % de la producción diaria de  $T_3$  (Köhrle, 1999).

**I. REGULACIÓN.** La actividad D1 está principalmente regulada por HT en el hígado, el riñón (Kaplan & Utiger, 1978), la tiroides (Toyoda et al. 1990b) y la adenohipófisis (Köhrle et al. 1995). Por ejemplo, en la rata hipertiroidea, tanto la expresión de D1-mRNA y la actividad de la enzima en el hígado y el riñón aumentan 10 – 50 veces. Por lo anterior el efecto se debe a un mecanismo pretraduccional (O'Mara et al. 1993; DePalo et al. 1994). Efectos semejantes se han observado en la glándula tiroides, en donde la TSH, las inmunoglobulinas estimulantes de la tiroides (TSI) de la enfermedad de Graves, y la  $T_3$  estimulan la expresión del D1-mRNA y la actividad de la enzima (Toyoda et al. 1992). El efecto de la  $T_3$  sobre la expresión del mRNA de la D1 se debe a que incrementa la transcripción del gen correspondiente (Maia et al. 1995). Estudios posteriores han revelado que el gen para la D1 en humano presenta dos elementos de respuesta a



hormonas tiroideas (TREs) localizados a 100 y 700 pb río arriba del sitio de iniciación de la transcripción (Toyoda et al. 1995a). Otros mensajeros neuroendocrinos ejercen efectos regulatorios sobre la desyodación, como la testosterona que tiene un efecto estimulante sobre la expresión de la D1, por lo que la actividad de estas enzimas es mayor en los machos (Miyashita et al. 1995). En la glándula mamaria lactante tanto el mRNA como la actividad de la D1 es estimulada por noradrenalina (NA) y prolactina (PRL) (Aceves et al. 1999). En la glándula tiroidea y el hígado varias citocinas exhiben un efecto inhibitorio en la expresión de D1 (Pekary et al. 1994; Tang et al. 1995; Hashimoto et al. 1995).

#### **IV. CLONACIÓN DEL cDNA QUE CODIFICA PARA LA D1**

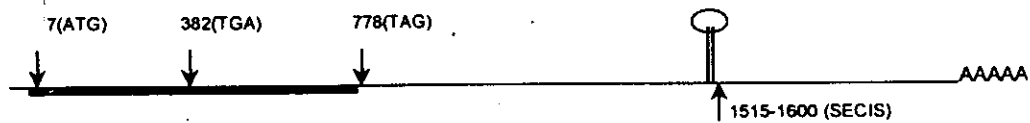
En los últimos años las técnicas de biología molecular han permitido el avance en el conocimiento de la estructura de las desyodasas. Mediante técnicas de extracción y clonación se aisló e identificó el cDNA que codifica para la D1 en el hígado de ratas hipertiroideas. La expresión de este cDNA en cultivo celular o en ovocitos de *Xenopus*, confirmó que las propiedades cinéticas, así como la especificidad por sustrato y sensibilidad a propiltiouracilo (PTU) de la proteína expresada correspondieron a la D1 (St Germain et al. 1990; Berry et al. 1991a). Además en la secuencia de este cDNA se observó la presencia de un codón de paro (UGA) dentro del marco abierto de lectura. El codón UGA codifica para el aminoácido selenocisteína (Se-Cys), un análogo de la cisteína en el cual el azufre es reemplazado por el selenio (Se). Mediante estudios de mutagénesis dirigida se cambió el codón UGA por UAA (codón de terminación); o por UUA (codón para leucina) y como resultado se obtuvo una proteína inactiva. En estudios similares, cuando UGA es reemplazado por UGU (codón para cisteína), se produce una desyodasa funcional aunque con propiedades alteradas comparadas con la D1. Estos resultados confirmaron que en el caso de la D1, el codón UGA no es una señal de terminación y que esta enzima es un nuevo miembro de la familia de las selenoproteínas (Berry et al. 1991b; St Germain et al. 1990). El aminoácido Se-Cys confiere propiedades especiales a esta familia de selenoenzimas, ya que su

actividad catalítica es inhibida de manera competitiva por el oro. En el caso de la D1 esta inhibición tiene una  $K_i$  de 6.6 nM para tioglucosa aúrica (Berry et al. 1991b; Berry & Larsen, 1992). Estudios subsecuentes han revelado varios rasgos estructurales de este mensajero. Estos incluyen: 1) la presencia de una secuencia de inserción para la selenocisteína (SECIS), entre los nucleótidos 1515 a 1600 de la región 3' no traducida del mRNA. Esta secuencia es una estructura en forma de horquilla, y es esencial para la incorporación de la selenocisteína durante la traducción; 2) dos histidinas esenciales para la actividad en la posición 158 y 174 de la secuencia de aminoácidos; 3) El codón que codifica para un residuo de fenilalanina en la posición 65 de la D1 en humanos le confiere la capacidad de desyodar substratos con anillo tirosilo monoyodado (Toyoda et al. 1995c y 1997). El análisis de la proteína ha mostrado una región hidrofóbica de aproximadamente 35 aminoácidos en el extremo amino terminal que indican la presencia de un dominio transmembranal. La proteína parece orientarse de tal forma que el extremo amino se localiza dentro del lumen del retículo endoplásmico, mientras que el sitio catalítico se localiza en el citosol, en el extremo carboxilo terminal. Posteriormente se propuso que la D1 es un homodímero en su estado nativo (Leonard & Leonard, 1996). A partir de estos estudios se han clonado y caracterizado los cDNAs para la D1 en el hígado de humano (Mandel et al. 1992); perro (Toyoda et al. 1994); ratón (Maia et al. 1995); gallo (Van der Geyten et al. 1997) y en el riñón de tilapia (Sanders et al. 1997) (Fig 11). La alineación de las secuencias de aminoácidos deducidas a partir de estos cDNAs se muestra en la figura 12.

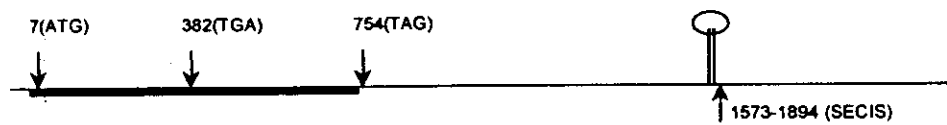
**A. IMPORTANCIA DEL SELENIO.** Estos hallazgos llevaron a revalorar el papel del selenio en la fisiología tiroidea y el metabolismo de las hormonas tiroideas. Así, en ratas mantenidas con dietas deficientes en Se (4 - 6 semanas), se elevan las concentraciones circulantes de  $T_4$  y disminuyen las de  $T_3$ . Estas alteraciones se asocian con una marcada disminución de la actividad D1 hepática y renal pero no en la glándula tiroidea, la cual aparentemente es resistente a la depleción de selenio (Behne et al. 1990). Los mecanismos celulares para la conservación del Se por la glándula tiroidea no se conocen. Sin embargo, se ha mostrado que la

deficiencia de este oligoelemento también provoca la disminución del yodo y de las hormonas tiroideas en la glándula, posiblemente debido al incremento en la síntesis y secreción de la tiroglobulina estimulada por la hipersecreción de TSH.

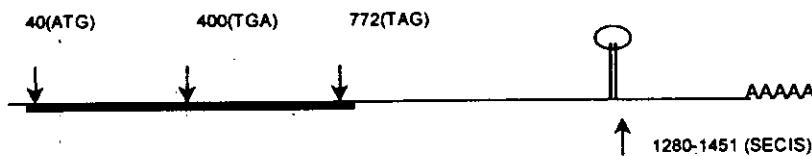
**RATA: G-21 hígado hipertiroideo (Berry et al. 1991a)**



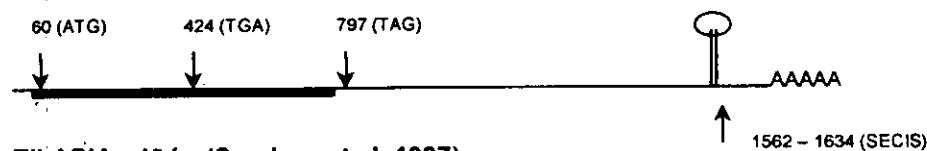
**HUMANO: hígado (Mandel et al. 1992)**



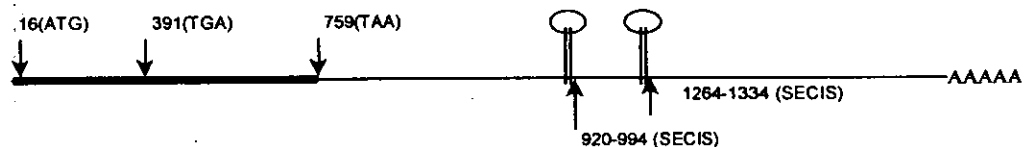
**PERRO: hígado (Toyoda et al. 1994)**



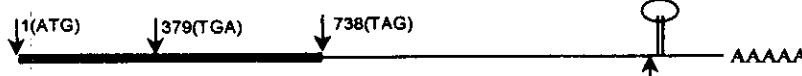
**RATÓN: hígado (Maia et al. 1995)**



**TILAPIA: riñón (Sanders et al. 1997)**



**GALLO: hígado embrión (Van der Geyten et al. 1997)**



**Figura 11. Características de los mRNAs de la D1.** Se muestra la posición del codón de inicio (ATG), del codón para Se-cys (TGA) y el codón de paro (TAA ó TAG) en el marco abierto de lectura. En la región 3' no traducida se presenta la posición de la secuencia SECIS.

Tilapia	METLQKIVLYLSTACMECYMLGKFLMLVTLQEFSPSLANKETLRMGERITMTQNPENYEDWGLTFMSLAEIKTASSHML	80
Gallo	...LSIRVLLHKLLILLQVTLSSVVGKTMMLLEPDTTRRYLKLGEKSRMNQPKFSYENWGETEESFOXLLEFVLKVKWR	77
Perro	MGLPRPVLWLRRLWVLLQVAVQAVGKVELKLEPARVKQHIWAMNGK.....NPHFSYDNWAEITLYSMQYFWFVLKVCWQ	75
Rata	MGLSOLWLLWKRLVI FLQVALEAVATGKVLMTLEPERVKQNILAMGQNTGMTRNPEREAPDNWVETFEESI QYFWFVLKVRWQ	80
Ratón	MGLPQLWLLWKRLVI FLQVALEAVGKVLMTLEPERVKQSTILAMGQNTGMARNEREAPDNWVETFEESI QYFWFVLKVRWQ	80
Humano	MGLPOPGLWLLKRLWVLLQVAVHVVVGKVLIILEPDRVARNILAMGERTGMTRNPEHSHDNWVETFEESI QYFWFVLKVRWQ	80
Tilapia	SLGEEAFVCGEAPDSPVWTMDREKTSISKYIKGNRPLVLSFGSCTNPPFMYKLLDEFKQVVKDFSDVADELVIYIAEAHST	160
Gallo	RIEDEAHEGRPAENTPVALNGEMOHLFSSEMRDNRPLVLLNFGSCTNPPFMLENDEFNKLVKDFSSIADFLIYIEEAHAV	157
Perro	RIEDRTEPCGLAENCPVVRILSGORCNIWDEMOGNRPLVLLNFGSCTNPPSELENEDCEKRLIIDEFCSTADFLIYIEEAHAS	155
Rata	RIEDRAEYCGLAENCTVVRILSGOKCNVWDFIQGSRPLVLLNFGSCTNPPSELLKEDCEKRLVDDFEASTADFLIYIEEAHAT	160
Ratón	RIEDRAEEGGLAENCTVVRILSGOKCNIWDFIQGSRPLVLLNFGSCTNPPSELLKEDCEKRLVDDFEASTADFLIYIEEAHAT	160
Humano	RIEDTTELGLAENCPVVRILSGORCNIWDEMOGNRPLVLLNFGSCTNPPSEFMENEDCEKRLIIDEFCSTADFLIYIEEAHAS	160
Tilapia	DGWAFAKNNYDINCHQSIEDRILSAAOVIVQSEELCPVWVDEYTDVTTIKYCALPERLFI LQAGKVLKYGKGPWGNPAEV	240
Gallo	DGWAFAKNNVVIKNIHRSLEDPKTAAQELQOKNPLCPVWVDEYTDVTTIKYCALPERLYILQAGNVIYKGGVGPWNYHPQEI	237
Perro	DGWAFAKNNVNIIRTAQTLQDRIQAARLHIDRAPPQCPVWVDEYTDVTTIKYCALPERLFI LQAGKVLKYGKGPWNYHPQEI	235
Rata	DGWAFAKNNVDIIRCHRSIQDPLRAAHLILARSPOCPVWVDEYTDVTTIKYCALPERLYVIQEGRICYKGGKGPWNYHPQEI	240
Ratón	DGWAFAKNNVDVIRCHRSIQEVRRAARMLILARSPOCPVWVDEYTDVTTIKYCALPERLYVIQEGRICYKGGKAGPWNYHPQEI	240
Humano	DGWAFAKNNMDIRNHQNLQDPLQAARHLILARSPOCPVWVDEYTDVTTIKYCALPERLYIIEGRILYKGGKSGPWNYHPQEI	240
Tilapia	PSFLENLK	248
Gallo	PAVLENLK	245
Perro	PAVLENLHS	244
Rata	PAVLENLCIPPGHMPQF	257
Ratón	PAVLENLCTPPRHVPQL	257
Humano	PAVLENLHS	249

Figura 12. Secuencia de Aminoácidos de la D1 en Diferentes Especies. La D1 de tilapia fue clonada a partir del riñón, en las demás especies la secuencia corresponde a la D1 hepática.

Antecedentes

Tilapia 80  
 Gallo 77  
 Perro 75  
 Rata 80  
 Ratón 80  
 Humano 80

Tilapia 160  
 Gallo 157  
 Perro 155  
 Rata 160  
 Ratón 160  
 Humano 160

Tilapia 240  
 Gallo 237  
 Perro 235  
 Rata 240  
 Ratón 240  
 Humano 240

Tilapia 248  
 Gallo 245  
 Perro 244  
 Rata 257  
 Ratón 257  
 Humano 249

100 %

75 %

50 %

33 %

Figura 12. Secuencia de Aminoácidos de la D1 en Diferentes Especies. La D1 de tilapia fue clonada a partir del riñón, en las demás especies la secuencia corresponde a la D1 hepática.

**B. GEN DE LA DESYODASA TIPO 1.** La zona genómica que codifica para la D1 se ha identificado en el ratón (Maia et al. 1995) y en el humano (Toyoda et al. 1996). El *locus* de ratón es de aproximadamente 15 kb y contiene 4 exones. El análisis de las regiones exónicas mostró que el exón 1 contiene el codón ATG. En el exón 2, se localiza el codón TGA que codifica para Se-cys. El exón 4 contiene el codón TAG de terminación, la región SECIS y la señal de poliadenilación ATTAAA. Algunas cepas de ratones como la CH3/HeJ presentan actividades D1 10 a 20 veces menores que la cepa C57BL/6J. La diferencia entre estas cepas parece estar en el promotor del gen, específicamente entre la región -705 y -162. La diferencia más importante encontrada en esta región, es un inserto de 21 pares de bases que contiene 5 CTG repetidas que se encuentra en el gen de la cepa CH3, así como en otras cepas de ratones con baja actividad 5'D1 hepática (Berry et al. 1993a; Maia et al. 1995). El gen que codifica para la D1 en humanos es de 2.2 kb (Jakobs et al. 1997), el promotor de este gen no presenta la caja TATA o la caja CAAT, pero presenta dos cajas GC cercanas al sitio de iniciación. Este gen fue mapeado y está contenido en el brazo corto del cromosoma humano 1 p32-p33 (Jakobs et al. 1997; Köhrle et al. 1997). También se han caracterizado en el promotor elementos responsivos a hormonas tiroideas (TRE) y al ácido retinoico (RARE) (Jakobs et al. 1995; Toyoda et al. 1995a; Jakobs et al. 1997; Schmutzler et al. 1998; Zhang et al. 1998). Estos elementos son responsables de la expresión de la D1 ante la estimulación con  $T_3$  y ácido retinoico tanto *in vivo* como *in vitro*. Se ha observado un incremento agudo en la expresión de D1 en células transformadas o líneas de células tumorales en respuesta al ácido retinoico y  $T_3$ . Estos efectos parecen no ser aditivos (Schreck et al. 1994; Köhrle et al. 1997; Schmutzler et al. 1998). Estas observaciones podrían indicar que la regulación de la expresión de D1 se ajusta a un patrón específico durante el desarrollo, siendo sensible a retinoides activos durante el desarrollo en células indiferenciadas y a  $T_3$  en células que han alcanzado un estado final diferenciado. Un hecho compatible con esta hipótesis es la observación de la disminución parcial o total de la expresión de D1 en células derivadas de tumores comparadas con el correspondiente tejido sano (Köhrle et al. 1993; Naumann et al. 1993; Dutkiewicz et al. 1995; Köhrle et al.

1997). Esto se ha descrito en líneas celulares de cáncer de tiroides, riñón y testículos. Además el tratamiento con retinoides eleva notablemente la actividad y la expresión del mRNA para la D1 en líneas celulares de cáncer de tiroides. El uso de la expresión de D1 como marcador diferencial para cáncer de tiroides está en investigación (Winzer et al. 1998). En el cuadro 3 se presenta un resumen de las características moleculares descritas para las desyodasas. Las tres isoenzimas muestran diferentes patrones de expresión tisular tanto en el individuo adulto como durante el desarrollo. Son reguladas y moduladas diferencialmente por hormonas, citocinas, moléculas de señalización, factores naturales y farmacológicos. A la fecha se han clonado 16 cDNAs de diferentes selenodesyodasas de diferentes especies. Debido a que sus propiedades estructurales y funcionales han sido altamente conservadas durante la evolución de los vertebrados se sugiere que son un componente esencial del sistema para mantener la homeostasis de las HT.

## V. FISIOLÓGÍA TIROIDEA EN PECES

**A. EFECTOS DE LAS HORMONAS TIROIDEAS.** Las hormonas tiroideas en peces son necesarias entre otras funciones para el control del metabolismo, desarrollo, crecimiento y osmorregulación. En algunas especies como el lenguado (*Paralichthys olivaceus*), las HT estimulan la metamorfosis de manera similar al mecanismo observado en anfibios (Grace de Jesus et al. 1991). En huevos no fecundados de peces se han encontrado HT de origen materno, las cuales posteriormente juegan un papel importante en el desarrollo temprano del embrión (Evans, 1993). Entre los efectos de las HT en peces, es importante resaltar que son las responsables de disparar la conducta migratoria y el control de la respuesta adaptativa al agua salada en salmónidos y posiblemente en otros peces migratorios. Los salmones efectúan dos migraciones, la primera río abajo hacia el mar para habitar ahí durante su vida adulta, la segunda cuando los salmones adultos se dirigen hacia el agua dulce para reproducirse. Durante estas migraciones se observan transformaciones que les permiten adaptarse a las nuevas condiciones salinas. Al conjunto de cambios morfológicos, fisiológicos y

conductuales preparatorios para la migración río abajo se les llama esmoltificación. Se piensa que las HT son la señal endógena para el inicio de ambas migraciones (Grau et al. 1981). Durante la esmoltificación se ha observado que los niveles de  $T_4$  circulantes aumentan en forma progresiva y sostenida en el curso de cinco semanas. Al incremento de HT le precede un incremento en la actividad  $Na^+/K^+$ -ATPasa de las branquias, lo cual es parte de la preadaptación al agua salada. La ausencia de este incremento de  $T_4$  se asocia a hipodesarrollo y/o la muerte del organismo (Dickhoff et al. 1978). Se ha demostrado que existe una relación entre el ciclo lunar y los picos de  $T_4$  durante el período preadaptativo (Grau, et al. 1981) (Cuadro 4).

Durante la migración asociada a la reproducción, en ambos sexos ocurre un aumento transitorio y significativo de  $T_3$  y de  $T_4$  (Biddiscombe & Idler, 1983). Cuando el animal entra al agua dulce se alcanzan niveles muy altos de HT y éste decrece en la hembras paulatinamente conforme progresa la maduración de los gametos y el desove. Un incremento de  $T_4$  precede la espermiación en machos. Estos hechos se han interpretado como parte de los mecanismos metabólicos y osmorregulatorios que permiten la adaptación del animal al agua dulce, y que influyen en los procesos de maduración gonadal del salmón (Sower & Schreck, 1982).

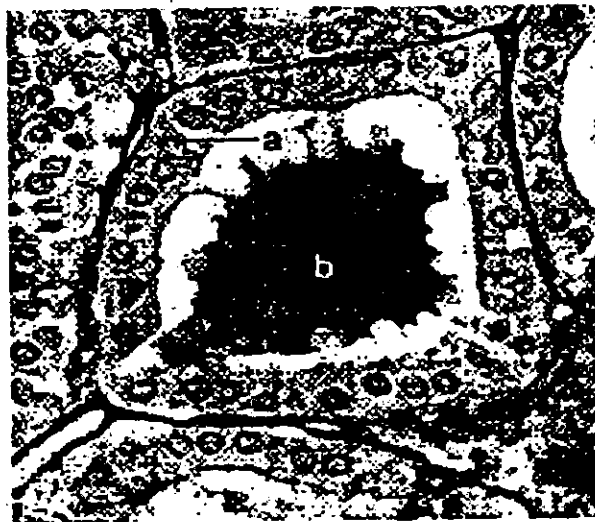
**Cuadro 4. Tironinas Circulantes en Salmones Migratorios**

ESPECIE	ESMOLTIFICACIÓN	MIGRACIÓN
<i>Oncorhynchus kisutch</i>	↑ sostenido y progresivo de $T_4$ , sincronizado por la luna nueva: 18 → 117.4 nmol/L 10.3 → 77.4 nmol/L 6.5 → 43.9 nmol/L	↑ premigratorio de $T_4$ ↑ de $T_4$ al entrar al agua dulce: 2.9 → 6.5 nmol/L
<i>Oncorhynchus nerka</i>		↑ ambas hormonas al entrar al agua dulce: $T_3$ : 1.4 → 10.8 nmol/L $T_4$ : 7.7 → 25.8 nmol/L

Datos originales tomados de: Dickhoff et al. 1978; Grau et al. 1981; Sower & Schreck, 1982; Biddiscombe & Idler, 1983 y Sower et al. 1984.

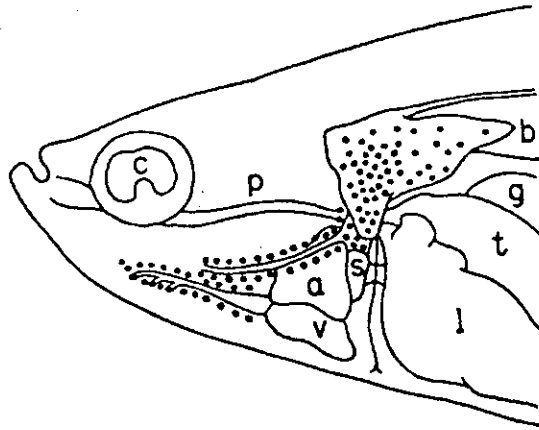


**B. LA GLÁNDULA TIROIDES.** Al igual que en el resto de los vertebrados en la glándula tiroides de los peces, la unidad anatómica y funcional es el foliculo, independientemente de su estado de agregación y distribución (Fig. 13). Esto apoya la idea de la uniformidad de la ultraestructura del tejido tiroideo en los vertebrados (Bentley, 1998). También, como en todos los vertebrados, los tirocitos de los peces: 1) concentran yodo; 2) sintetizan TgB y peroxidasa tiroidea (TPO) y 3) son regulados por la TSH hipofisiaria.



**Figura 13. Estructura de los Foliculos Tiroideos en Peces.** a) tirocitos, b) cavidad folicular.

En los peces, los foliculos no se encuentran agrupados formando una glándula tiroides propiamente dicha, sino que están dispersos formando pequeños racimos de tejido folicular (Gorbman, 1969; Lagler et al. 1977; Matty, 1985). Aunque algunos peces presentan la glándula tiroides encapsulada (vgr; pez loro), en la mayoría de los teleósteos los foliculos tiroideos se encuentran dispersos en la región faringea, su distribución es peri-aórtica (aorta ventral) y en algunos casos puede ser peri-branquial (Fig. 14). En algunos teleósteos, parte de los foliculos pueden migrar a otras regiones del cuerpo, especialmente al riñón y alrededor de las gónadas y desde ahí permanecer funcionales a pesar de su posición (Peter, 1970).



**Figura 14. Localización de los Folículos Tiroideos en Teleósteos.** De izquierda a derecha tenemos: c) ojo, p) faringe, a) aurícula, v) ventrículo, s) seno venoso, b) vejiga natatoria, g) vesícula biliar, t) estómago, l) hígado.

En contraste a lo reportado para el resto de vertebrados, varios estudios han mostrado que los peces secretan primordialmente  $T_4$ . Las evidencias experimentales son las siguientes: 1) los extractos de tiroides de trucha y otros teleósteos contienen niveles muy bajos de  $T_3$  (Kühn, 1993); 2) los niveles circulantes de  $T_4$  se elevan en respuesta a las inyecciones de TSH, mientras que los niveles de  $T_3$  no cambian (Chan & Eales, 1975; Milne & Leatherland, 1980a; Swanson et al. 1988; Inui et al. 1989) y 3) en tejido tiroideo perfundido *in vitro* no hay liberación de  $T_3$  en presencia o ausencia de TSH (Grau et al. 1986).

**C. EJE HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS-TIROIDES.** En contraste con los vertebrados superiores, el control hipotalámico sobre el tejido tiroideo parece ser predominantemente inhibitorio (Ball, 1981; Leatherland, 1988). La somatostatina tiene efecto inhibitorio en el pez dorado (Peter & McKeown, 1975). Se han descrito efectos contradictorios de la hormona liberadora de tirotrópina (TRH) sobre los niveles plasmáticos de las hormonas tiroideas. Mientras que la TRH es ligeramente estimulante en salmónidos (Eales & Himick, 1988), ésta exhibe un efecto inhibitorio en *Poecilia reticulata* (Bromage, 1975). Sin embargo, la mayoría de los estudios han fracasado en la detección de cualquier cambio en la actividad tiroidea disparada por TRH (Gorbman & Hyder, 1973; Dickhoff et al. 1978). En teleósteos la TSH parece ser la hormona reguladora de la función tiroidea y sus

efectos pueden ser imitados por las gonadotropinas de mamíferos (Milne & Leatherland, 1980b ; MacKenzie, 1982; Byamungu et al. 1990).

**D. HORMONAS TIROIDEAS.** Mas del 99 % de  $T_4$  y  $T_3$  en el plasma de peces están unidas a tres diferentes proteínas plasmáticas: ALB, TBPA y TTR (Eales & Shostak, 1985). Es importante resaltar la total ausencia de la TBG en peces. En cuanto a la afinidad de las HT con estas proteínas, se ha observado que la unión es poco estable y muy débil (Refetoff, 1979). La ALB es la proteína que presenta mayor afinidad por la  $T_4$ , uniendo entre el 40 y el 60 % de esta hormona, según la especie de pez. La TBPA y la TTR unen entre el 15 y el 20 % de  $T_4$ . Existe un equilibrio entre la fracción de hormonas libre y la unida, la afinidad de la proteína con la hormona determina la tasa de disociación y ésto a su vez afecta la disponibilidad de las hormonas para su transporte hacia los tejidos. Entre un 5 - 15 % de hormona tiroidea entra a los tejidos mediante difusión pasiva. El resto es transportada por un mecanismo de transporte dependiente de energía como se demostró en la trucha (Refetoff et al. 1970; Riley & Eales 1993, 1994). La actividad fisiológica de las hormonas tiroideas depende de su unión a receptores nucleares formando un complejo que funciona como un factor de la regulación de la expresión de genes. Receptores nucleares a  $T_3$  se han descrito en el hígado, branquias, riñones, hipófisis, eritrocitos y ovarios de varios teleósteos. Estos sitios son saturables y se unen a  $T_3$  con gran afinidad, de manera específica y reversible, por lo que se sugiere que se parecen a los receptores nucleares en mamíferos, aunque aún no exista evidencia de que lo sean (Eales & Brown, 1993). Estos supuestos receptores son al menos 10 veces más afines a  $T_3$  que a  $T_4$ , por lo que la  $T_4$  funciona probablemente como una prohormona como en otros vertebrados. En el lenguado se clonó el cDNA que codifica para el receptor  $\beta$  de HT (TR $\beta$ ) y se observaron rasgos característicos a los de otros TR $\beta$ s en vertebrados (Yamano & Inui, 1995).

**E. METABOLISMO DE HORMONAS TIROIDEAS.** La biodisponibilidad de  $T_3$  está regulada en gran parte por el metabolismo extratiroideo de yodotironinas (Visser et al. 1988). La desyodación del anillo externo de  $T_4$  incrementa la concentración de

T<sub>3</sub>, mientras que por otras vías metabólicas (desyodación del anillo interno, conjugación, desaminación, descarboxilación y rompimiento del enlace éter) se reduce el nivel de T<sub>3</sub>. La existencia de la desyodación en peces fue reportada por Osborn y Simpson desde 1969, quienes encontraron los diferentes productos derivados de la monodesyodación secuencial de T<sub>4</sub> en el plasma de *Pleuronectes platessa*. Posteriormente, se demostró la desyodación *in vivo* en varios peces de agua dulce (Eales, 1972). La conjugación y desaminación de hormonas tiroideas ha sido analizada identificando glucurónidos, sulfatos y diferentes ácidos de las hormonas tiroideas en plasma, orina y bilis de peces inyectados con <sup>125</sup>I T<sub>4</sub> (Osborn & Simpson, 1969; Sinclair & Eales, 1972; Parry et al. 1994). La enzima responsable de la glucuronización en peces ha sido caracterizada (Clarke et al. 1992). Actualmente se estudia el efecto de la glucuronización y de la sulfatación en la actividad desyodativa (Finnsen et al. 1999). El papel de la desaminación ha sido poco estudiado.

## F. DESYODACIÓN

**1. La controversia una o dos vías desyodativas.** El estudio de la desyodación periférica en los peces se inició hace poco más de 17 años (Pimlott & Eales, 1983). La desyodación en peces ha sido ampliamente estudiada en la trucha arcoiris por los grupos de investigación de Eales y Leatherland. Aunque Osborn y Simpson (1969) ya habían identificado los diferentes productos de las vías ORD e IRD en el plasma de lenguado, hasta hace poco sólo se aceptaba la existencia de la vía ORD para la T<sub>4</sub>. Esta idea se sustentaba en las siguientes observaciones: 1) después de la inyección *in vivo* de <sup>125</sup>I T<sub>4</sub> en truchas no se detectaba <sup>125</sup>I rT<sub>3</sub> (Higgs & Eales, 1977); 2) después de la administración *in vivo* de <sup>125</sup>I rT<sub>3</sub> sólo se obtenía como producto de excreción biliar a la rT<sub>3</sub> y no se detectaba la producción de <sup>125</sup>I (Eales & Finnsen, 1991) y 3) la desyodación de T<sub>3</sub> a 12°C fue mínima (Eales, 1979; Shield & Eales, 1986) y muy baja a 20°C (Pimlott & Eales, 1983). En consecuencia sólo se había caracterizado la vía ORD en salmónidos. Estudios *in vitro* en más de treinta especies de teleósteos confirmaron la presencia de la vía

ORD de la  $T_4$  en homogenados de hígado con valores de  $K_m$  en un rango de 1-170 nM (Leatherland et al. 1990).

**2. Caracterización de la D1-ORD y sus inconsistencias.** La controversia respecto a la presencia o no de la actividad D1 en el hígado de peces podría explicarse por las diferencias en los métodos empleados, ya que solamente se utilizaba  $T_4$  como sustrato. En efecto, los estudios iniciales sobre la caracterización de la actividad 5'D en el hígado de la trucha arcoiris utilizando  $T_4$  como sustrato arrojaron resultados contradictorios en cuanto a los valores de  $K_m$ : 190 nM (Shields & Eales, 1986), *versus* 13 nM (Vijayan et al. 1988). En los estudios subsecuentes se identificó que existían dos sistemas enzimáticos. A las llamadas "bajas" concentraciones de  $T_4$  (0.08 - 1.3 nM), se observó desyodación en el hígado, las branquias, y el músculo esquelético; mientras que a "altas" concentraciones de  $T_4$  (1.65 - 2.5 nM) se observaba desyodación en el hígado y en el riñón. Ambas enzimas presentaban diferente sensibilidad a PTU y diferentes mecanismos de reacción. Sin embargo, estas características cinéticas no eran comparables a las reportadas para las desyodasas en mamíferos. La  $K_m$  de la llamada D1 por ser sensible a PTU fue "ultrabaja" (0.098 nM), mientras que la D2, resistente a PTU, mostró un valor de  $K_m$  significativamente mayor al reportado en el resto de los vertebrados (10 nM) (MacLatchy & Eales, 1992). En estudios semejantes y utilizando  $T_4$  como sustrato y analizando diferentes productos de desyodación, se demostró la desyodación  $T_4$  ORD en el hígado, el riñón, el corazón, el cerebro, la branquia y el músculo (MacLatchy & Eales, 1993; Morin et al. 1993). Estudios de la desyodación en riñón de tilapia demostraron que la desyodasa D1 es similar a la respectiva contraparte en mamíferos. Estos estudios apoyan la noción de que el hígado de este pez sólo presenta una enzima con características cinéticas muy parecidas a las de la D2 en mamíferos. Este último grupo argumenta que la D1 no está presente en el hígado de poiquiloterms, incluyendo a los peces (Mol et al. 1993).

**3. Caracterización de la vía IRD.** Basándose en la identificación de rT3 en truchas y tilapias hipertiroideas (Byamungu et al. 1990; Sweeting & Eales, 1992b),

se propuso la existencia de ambas vías de desyodación (IRD y ORD) en teleósteos, como ocurre en otros vertebrados. Posteriormente, se demostró que los niveles circulantes de  $rT_3$  en la trucha arcoiris eran producto de la vía IRD. La caracterización de esta vía desyodativa mostró que se debía a la actividad D3 (Fenton et al. 1997).

**4. Reevaluación de la vía ORD en salmónidos y sus sorpresas.** Recientemente en nuestro laboratorio se realizó la caracterización bioquímica completa de la vía ORD hepática en la trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) y el *Fundulus heteroclitus*. Los resultados de estos estudios y utilizando  $T_4$  y  $rT_3$  como substratos, mostraron que en el hígado de *F. heteroclitus* participan dos enzimas en la desyodación ORD. Así el hígado de la trucha arcoiris y el *F. heteroclitus* expresan una enzima cuyo substrato preferencial *in vitro* es la  $rT_3$  con  $K_m$  alta (180 y 93 nM, respectivamente). Esta enzima es relativamente sensible a inhibición por PTU, tiene un requerimiento bajo de cofactor (5 mM). Todas estas características cinéticas son comparables a la D1 de mamíferos (St Germain, 1994). Además el hígado de la trucha y el de *F. heteroclitus* también presentan otra enzima equiparable a la D2 de mamíferos, ya que tiene como substrato preferencial a la  $T_4$  con una  $K_m$  baja (0.63 y 1 nM, respectivamente), es resistente a la inhibición por PTU y tiene un requerimiento alto de cofactor (25 mM). Este estudio reveló que, en efecto, a diferencia del resto de los vertebrados, en el hígado de estos peces existen dos enzimas que catalizan la vía de activación de las HT. Estas enzimas aún y cuando son comparables a las descritas como tipo 1 y tipo 2 en mamíferos, presentan características peculiares. Por ejemplo, se observó que la eficiencia catalítica de la D1 en el hígado de estos peces es menor y la de la D2 es 50 veces mayor que en el hígado de rata. (Orozco, 1997; Orozco et al. 1997). En el *F. heteroclitus* también se ha caracterizado la vía ORD en branquias y retina (Orozco et al. 2000).

En el cuadro 5 se comparan las características de la D1 y la D2 en peces y en mamíferos.

**Cuadro 5. Parámetros Cinéticos de la vía ORD en el Hígado de Trucha Arcoiris y *F. heteroclitus* respecto a los observados en Mamíferos.**

<b>D1</b>			
	<b>TRUCHA ARCOIRIS</b>	<i>F. heteroclitus</i>	<b>MAMÍFEROS</b>
<b>SUBSTRATO PREFERENCIAL</b>	$rT_3$	$rT_3$	$rT_3$
<b>Km <math>rT_3</math></b>	180 nM	93 nM	500 nM
<b>COFACTOR Km</b>	5 mM	5 mM	5 mM
<b>SENSIBILIDAD A PTU</b>	+	+	++++
<b>Vmáx (pmol<sup>125</sup>I/mg/hr)</b>	28	36	66 000
<b>D2</b>			
<b>SUBSTRATO PREFERENCIAL</b>	$T_4$	$T_4$	$T_4$
<b>Km <math>T_4</math></b>	0.63 nM	1 nM	1-2 nM
<b>COFACTOR Km</b>	25 mM	25 mM	25 mM
<b>SENSIBILIDAD A PTU</b>	-	-	±
<b>Vmáx (fmol<sup>125</sup>I/mg/hr)</b>	200	860	35

5. **Regulación.** A la fecha existen diferentes reportes que describen la respuesta de la actividad desyodativa hepática a diferentes tratamientos experimentales. Es importante destacar que para estos estudios no se utilizaron las condiciones adecuadas en las determinaciones enzimáticas para distinguir entre los dos tipos enzimáticos, por lo que la actividad que se reporta es total, ó 5'D total. El suplemento de  $T_3$  ó de  $T_4$  (12 ppm) en la dieta de la trucha arcoiris durante dos semanas disminuyó en un 25 % la actividad en el hígado, y ésta se anula por completo después de 12 semanas (Eales & Finnsen, 1991; Sweeting & Eales 1992a). En contraste el incremento agudo (48 ppm) de  $T_4$  durante tres días no modificó la actividad 5'D hepática. La administración de GH a truchas arcoiris aumentó significativamente tanto la actividad hepática 5'D como los valores de  $T_3$ .

Los autores proponen que el efecto de la GH sobre los niveles circulantes de  $T_3$  y la actividad desyodativa puede ser directo o bien ocasionado por factores liberados por la GH como las somatomedinas (Milne & Leatherland, 1980b). El efecto de la GH no se observó en cultivos primarios de hepatocitos de trucha por lo que se sugirió que podría deberse a que faltara algún factor adicional en el medio o a que la GH no ejerce un efecto directo en el órgano blanco, sino que esto es a través de otra señal que pudiera ser nerviosa o humoral (Eales & Finnsen, 1991; Sweeting & Eales 1992b). La somatostatina incrementó la actividad 5'D en el riñón e hígado de tilapia (Byamungu et al. 1992). Los autores cuestionan el efecto, ya que la somatostatina es un potente inhibidor de la función tiroidea. El efecto del cortisol en *Salvelinus fontinalis* incrementó la actividad 5'D hepática pero no así los niveles de HT circulantes. Se sugiere que estos resultados contradictorios pudieran deberse a un aumento en la tasa de depuración de la  $T_3$  ocasionado por el cortisol (Vijayan et al. 1988). La administración de prolactina de diferentes especies no modificó la actividad desyodativa a excepción de la prolactina de origen bovino que incrementó significativamente el índice  $T_3/T_4$  (De Luze et al. 1989). El reto osmótico mostró efectos sobre la actividad desyodativa hepática. En efecto, el reto hiperosmótico resulta en una disminución significativa (~3 veces) de la D2 en la trucha arcoiris (Orozco et al. 1998) mientras que el reto opuesto provoca un aumento significativo (~2 veces) en la actividad hepática D2 de *F. heteroclitus* (Orozco & Valverde, 1997). En contraste, la actividad D1 no sufre cambios significativos durante los retos osmóticos (Orozco et al. 1997).

**G. CLONACIÓN DEL cDNA DE LAS DESYODASAS.** En 1997 a partir de riñón de tilapia (*Oreochromis niloticus*) se clonó y caracterizó un cDNA cuya secuencia deducida de aminoácidos mostró los rasgos característicos de la D1 (tD1). Efectivamente esta molécula codifica para una proteína de 248 aminoácidos y presenta el codón TGA que codifica para el aminoácido selenocisteína en la posición 126. En la región 3' no traducida se localizaron dos elementos SECIS. La expresión de esta enzima en células COS-1 mostró la misma especificidad por el sustrato que la D1 nativa:  $rT_3 \gg T_4 > T_3 \text{ sulfato} > T_2$ . En cuanto al efecto de



inhibidores sobre la proteína expresada se observó cierta resistencia a la inhibición por PTU, a yodoacetato y tioglucosa aúrica, comparada con la potente inhibición que ejercen estos compuestos en la D1 de mamíferos. Debido a que el aminoácido que ocupa dos lugares en dirección 3' respecto a la selenocisteína es la prolina en todas las desyodasas D2s y D3s reportadas (insensibles a PTU), incluyendo a la desyodasa tipo 1 clonada del riñón de tilapia (tD1), se realizó una mutación puntual en esta posición para estudiar si a esta propiedad pudiera deberse su insensibilidad a PTU. La enzima mutante presentó una notable disminución en su actividad ORD y un incremento en su actividad IRD pero conservó su relativa resistencia a PTU. (Sanders et al. 1997).

Utilizando una biblioteca de cDNA de *F. heteroclitus*, se clonó y expresó el mRNA que codifica para la D2 en el hígado de esta especie de teleosteo, y se observó que exhibe características funcionales prácticamente idénticas a la D2 reportada en anfibios y mamíferos. El análisis de la secuencia de nucleótidos demostró un alto grado de identidad (65-68%) con las secuencias de la D2 reportadas en la *R. catesbiana*, la rata y el humano. El porcentaje de identidad en la secuencia de aminoácidos fue el mismo. En el marco abierto de lectura se encontró el codon TGA que codifica para la selenocisteína (Valverde et al. 1997). Actualmente se clonó el gen y el cDNA completo de la D2 del hígado de *Fundulus heteroclitus* (Orozco et al. 1999). Estos hallazgos confirman que las desyodasas pertenecen a una familia de selenoproteínas que han sido altamente conservadas en los vertebrados durante la evolución, por su papel tan relevante en la regulación de la bioactividad de las hormonas tiroideas (Valverde et al. 1997; Orozco et al. 1999).

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Hasta 1997, el conocimiento acerca de la D1-ORD indicaba que el hígado de los vertebrados expresaba actividad D1. Sin embargo, existía controversia respecto a la presencia de la D1 en el hígado de los peces, ya que se reportaba que su expresión en este grupo de vertebrados estaba limitada al riñón (MacLatchy & Eales, 1993; Mol et al. 1993. Mol, 1996). Por otro lado, la co-expresión de las desyodasas D1 y D2, sólo se había reportado en el cerebro y la hipófisis de mamíferos (Köhrle et al. 1991).

Recientemente en nuestro laboratorio se caracterizó bioquímicamente la vía ORD en el hígado de peces y se mostró que:

- 1) El hígado de peces teleósteos como la trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) y el *Fundulus heteroclitus* co-expresa actividad D1 y D2 (Orozco et al. 1997, 2000; Valverde et al. 1997).
- 2) La D1 y D2 hepática en peces parecen exhibir mecanismos de regulación diferenciales. Todo esto convierte al hígado de pez en un modelo para estudiar la regulación de la vía de activación de las HT (Orozco et al. 1997, 1998).

Mediante la caracterización bioquímica de la vía ORD en el hígado de *F. heteroclitus* se encontró que la actividad desyodativa equivalente a la D1 es catalizada por una enzima cuya especificidad y afinidad por el sustrato concuerdan con las reportadas para la D1 de mamíferos. El valor de la Vmax para esta enzima en condiciones óptimas de cofactor y sustrato indicó que el nivel funcional de esta D1 de *F. heteroclitus* es menor al reportado en el hígado de rata. Además esta enzima D1 sólo se inhibió un 45 % con la cantidad de PTU (1mM) que bloquea cerca del 100 % de ésta actividad en la rata. Este último hallazgo resultó controvertido y sugirió que podría deberse a diferencias estructurales en la proteína (Orozco et al. 1997).

En base a estos conocimientos y disponiendo de los métodos de la biología molecular se planteó en este trabajo estudiar las características estructurales que podrían ser responsables de las diferencias observadas entre la cinética de la D1 en el hígado de *F. heteroclitus* respecto a la D1 de mamíferos.

Así, esta tesis contribuye de manera importante al conocimiento de las relaciones estructura-función de esta familia de selenoproteínas (D1s), que por su participación en la regulación fina de los múltiples efectos de las hormonas tiroideas están conservadas en los vertebrados estudiados.

## HIPÓTESIS

**EL HÍGADO DEL PEZ TELEÓSTEO *Fundulus heteroclitus* EXPRESA EL DNA COMPLEMENTARIO (cDNA) QUE CODIFICA PARA LA DESYODASA TIPO 1**

## OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

CLONAR Y CARACTERIZAR EL cDNA QUE CODIFICA PARA LA DESYODASA TIPO1 EN EL HÍGADO DE *Fundulus heteroclitus*.

### OBJETIVOS PARTICULARES

1. Describir las características generales de la secuencia de nucleótidos del cDNA clonado.
2. Identificar la presencia y la posición del codón TGA que codifica para el aminoácido selenocisteína (Se-Cys) en el marco abierto de lectura.
3. Identificar la presencia del elemento SECIS en la región 3' no traducida del cDNA (3'UTR) y determinar su estructura secundaria.
4. Deducir la secuencia de aminoácidos para la D1 del hígado de *Fundulus heteroclitus* (fD1).
5. Determinar el porcentaje de identidad de la secuencia de aminoácidos entre fD1 y las D1s de otros vertebrados.
6. Identificar la presencia de los residuos de histidina en las posiciones 158 y 174, los cuales se ha reportado que son críticos para la función de la enzima.

## MATERIAL Y MÉTODOS

En este capítulo se presenta el conjunto de los métodos empleados para la clonación del DNA complementario que codifica para la desyodasa tipo 1 en el hígado de *F. heteroclitus*. Para cada uno de estos métodos se describirá de manera general el fundamento y posteriormente se identificarán los pasos del procedimiento que se siguió en el laboratorio, indicando los materiales específicos y las condiciones bajo las cuales se realizó cada prueba (generalmente en un diagrama de bloques). En la Figura 15 se muestra un diagrama que resume el proceso general que se siguió en el laboratorio para la clonación de éste. A continuación se describen cada una de estas etapas.

### I. ANIMALES

***Fundulus heteroclitus***. Se utilizaron *F. heteroclitus* machos, de 2 a 5 g de peso. Los organismos se capturaron en el río Matanzas en el estado de Florida, E. U. A., y posteriormente se mantuvieron en estanques con agua de mar, alimentados *ad libitum* con pellets comerciales en el laboratorio Whitney de la Universidad de Florida. Los peces se mantuvieron en condiciones de temperatura constante, bajo ciclos luz oscuridad 14:10 (luces encendidas de 6:00 AM a 8.00 PM). Los animales se sacrificaron por decapitación, se les disecó y extirpó el hígado, el cual se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido, y se almacenó a -70°C hasta su análisis.

### II. EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL

Para la obtención del RNA hepático del *F. heteroclitus* se siguió una modificación al método de extracción de RNA de un solo paso (Chomczynski & Sachi, 1987). El método utiliza el reactivo de Trizol (GibcoBRL), que contiene fenol e isotiocianato de guanidina. El isotiocianato de guanidina es un agente desnaturante que permite la separación del RNA a partir de tejidos con alto contenido de ribonucleasas endógenas. El RNA se extrae debido a que se solubiliza en una solución acuosa que contiene isotiocianato de guanidina 4M a pH

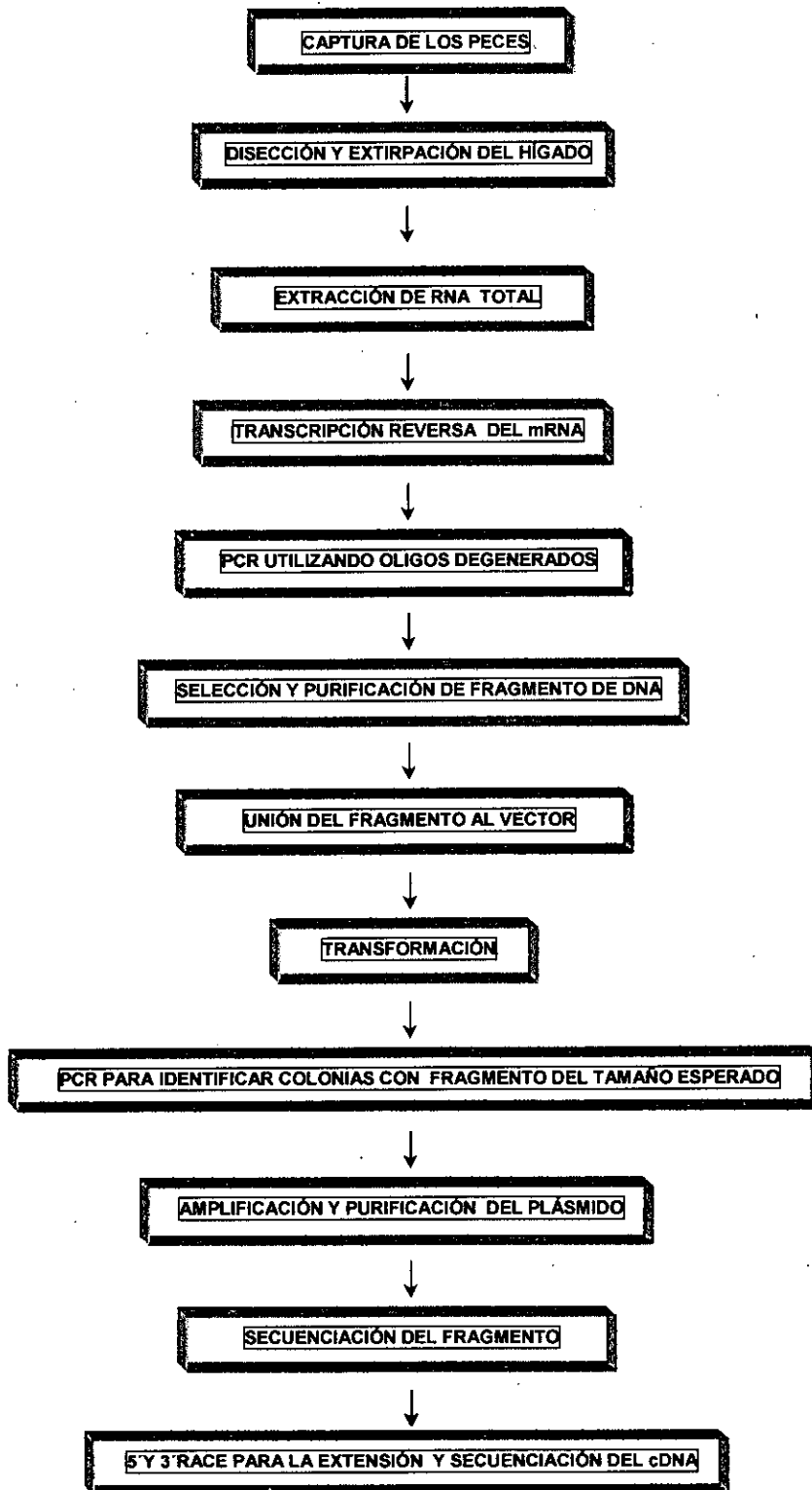


Figura 15. Pasos Generales para la Clonación y Caracterización del cDNA que Codifica para la Desyodasa Tipo 1 en el Hígado de *F. heteroclitus*

4, en presencia de una fase orgánica de fenol/cloroformo. Bajo estas condiciones ácidas, la mayoría de las proteínas y de los fragmentos pequeños de DNA (50 – 10 kb) permanecen en la fase orgánica, mientras que el DNA de elevado peso molecular y algunos residuos de proteínas se encontrarán en la interfase. Posteriormente el RNA obtenido en la fase acuosa se purifica mediante precipitación con isopropanol, lavado del precipitado con alcohol y finalmente se redissuelve el pellet de RNA en agua. En la Figura 16, se presentan los pasos generales del procedimiento.

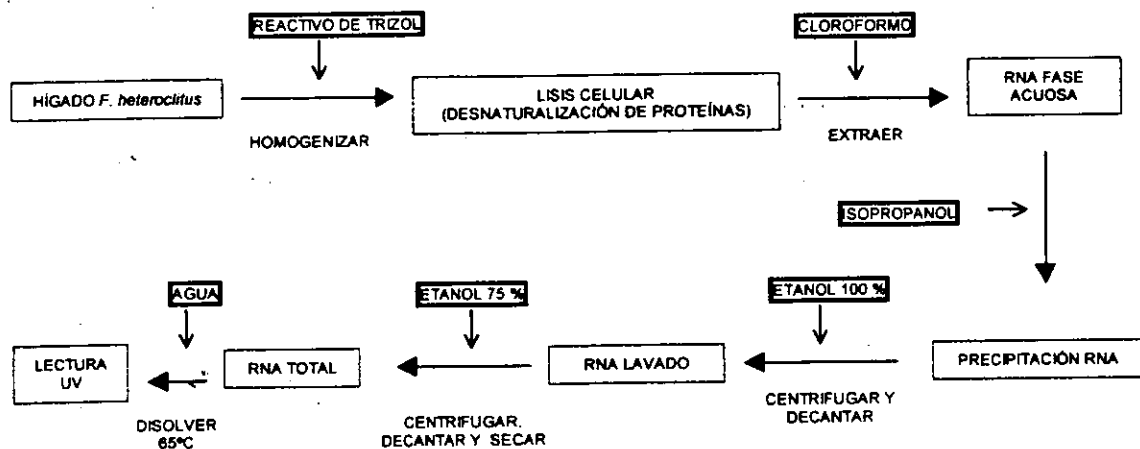


Figura 16. Procedimiento para la Obtención de RNA Total del Hígado de *F. heteroclitus*.

### III. OBTENCIÓN DEL DNA COMPLEMENTARIO (RT)

El método empleado para la obtención de cDNA utiliza la enzima transcriptasa reversa (RT). La transcriptasa reversa sintetiza cDNA a partir de mRNA, y como otras polimerasas requiere un templado y un iniciador. Aprovechando que en eucariotes el mRNA contiene un su extremo 3' una cola de residuos del ácido desoxiadenílico (dATP), se utilizan como iniciadores cadenas de residuos de ácido timidílico (oligo dT) que son complementarias a las colas de dATP. Así, en presencia de los cuatro nucleótidos (dNTPs), el mRNA y el oligo dT, la transcriptasa reversa sintetiza la cadena de cDNA hasta alcanzar el extremo 5' del mRNA. Al final de esta reacción se obtienen híbridos mRNA/cDNA.



Posteriormente por tratamiento enzimático con la ribonucleasa H (RNAsa H), se degrada selectivamente el RNA mensajero de los híbridos hasta oligonucleótidos, quedando solamente las cadenas sencillas del cDNA. En este estudio se utilizó RNA total como templado para la transcripción reversa. El oligo dT empleado (PA 142), contiene además de la secuencia poli (T) una secuencia accesoria diseñada para ser utilizada posteriormente en las ampliaciones de extremos los 3' del cDNA (3' RACE), (Cuadro 6).

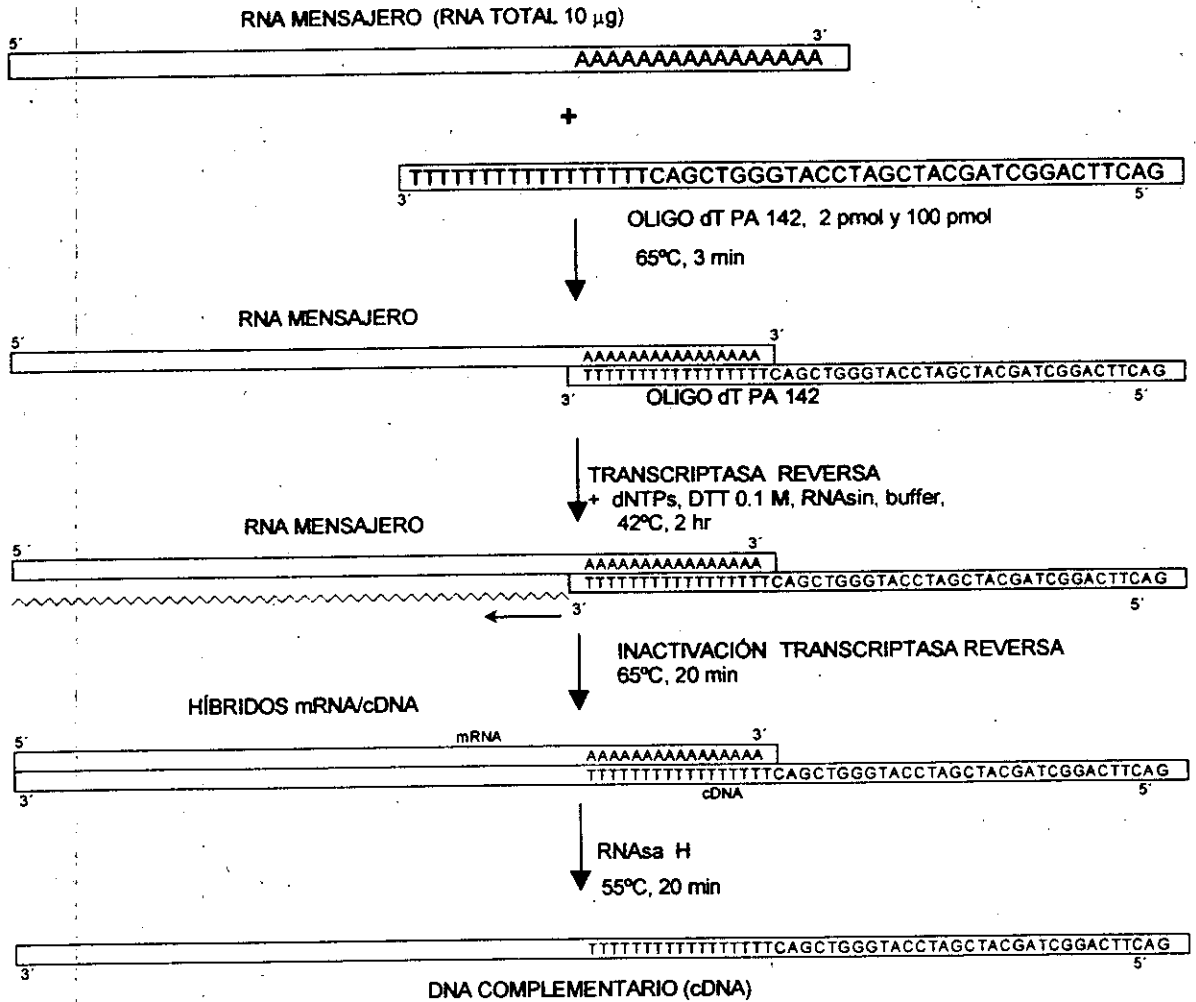
**Cuadro 6. Secuencia de Nucleótidos del Iniciador PA142 (oligo dT) Empleado para la Síntesis de cDNA**

5' TTC AGG CTA GCA TCG ATC CAT GGG TCG ACT TTTTTTTTTTTTTTTTTT 3'
--

De esta forma a partir del RNA total extraído del hígado de *F. heteroclitus* se logró obtener el cDNA correspondiente a todos los transcritos (mRNA) presentes en el momento de la disección del tejido. El cDNA resultante por ser más estable permitió continuar con las etapas subsecuentes de la clonación. La figura 17, resume el procedimiento seguido para la transcripción reversa.

#### **IV. AMPLIFICACIÓN DEL cDNA PARA LA DESYODASA TIPO 1 (RT-PCR Touchdown)**

La amplificación del fragmento inicial del cDNA que codifica para la D1 en hígado de *F. heteroclitus* se realizó siguiendo el método de RT-PCR Touchdown. El método utiliza como templado el producto de la transcripción reversa. Como iniciadores para este PCR se diseñaron los oligonucleótidos degenerados DI-1 y DI-2 a partir de secuencias de aminoácidos conservadas para la D1 en diferentes especies (Cuadro 7). La zona seleccionada para el diseño de uno de los oligos degenerados contiene el aminoácido selenocisteína, característico en esta familia de enzimas. La razón por la cual se diseñaron oligos degenerados como iniciadores fue para contar con todas las posibles combinaciones de oligonucleótidos que puedan codificar para los aminoácidos de las zonas consenso seleccionadas. Debido a esto el PCR se corrió bajo un esquema de descenso en



**Figura 17. Síntesis de cDNA.** Mediante la transcriptasa reversa se extiende el oligo dT PA142 para obtener el cDNA contenido en las células en estudio.

la temperatura de alineación del iniciador (touchdown), que abarca desde la combinación de nucleótidos con la temperatura de alineación más alta, hasta la más baja. En este paso además de la amplificación por PCR del fragmento inicial de cDNA que codifica para la D1, los fragmentos producidos se obtuvieron con extremos adhesivos para su posterior inserción en el vector. En efecto, la DNA polimerasa empleada adiciona en el extremo 3' de los fragmentos amplificados un nucleótido dATP (3'A), con lo cual los fragmentos de cDNA producidos son complementarios en sus extremos al plásmido pGEM-T (Promega™), que posteriormente se utilizó para ligar los fragmentos de cDNA, el cual contiene en

los extremos 3' el nucleótido dTTP (3'T). La secuencia de los oligos degenerados DI-1 y DI-2 se presenta en el Cuadro 8.

**Cuadro 7. Secuencias de Aminoácidos Reportadas para la D1 en Diferentes Vertebrados.** Las flechas indican la orientación y posición de las secuencias consenso seleccionadas para el diseño de los oligos degenerados.

Tilapia	MFLQKIVVEYSTACMFCYMLGKFLMLVLCFSSLAKEIRVSEITITCERENYEEGLHMLARFKTASSHML	80
Gallo	...LSIRNLIHKHLLIICQTLSSVVEITMILEEDTIRYIKKEEESRNCERKSYENGEHEFGLLIFVKKR	77
Perro	VGLPRPVWERRRWLLEQAVQAVGVVFLKELARVCHVAMNG.....EHSYDNAEIYQYEWEMKVR	75
Rata	VGLSCLWVKRVIFFQVALENATSHVLMTEFERVQNFAMGCTGTRERAPDNVEHEFICQYEWEMKVR	80
Ratón	VGLPCLWVKRVIFFQVALENATSHVLMTEFERVQNFAMGCTGTRERAPDNVEHEFICQYEWEMKVR	80
Humano	VGLPQPQWVKRVIFFQVALENATSHVLMTEFERVQNFAMGCTGTRERASHNTEHEFICQYEWEMKVR	80
Tilapia	SCEAFVGEFSEITDREKTSLSKYLKNSVSE...EPMYIIEKRCVKEISDV...V...A...ST	160
Gallo	EEEAHEREPNTPEANGMCHLFSMPN...E...S...SMIEFENKVK...SSII...II...AV	157
Perro	EDRTTEGLNCFRISGQRNCNIWDEMOEN...V...N...S...L...F...E...C...H...E...S...T...I...I...S...S	155
Rata	EDRAEYGLNCFRISGQRNCNIWDEMOEN...V...N...S...L...E...C...K...R...V...D...A...S...T...I...I...S...S	160
Ratón	EDRAEYGLNCFRISGQRNCNIWDEMOEN...V...N...S...L...E...C...K...R...V...D...A...S...T...I...I...S...S	160
Humano	EDTTEYGLNCFRISGQRNCNIWDEMOEN...V...N...S...M...E...C...R...E...S...S...I...I...S...S	160
Tilapia	...KNYDENCOS...E...L...S...CV...VOSE...L...V...E...ITVTIK...G...E...F...I...L...A...K...V...L...G...E...G...N...A...V	240
Gallo	...RN...V...E...K...N...R...S...E...E...K...T...C...P...C...C...R...N...L...I...T...R...E...N...I...S...S...K...A...E...Y...I...L...A...N...V...I...G...W...N...H...C...I	237
Perro	...KNVNI...R...T...Q...T...C...E...L...C...R...I...L...D...R...A...P...V...V...T...R...N...C...S...S...C...E...A...E...F...V...L...E...R...I...L...K...E...N...H...E...V	235
Rata	...KNVDL...R...C...R...S...C...E...L...F...H...I...L...A...R...S...C...V...V...T...R...N...C...S...S...C...L...A...E...E...Y...V...I...E...R...I...C...K...A...N...H...E...V	240
Ratón	...KNVDL...R...C...R...S...C...E...L...F...H...I...L...A...R...S...C...V...V...T...R...N...C...S...S...C...L...A...E...E...Y...V...I...E...R...I...C...K...A...N...H...E...V	240
Humano	...KNMDL...R...N...Q...C...E...L...C...H...I...L...A...R...S...C...V...V...T...R...N...C...S...S...C...L...A...E...E...Y...I...E...R...I...L...K...S...N...H...E...V	240
Tilapia	SE...IK	248
Gallo	AV...IK	245
Perro	AV...EHS	244
Rata	AV...LCIPPGHMPQF	257
Ratón	AV...LCIPPRHVPQL	257
Humano	AV...EHS	249

**Cuadro 8. Características de los Oligos Degenerados DI-1 y DI-2**

SECUENCIA DE NUCLÉOTIDOS DEL OLIGO DEGENERADO DI-1																					
5'	T	T	Y	G	G	N	W	S	N	T	G	Y	A	C	N	T	G	A	C	C	3'
SECUENCIA DE NUCLÉOTIDOS DEL OLIGO DEGENERADO DI-2																					
3'	G	A	Y	G	G	N	T	G	G	G	C	N	T	T	Y	A	A	R	A	A	5'
EN DONDE: N=4(AGCT), Y=2(CT) W=2(TA) S=2(CG) y R=2(AG)																					

## V - PURIFICACIÓN DE DNA DE UNA MATRIZ DE GEL DE AGAROSA

Para la purificación del DNA en el gel se utilizó el sistema de extracción de DNA CONCERT™ Gel (GibcoBRL), que se basa en la adsorción del DNA en un soporte poroso de sílica. Primero la agarosa es disuelta con perclorato de sodio, para liberar el DNA de la matriz semisólida de agarosa y así queda disponible para ser adsorbido en el soporte de sílica. La adsorción del DNA es dependiente de la temperatura y composición de los amortiguadores empleados. Posteriormente la agarosa y el amortiguador empleado en la electroforesis son removidos mediante el lavado del soporte de sílica con amortiguadores conteniendo alcohol. Al final el DNA es eluído con un amortiguador Tris-EDTA (TE). El procedimiento se resume en la Figura 19 y se siguió para la obtención de los diferentes fragmentos del cDNA.

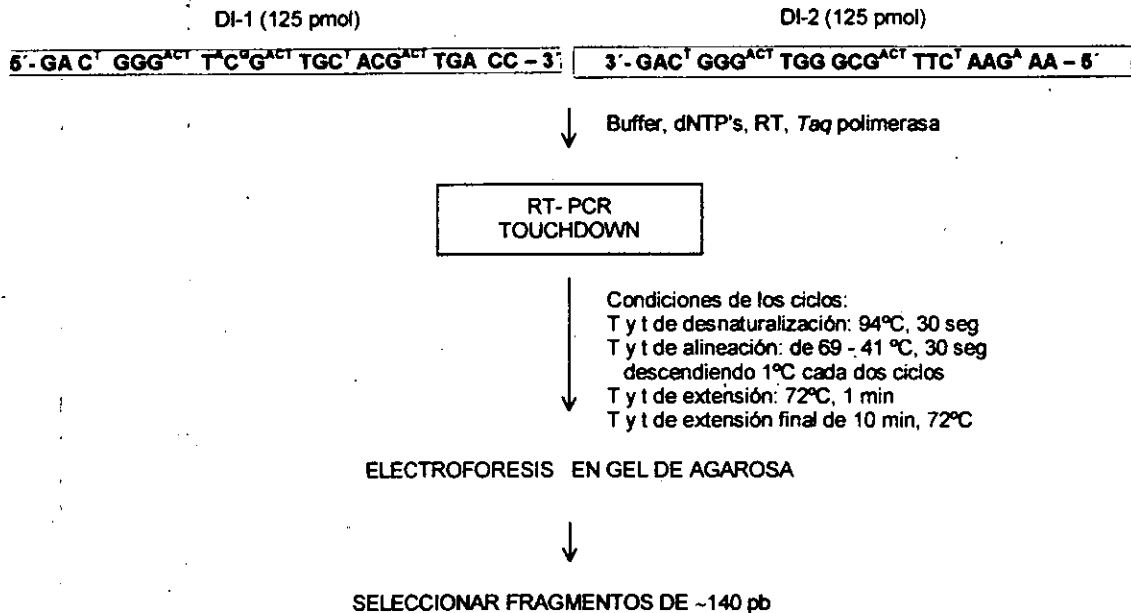


Figura 18. Obtención del Fragmento Inicial del cDNA que Codifica Para la D1 (RT-PCR Touchdown)

## VI. VECTOR

La clonación del cDNA de hígado de *F. heteroclitus* se realizó utilizando el plásmido pGEM-T que es un vector abierto con la enzima *Eco* RV, al cual posteriormente se le adiciona en ambos extremos 3' un nucleótido dTTP. Como se mencionó antes, estos extremos son complementarios con los fragmentos de cDNA obtenidos por la enzima polimerasa empleada en el RT-PCR (*Taq* polimerasa, GibcoBRL), la cual tiene la propiedad de adicionar un nucleótido dATP en el extremo 3' del fragmento amplificado, independientemente del tipo de templado. De esta forma se reúnen las características de complementaridad que permiten la inserción de fragmentos de DNA compatibles mediante la enzima T4 DNA Ligasa (Promega GibcoBRL).

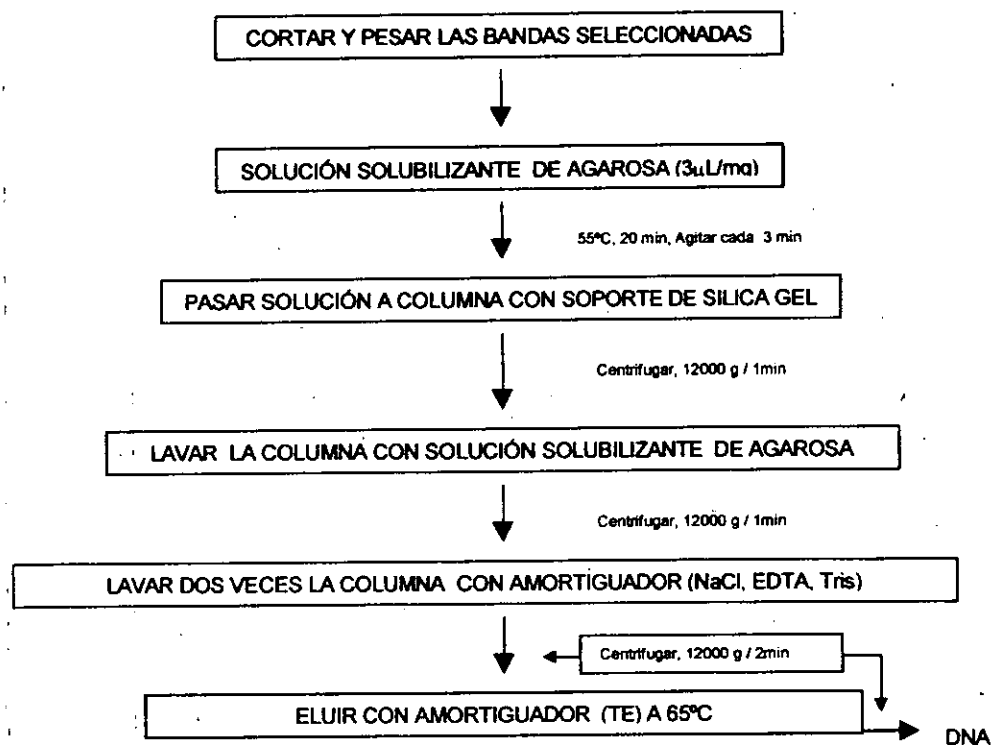


Figura 19. Procedimiento Para la Purificación de DNA en gel de Agarosa

El plásmido pGEM-T tiene en los extremos del sitio de clonación múltiple los promotores T7 y SP6 de la RNA polimerasa y múltiples sitios de restricción. Dentro del gen que codifica para el péptido  $\alpha$  de la enzima  $\beta$ -galactosidasa se encuentra el sitio de clonación múltiple, lo que permite identificar por  $\alpha$ -complementación las clonas recombinantes (colonias blancas) de las no recombinantes (colonias azules). El pGEM-T utiliza como iniciadores oligonucleótidos complementarios a la región contigua al sitio de clonación, lo cual facilita la secuenciación en ambas direcciones. Además, el pGEM-T tiene el gen para la  $\beta$ -lactamasa que le confiere resistencia a la ampicilina, (Fig. 20).

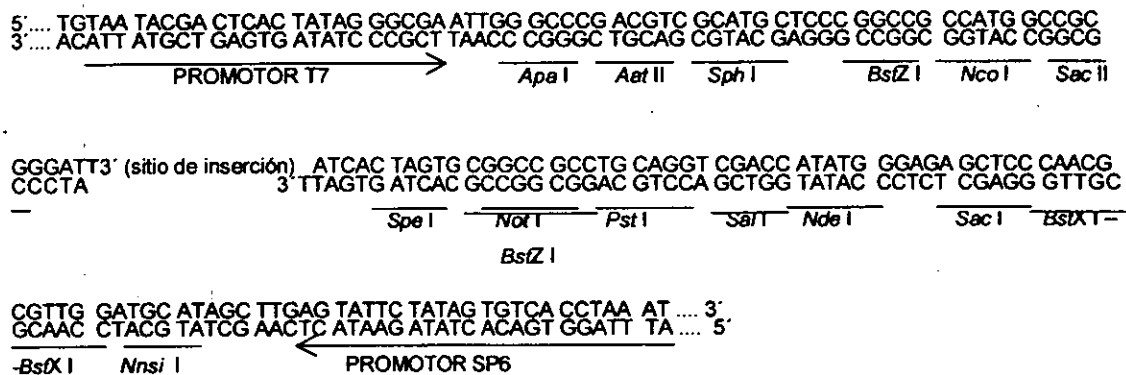


Figura 20. Promotores, Sitios de Restricción y Sitio de Inserción en el pGEM-T

## VII. LIGACIÓN

Los métodos para ligación del DNA en vectores se basan en la complementaridad de los extremos del vector y del fragmento. Para lograr esta complementaridad se utilizan enzimas de restricción o la adición de nucleótidos en tales extremos. Una vez que se tiene esta propiedad se utiliza la enzima DNA ligasa del fago 4, la cual cataliza la unión covalente de fragmentos de DNA complementarios formando un enlace fosfodiéster entre extremos adyacentes 5'P y 3'OH de una cadena de DNA. La reacción de ligación consume ATP. En este trabajo la unión de los fragmentos de cDNA en el plásmido pGEM-T se basó en la complementaridad de los extremos adhesivos (3'T) del vector y (3'A) de los

fragmentos a clonar. Así en presencia de la T4 DNA ligasa y ATP quedan unidos el plásmido y el fragmento de DNA, (Fig. 21).

### VIII. TRANSFORMACIÓN

La transformación se refiere a la introducción de DNA plasmídico en bacterias o levaduras. Existen diferentes métodos para la introducción de plásmidos en bacterias. El método que se utilizó para la transformación se basa en la introducción del DNA recombinante en una célula receptora mediante la permeabilización de la membrana celular por tratamiento con  $Ca^{2+}$  y cambios de temperatura. En este trabajo el DNA recombinante se introdujo en células competentes de la cepa DH5 $\alpha$  de *E. coli*. Las células competentes (permeabilizadas) se prepararon utilizando el método de cloruro de calcio y fueron transformadas por choque térmico, (Fig. 22).

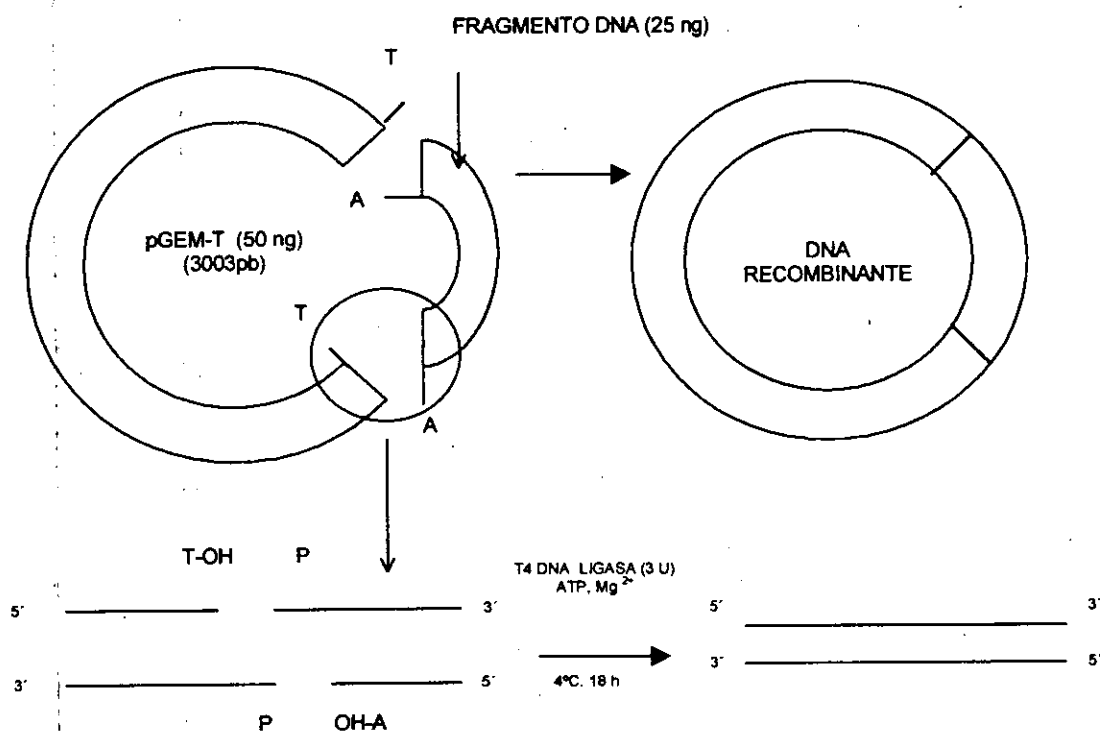


Figura 21. Ligación del cDNA en el Plásmido pGEM-T

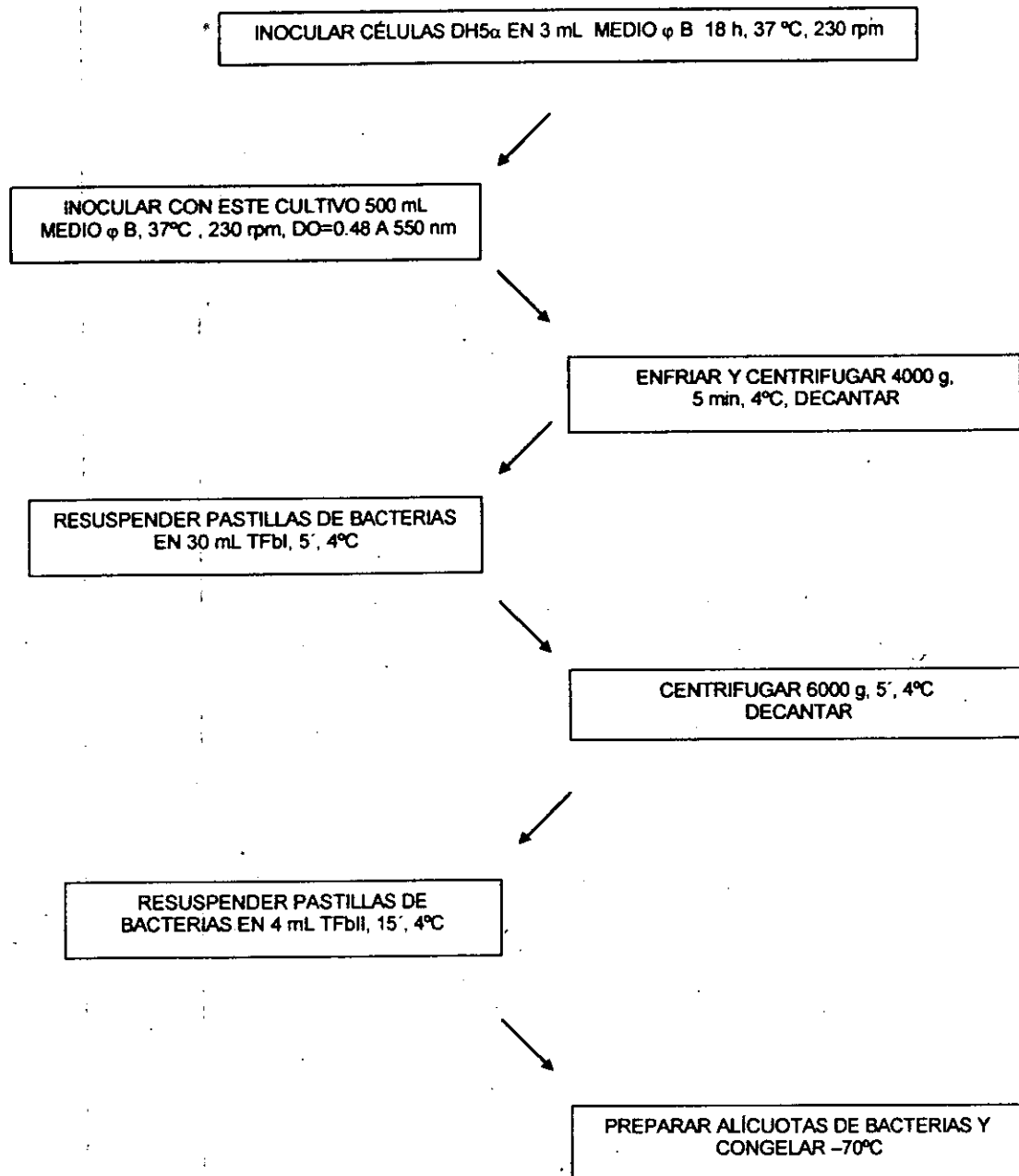


Figura 22. Preparación de Células Competentes

Para la transformación de las células competentes se siguieron los siguientes pasos (Fig. 23).



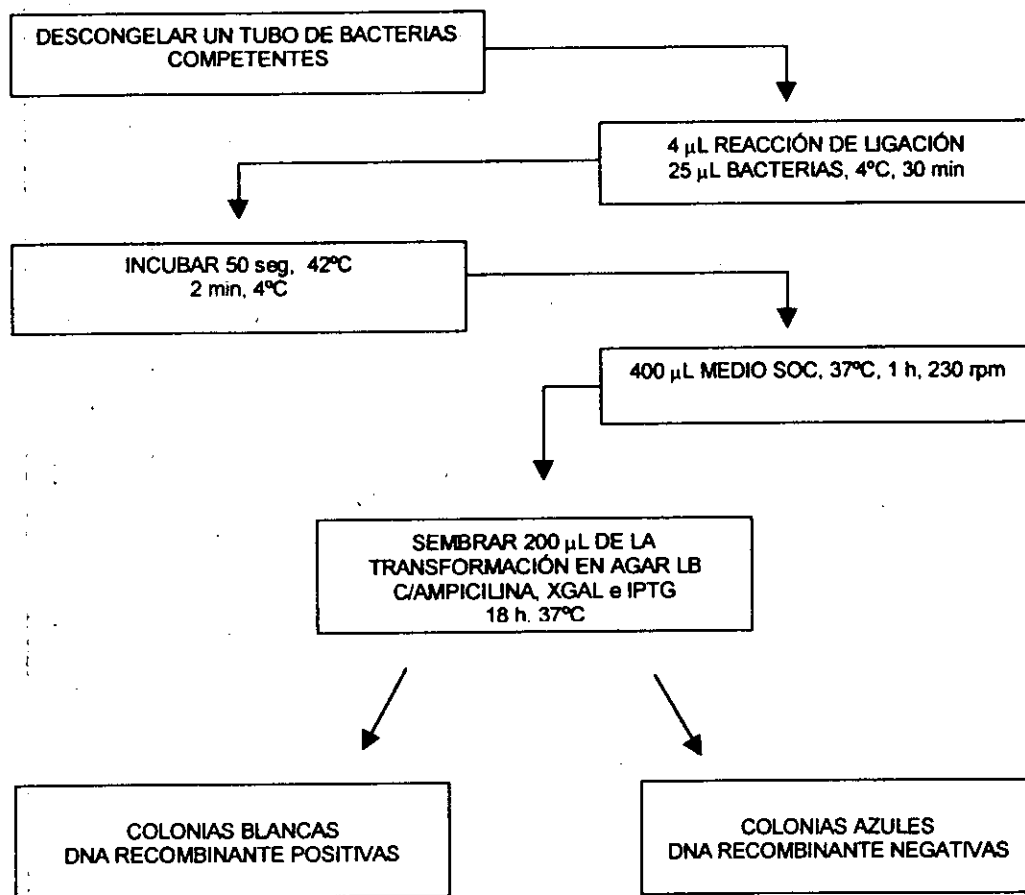
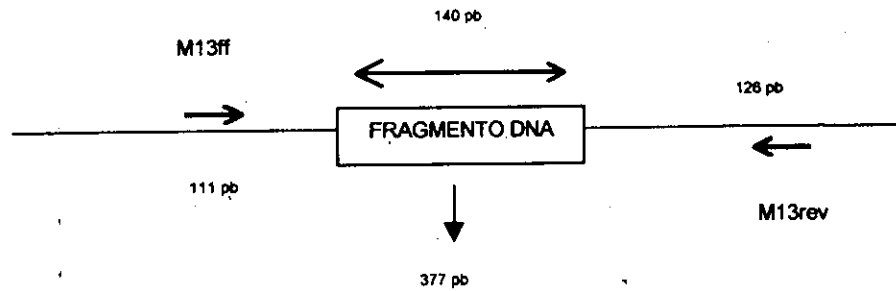


Figura 23. Transformación de Células Competentes

## IX. TAMIZAJE DE COLONIAS BLANCAS POR PCR

Como un segundo tamizaje de colonias blancas y para corroborar que las colonias contengan el fragmento del tamaño esperado se realizó, una amplificación por PCR del fragmento clonado utilizando como iniciadores oligonucleótidos específicos del plásmido M13ff (S) y M13rev (AS), y como templado las colonias blancas. Los iniciadores amplifican la zona en donde se inserta el fragmento y a los fragmentos de DNA amplificados con éstos deberán adicionárseles 237 pb que se copian de los extremos del vector, (Fig. 24). Por ejemplo, en el caso de la inserción del fragmento inicial (140pb) del cDNA de *F. heteroclitus*, las bacterias que contuvieran este plásmido deberían amplificar un fragmento de 377 pb. Para realizar este PCR se seleccionaron al azar por lo menos 5 colonias blancas de

cada placa, y se corrieron 35 ciclos con las siguientes condiciones: temperatura de desnaturalización 94°C durante 40 seg; temperatura de alineación 55°C durante 40 seg y temperatura de extensión 72°C durante 1 min.



**Figura 24. Posición de lo Iniciadores M13ff y M13rev Empleados para PCR de Colonias**

Las colonias que contenían el fragmento de interés se identificaron después de correr el producto del PCR en gel de agarosa utilizando un marcador de peso de DNA para comparar los tamaños de los fragmentos amplificados. Las colonias seleccionadas se estriaron en agar LB con ampicilina y se crecieron durante toda la noche a 37°C. De este cultivo se preparó el miniprep que se describe enseguida.

## **X. PURIFICACIÓN DEL PLÁSMIDO (miniprep)**

Para el aislamiento de pequeñas cantidades de DNA plasmídico a partir de bacterias (miniprep), se utilizó una modificación al procedimiento de lisis alcalina (CONCERT™, GibcoBRL). El método utiliza dodecil sulfato de sodio (SDS) en presencia de NaOH para desnaturalizar las proteínas bacterianas y el DNA cromosómico y del plásmido. La mezcla es neutralizada con acetato de potasio y clorhidrato de guanidina con lo cual precipitan las proteínas y el DNA cromosómico, mientras que el DNA del plásmido se realinea y es adsorbido selectivamente en columnas con un soporte de sílica gel. Pasando a través de la columna soluciones con amortiguadores conteniendo alcohol se elimina el resto de detritos celulares.

Finalmente el DNA del plásmido se eluye con amortiguador Tris, EDTA a 65°C (TE).

En el laboratorio las colonias con el fragmento del tamaño esperado se inocularon en 5 mL de medio LB líquido con ampicilina y se crecieron durante 18 hrs a 37°C, con agitación de 230 rpm. Después de separar el medio de cultivo por centrifugación la pastilla de bacterias se trató siguiendo el método del sistema CONCERT™, (Fig. 25). La cuantificación del DNA obtenido se realizó por absorción UV y para corroborar su tamaño se corre en gel de agarosa.

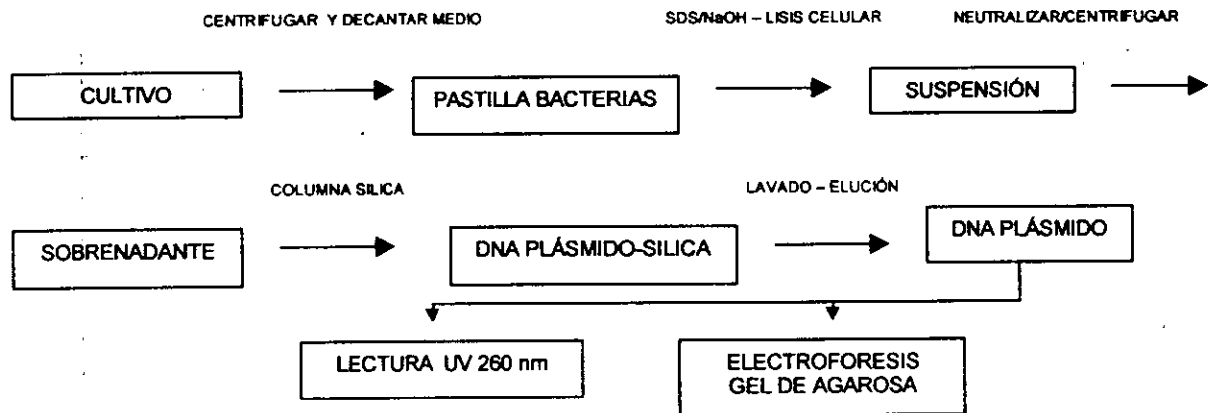


Figura 25. Pasos Generales del Miniprep

## XI. SECUENCIACIÓN DE LOS FRAGMENTOS CLONADOS

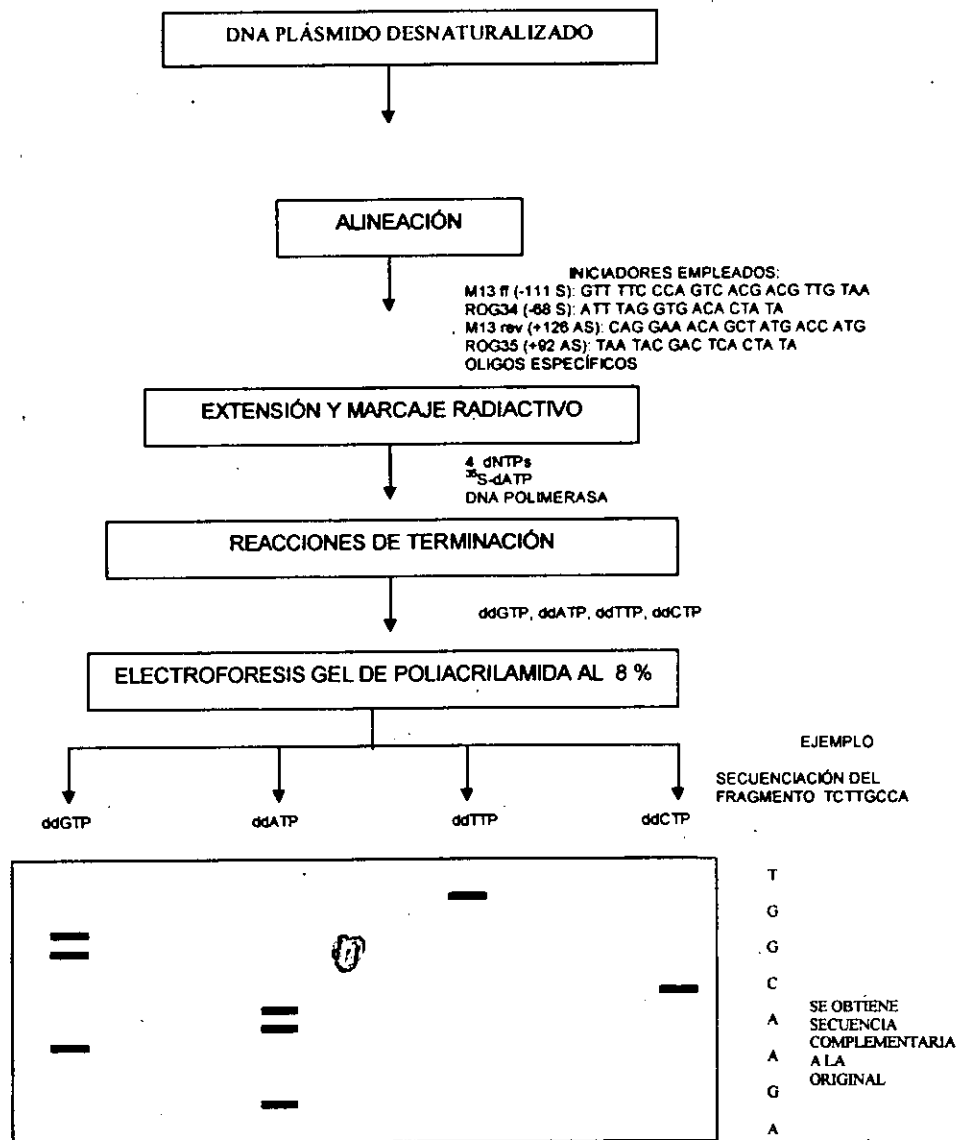
Para la secuenciación de fragmentos de DNA, se siguió el método de Sanger que se basa en la síntesis enzimática de DNA, terminando la cadena específicamente con 2', 3'dideoxinucleótidos (ddNTPs) como análogos de los dNTPs. Los ddNTPs se incorporan a la cadena de DNA; pero impiden la formación del enlace fosfodiéster con el siguiente nucleótido debido a la falta del grupo OH en la posición 3' de la ribosa, interrumpiendo el alargamiento del DNA. El método requiere un dNTP marcado radioactivamente; DNA polimerasa; un iniciador; el templado de DNA por secuenciar, y los 4 ddNTPs. Se realiza en cuatro reacciones; en cada una sólo se incluye uno de los ddNTPs. Así la reacción que incluye los 4

dNTP's (con uno de los 4 marcado) y ddATP al polimerizar se obtiene de esta reacción una serie de cadenas de DNA terminadas específicamente en cada dATP.

El procedimiento se realizó en cuatro pasos: 1) desnaturalización del plásmido, para producir cadenas sencillas de DNA; 2) Alineación del iniciador con las cadenas sencillas del templado; 3) extensión y marcaje radiactivo de la cadena complementaria con DNA polimerasa; y 4) adición de ddNTPs (reacción de terminación). Para la ejecución de los pasos 2-4 se utilizó el sistema de reactivos Sequenase™ de Amersham, y se utilizó como marcador radioactivo <sup>35</sup>S-dATP. Para la desnaturalización del plásmido se siguieron los protocolos estándar, en donde se usan soluciones alcalinas, precipitación con acetato de sodio, y lavados con alcohol. Después el DNA se suspendió en agua. Los iniciadores empleados para la extensión del DNA fueron oligos específicos a la secuencia que flanquea el fragmento de DNA insertado en el plásmido u oligos específicos complementarios a los fragmentos clonados. El procedimiento general se presenta en la Figura 26.

## **XII. AMPLIFICACIÓN RÁPIDA DE LOS EXTREMOS DEL cDNA (5' y 3' RACE)**

El método RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) se utiliza cuando se conoce la secuencia de un fragmento del DNA, pero no los extremos 5' y 3'. El RACE se hace realizando dos amplificaciones por PCR consecutivas (nRT-PCR o PCR anidado). Se le llama nRT-PCR, debido a que en el primer PCR se utiliza como templado el producto del RT. Después el producto del primer PCR es utilizado como templado para el segundo. En ambas reacciones se utilizan como iniciadores pares de oligonucleótidos específicos del templado. En base a este principio, a continuación se describen las características específicas de la amplificación hacia los extremos 5', 3' empleadas en este trabajo.



**Figura 26. Determinación de la Secuencia de DNA por el Método de Sanger.** Se siguió este principio, utilizando el juego de reactivos del kit Sequenase. Los iniciadores utilizados (M13ff, ROG35, M13rev y ROG34), son complementarios a la Secuencia contigua al fragmento clonado. También se utilizaron iniciadores específicos del fragmento clonado. El marcaje radiactivo se hizo con <sup>35</sup>S-dATP. Las cadenas resultantes se corren en un gel de poliacrilamida al 8 %, después de exponer el gel en una película radiográfica, se revela y se lee la secuencia.

**A. 3'RACE.** Para extender el cDNA de *F. heteroclitus* hacia el extremo 3' se utilizaron un par de oligos específicos que se diseñaron, a partir de la secuencia del fragmento obtenido con los oligos degenerados DI-1 y DI-2. Después se realiza

un nRT-PCR. En el primer PCR se utilizó como templado el producto del RT obtenido con el oligo dT PA142 y como iniciadores un oligo (S) específico complementario a la secuencia clonada y el oligo AS PA140, complementario al adaptador del oligo PA142. Mientras que en el segundo PCR se empleó como templado el producto del primer PCR y como iniciadores el segundo oligo específico, (S) y el oligo PA141 (AS), complementario al oligo PA140.

**B. 5'RACE.** Para extender la secuencia del mensajero hacia el extremo 5', primero se preparó un RT, utilizando como templado el RNA total y como iniciador un oligo específico diseñado a partir de la secuencia inicial del fragmento D1/D2. Al cDNA obtenido en esta reacción se le adicionó en el extremo 3' una cola de ácido desoxicidílico (dCTP) mediante la enzima transferasa terminal. Después de purificar el producto de la reacción de adición se utilizó éste como templado para realizar el primer PCR y como iniciadores se emplearon el oligo específico con el que se obtuvo el RT y el MCJ8. El oligo MCJ8 tiene una cola de ácido desoxiguanílico (dGTP) más una secuencia adaptadora. El producto del primer PCR como se ha mencionado, se utilizó como templado del segundo PCR, y como iniciadores se utilizaron el oligo PA141, complementario a la secuencia adaptadora del oligo MCJ8 y otro iniciador específico AS en posición río arriba respecto al primero (Fig. 27).

### **XIII. ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS**

Para el análisis de las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos obtenidas en este trabajo se utilizaron los programas DNAMAN, GENRUNNER, GenBank y MFOLD.

### 3'RACE



### 5'RACE

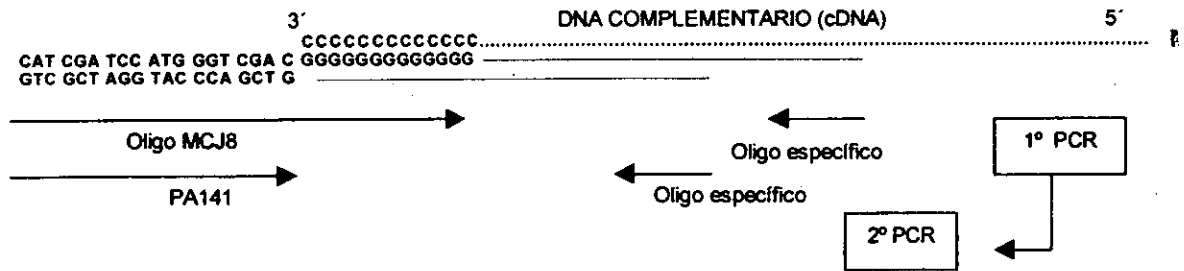


Figura 27. Amplificación de los Extremos 3' y 5' del cDNA de la D1 de *F. heteroclitus*

## RESULTADOS

Debido a la naturaleza de este estudio en este reporte sobresalen los resultados de los métodos que se basan en la amplificación de fragmentos de DNA mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Por lo cual, gran parte de los resultados corresponden a las imágenes obtenidas de los productos amplificados en estas reacciones después de su electroforesis. En esta sección también destacan los resultados de los programas que utilizamos para el análisis de las secuencias obtenidas. Cabe señalar que sólo se presentan los resultados que fueron decisivos para alcanzar los objetivos planteados. En todos los casos las figuras seleccionadas son representativas de varias repeticiones.

### I. EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL

El rendimiento y pureza UV del producto de la extracción de RNA total (toRNA) a partir de hígado de *F. heteroclitus* se presentan en el Cuadro 9. Sólo se muestran los extractos que se utilizaron para el RT. Durante la etapa de estandarización del método, el toRNA también se analizó por electroforesis para comprobar la presencia de las bandas correspondientes al RNA ribosomal (rRNA) y al mRNA.

**Cuadro 9. Resultados de la Extracción de RNA Total del Hígado de *F. heteroclitus*.**

RELACIÓN D.O. 260nm/280 nm	CONCENTRACIÓN RNA total µg/µL
1.63	4.5
1.62	6.3
1.74	4.9
1.68	4.3

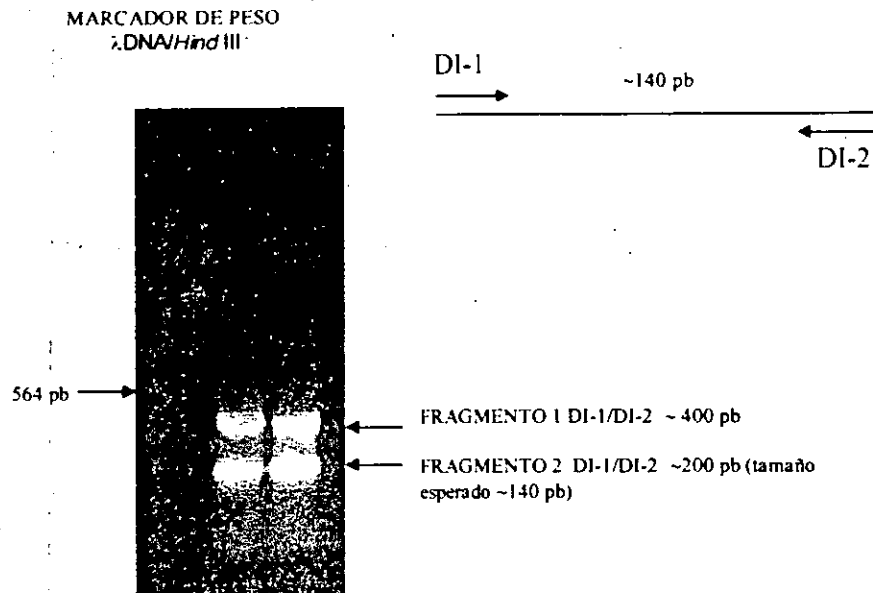


## II. OBTENCIÓN DEL DNA COMPLEMENTARIO (RT)

Para la síntesis de los cDNAs presentes en el toRNA de los hepatocitos de *F. heteroclitus* se hicieron dos reacciones utilizando como iniciadores 2 pmol y 100 pmol del oligo dT PA142, respectivamente. El objeto de utilizar diferente cantidad del oligo dT fue el de probar si la concentración de éste afectaba la eficiencia de la reacción. Para cada RT se utilizó como templado un volumen de toRNA equivalente a 10 µg. En todos los casos las muestras se corrieron contra un control de reactivos. El producto de la transcripción reversa no estuvo sujeto a ningún análisis por UV o por electroforesis.

## III. AMPLIFICACIÓN DEL cDNA CON LOS OLIGOS DEGENERADOS (RT-PCR Touchdown)

Para la amplificación del fragmento inicial del cDNA de la desyodasa tipo 1, se utilizaron como iniciadores 125 pmol de cada uno los oligos degenerados DI-1 y DI-2. Como templado se utilizaron 2 µL del RT, y como se mencionó antes en esta reacción se siguió un esquema de descenso en las temperaturas de alineación (69°C→41°C) cada dos ciclos. En la electroforesis en gel de agarosa al 2 % del producto de esta reacción se observaron dos bandas. La razón por la que se amplificaron estos fragmentos, se debe a que los iniciadores utilizados no son específicos. Como se observa en la imagen no hubo ningún efecto por la cantidad del iniciador (oligo dT) empleado en el RT, ya que los fragmentos amplificados utilizando como templado el RT obtenido con 2 y 100 pmol de oligo dT, fueron iguales. Hasta aquí todo sugería que la banda de menor peso podría pertenecer al fragmento inicial del cDNA de interés. Para conocer la identidad de estos fragmentos, los dos se prepararon para su posterior secuenciación.



**Figura 28. Fragmentos Obtenidos del RT-PCR Touchdown con los Oligos Degenerados DI-1/DI-2.** En el carril 1 se observa el marcador de tamaño del DNA y en el 2 y 3 se presenta el resultado de utilizar como templado el RT obtenido con 2 y 100 pmol respectivamente de oligo dT PA142.

#### IV. IDENTIFICACIÓN DE CLONAS CON FRAGMENTOS AMPLIFICADOS EN EL RT-PCR Touchdown

Los fragmentos de DNA amplificados mediante el RT-PCR Touchdown se insertaron en el vector pGEM-T, y luego se utilizaron para la transformación de células competentes. Las colonias blancas obtenidas en la transformación se tamizaron por PCR, utilizando los iniciadores específicos a la secuencia del vector (M13 ff y M13rev). Se escogieron al azar 5 colonias blancas de cada transformación con el fragmento 1 y 2 respectivamente. En la figura 29, se muestra la electroforesis de los fragmentos amplificados en el PCR de estas colonias en un gel de agarosa al 1%. Como se observa los fragmentos amplificados en las clonas con el fragmento 2 se aproximan a los tamaños esperados y las clonas con el fragmento 1 muestran bandas de mayor peso. El tamaño aproximado de los fragmentos 1 y 2 es de ~637 pb y ~437 pb, respectivamente. Las colonias seleccionadas para la secuenciación se señalan con una flecha.

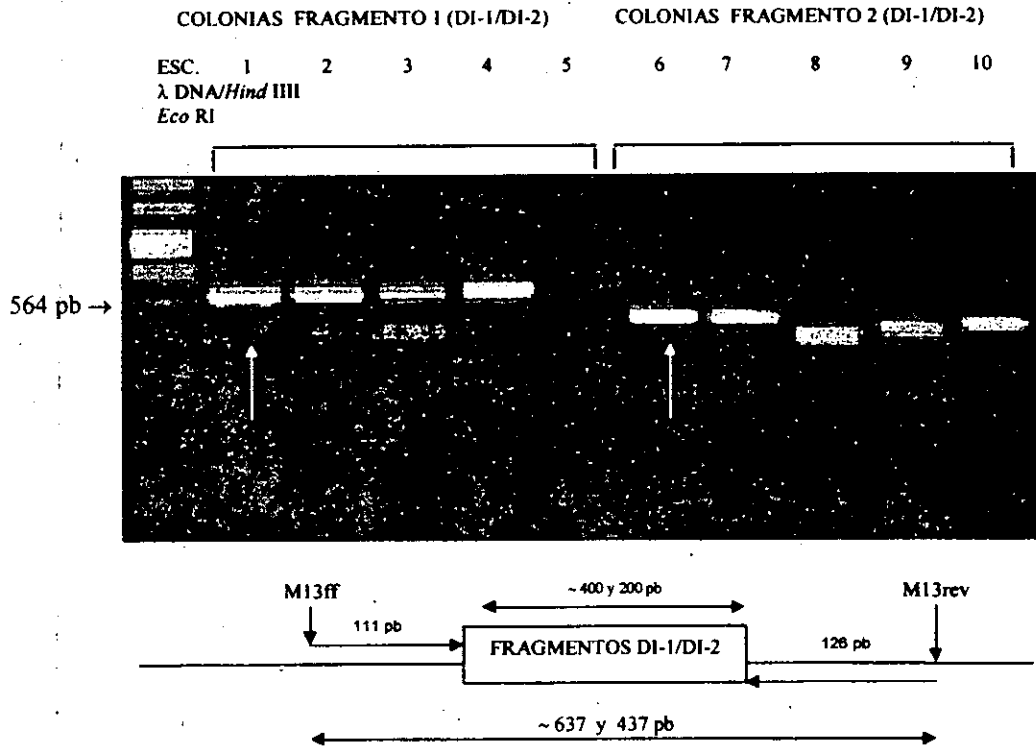


Figura 29. Identificación de Clonas con Fragmentos DI-1/DI-2.

## V. SECUENCIACIÓN DE LOS FRAGMENTOS CLONADOS (DI-1/DI-2)

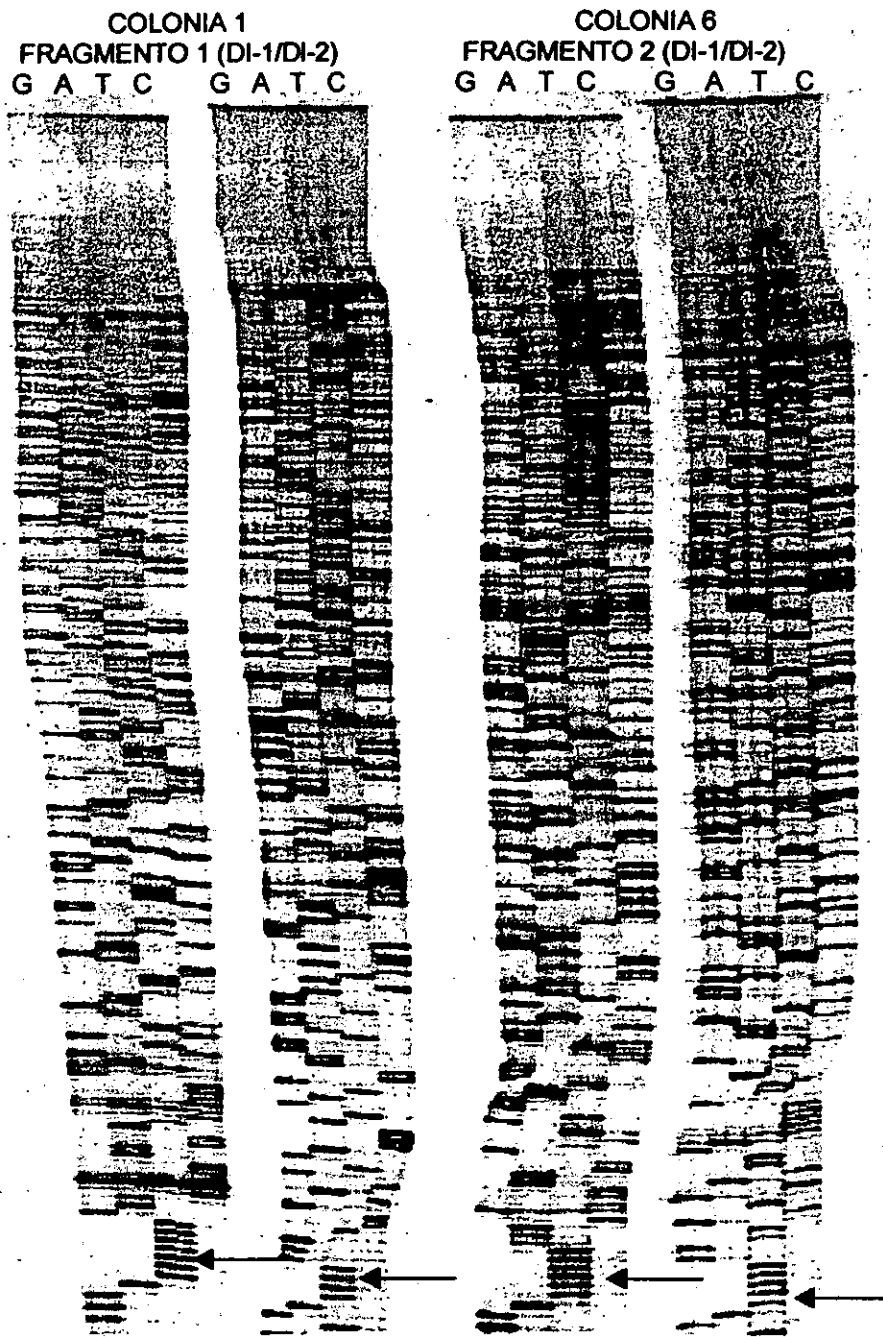
Las clonas seleccionadas se cultivaron y se preparó el correspondiente miniprep. El plásmido purificado se utilizó para preparar las reacciones de secuenciación. Para cada plásmido se prepararon 2 reacciones, una utilizando un iniciador "sense" (M13 ff) y otra con un iniciador "anti-sense" (ROG34) del vector.

El análisis de la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos insertada en el plásmido del fragmento 1, mostró que dicha secuencia no correspondía a la respectiva región de la D1. En efecto después de alinear esta secuencia con las secuencias de aminoácidos de las D1s clonadas en otros vertebrados no se encontró ninguna identidad. Por lo cual el fragmento de mayor peso en el RT-PCR, podría ser un producto inespecífico amplificado por los oligos degenerados.

A partir de la secuencia de nucleótidos del plásmido de la colonia 6 se encontró que la secuencia de aminoácidos obtenida presentó un 85 % de identidad con la secuencia de aminoácidos reportada para este fragmento en la D1 del riñón de tilapia. Lo anterior fue un resultado decisivo para este trabajo, ya que por un lado se confirmó la presencia de la D1 en el hígado de este pez y por otro a partir de esta secuencia se diseñaron los iniciadores específicos que permitieron caracterizar el mensajero completo. En la Figura 30 se muestra que a partir de los sitios de inserción del plásmido de la colonia 6 se identificaron las secuencias de aminoácidos correspondientes a los oligos utilizados para clonar este fragmento (DI-1/DI-2), y que esta secuencia se continuó en ambos extremos con una secuencia homóloga a la D1. En efecto, el análisis de la alineación de este fragmento con la secuencia de aminoácidos deducida a partir de los cDNAs reportados para la D1 mostró que existen las zonas que presentan 100 % de identidad en todas las especies. Estos grupos de aminoácidos conservados incluyen a los que flanquean al residuo Se-cys en el sitio activo de la enzima (FGSCTXP). La identificación de estas secuencias consenso confirmó que el cDNA clonado en este primer paso presenta el codón TGA que codifica para la Se-cys en el sitio activo de la D1 del hígado de *F. heteroclitus* (Fig. 30). A partir de este fragmento se diseñaron oligos específicos para continuar con la secuenciación hacia los extremos 5' y 3' de este mensajero. La secuencia de nucleótidos de los oligos específicos DI-3, DI-4, DI-5 y DI-6 diseñados a partir del fragmento clonado con los oligos DI-1/DI-2, así como su posición y orientación también se muestran en la Figura 31.

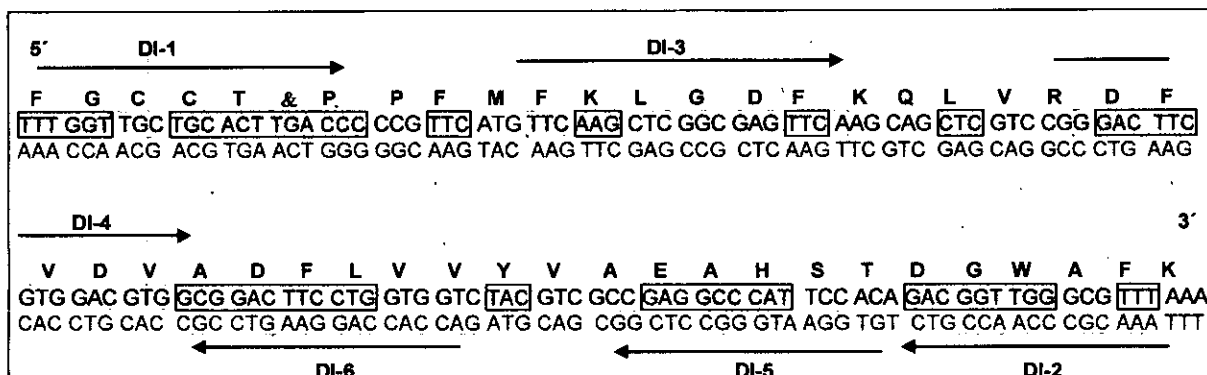
## VI. EXTENSIÓN HACIA EL EXTREMO 3' DEL cDNA (3'RACE)

Para extender el cDNA de *F. heteroclitus* hacia el extremo 3' se utilizaron los oligos específicos DI-3 y DI-4, diseñados a partir de la secuencia del fragmento inicial. Después se realizó un nRT-PCR. En el primer PCR se utilizó como templado el producto del cDNA obtenido con el oligo dTPA142 y como iniciadores el oligo específico DI-3 (S) y el oligo PA140 (AS), complementario al adaptador del oligo PA142. Mientras que en el segundo PCR se empleó como templado el



**Figura 30. Secuenciación de Plásmidos con los Fragmentos DI-1/DI-2.** La colonia 6, presentó el fragmento cDNA que codifica para la secuencia de aminoácidos de la región conservada de las D1's. En las secuencias con M13 ff y ROG34 de la colonia 6 se identificaron las secuencias de aminoácidos codificados por los oligos DI-2 y DI-1 respectivamente. Después de la secuencia de los oligos DI-1 y DI-2 la secuencia continua con la de la D1. Así se obtuvo una secuencia inicial de 140 pb que codifica para el fragmento inicia de la D1 en el Hígado de *F. heteroclitus*. Las flechas indican el inicio de las secuencias precedidas por la secuencia GATT del sitio de inserción del plásmido.

producto del primer PCR y como iniciadores el par de oligos específicos, DI-4 (S) y PA141(AS), complementario al oligo PA140.



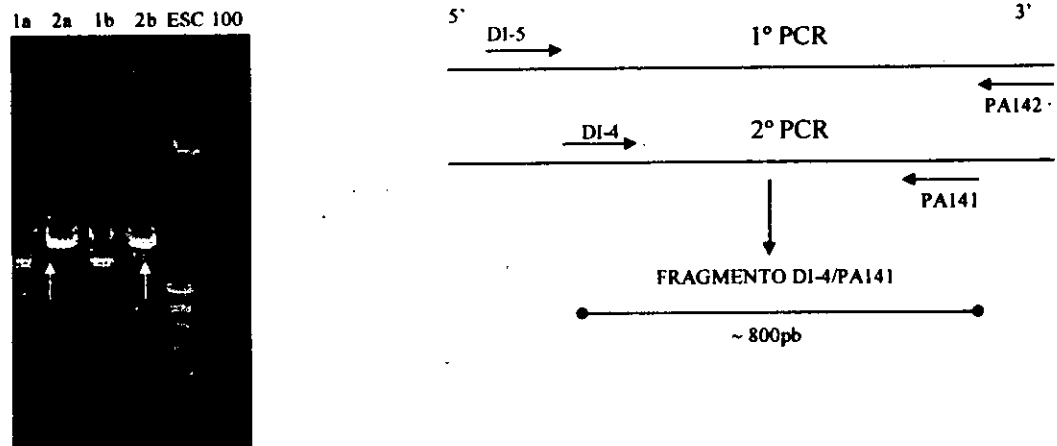
**Figura 31. Secuencia de Nucleótidos y Aminoácidos del Fragmento Inicial del cDNA (139 pb) que Codifica para la desyodasa tipo 1 en hígado de *F. heteroclitus*. Se muestran los oligos degenerados DI-1 y DI-2; y los oligos específicos DI-3, DI-4, DI-5, y DI-6, diseñados para continuar con la secuenciación hacia los extremos 5' y 3' de este mensajero. Las zonas resaltadas con letra roja codifican para aminoácidos idénticos de la D1 reportada en: tilapia, gallo, humano, perro, rata y ratón.**

Los productos del nRT-PCR mostraron en la electroforesis en gel de agarosa al 1 % la presencia de dos bandas en el primer PCR y una banda en el segundo PCR (Fig. 32). El primer y segundo par de bandas corresponden a las reacciones de PCR utilizando como templado el producto del RT obtenido con 2 pmol y 100 pmol del oligo dT, respectivamente. Como vemos lo anterior no ocasionó ningún efecto en los resultados.

El tamaño del fragmento amplificado en el segundo PCR (DI-4/PA141) es de ~800 pb y como se esperaba, fue ligeramente menor al de la banda observada en el primer PCR. Este fragmento se seleccionó para su secuenciación. Como se observa en este PCR los resultados de las reacciones 2a y 2b fueron idénticos.

#### **A. PCR PARA IDENTIFICAR CLONAS CON EL FRAGMENTO DI-4/PA141.**

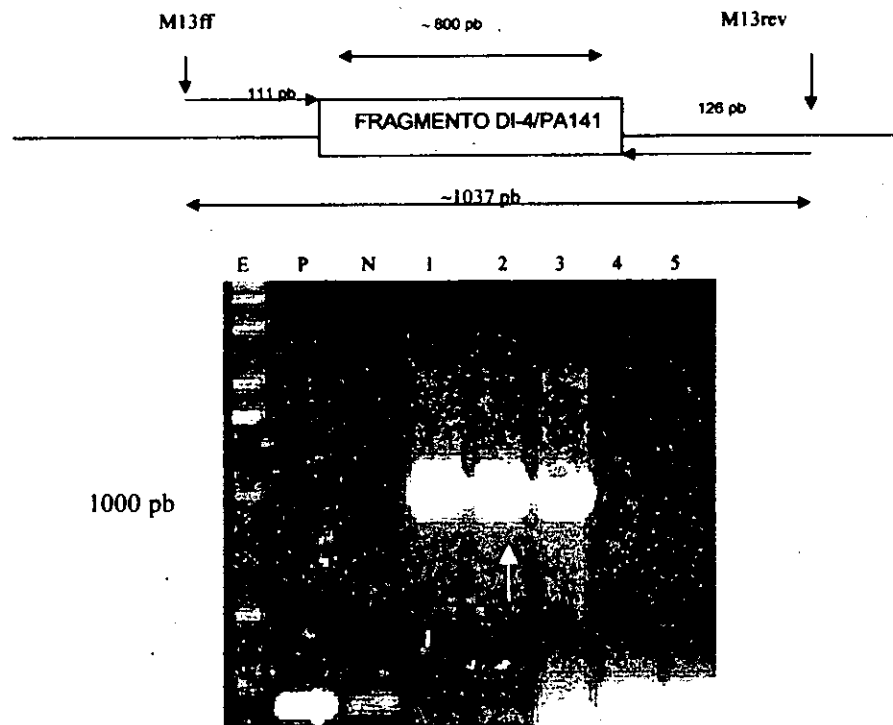
Después de la transformación con el producto de la ligación se seleccionaron 5 colonias blancas y mediante PCR con los oligos del vector M13ff/M13rev se identificaron las clonas que contienen el fragmento DI-4/PA141 generado en el



**Figura 32. Resultados del 3' RACE.** Los fragmentos DI-4/PA141 obtenidos en el segundo PCR se señalan con la flecha, éstos se cortaron y después de purificarse el DNA se ligó en el pGEM-T.

3'RACE. En la electroforesis de los productos amplificados en este PCR se identificaron 3 clonas con un fragmento de alrededor de 1000 pb. En la figura 33, se observan las bandas correspondientes a estos fragmentos. Se inoculó la colonia 3 en medio de cultivo LB y después se purificó el plásmido para su secuenciación.

**B. SECUENCIACIÓN DEL FRAGMENTO DI-4/PA141.** Para la secuenciación del fragmento de 800 pb generado mediante el 3'RACE se utilizaron los oligos M13ff y M13 rev. Debido al tamaño del fragmento también se prepararon reacciones de secuenciación con los oligos específicos DI-4 y PA141 y se llevaron a cabo corridas cortas (~2h) y largas (~5h) de tales reacciones. Con el oligo PA 141 no se obtuvo secuencia. Esta estrategia nos permitió contar con una secuencia de 491 pb desde la secuencia del oligo DI-4 hasta el extremo 3' del fragmento, por lo que de acuerdo al tamaño de ~800 pb del inserto DI-4/PA141 sólo faltaba obtener una secuencia de ~300 pb. Con el objeto de completar la secuencia del extremo 3' del mensajero posteriormente se diseñaron el par de oligos DI-9 y DI-10 (Fig. 34).



**Figura 33. Bandas Obtenidas del PCR para Identificar Clonas con el Fragmento Generado del 3'RACE.** La clona señalada con la flecha se creció para purificar el plásmido y posteriormente secuenciar el fragmento clonado. 1,2,3,4,5) productos del PCR de colonias blancas; P) banda generada por una colonia azul correspondiente al plásmido sin fragmento (~ 237 pb); E) escalera; N) blanco de reactivos. El tamaño del fragmento clonado fue de ~1037 pb.

Después de secuenciar con los oligos DI-9 y DI-10 se terminó de caracterizar la región 3' no traducida del mensajero. Con la nueva secuencia se encontró que el tamaño del fragmento faltante fue de 321 pb, el cual fue muy parecido al tamaño esperado. En esta secuencia se corroboró que el tamaño del fragmento DI-4/PA141 era de 810 pb. Después de alinear la secuencia encontrada con la secuencia de la región SECIS reportada para el cDNA del riñón de tilapia, se identificó una posible secuencia SECIS. También se encontró la señal de poliadenilación (Fig. 35). La alineación de la secuencia SECIS1 de tilapia y de *F. heteroclitus* y la estructura secundaria de ambas se muestra en la Figura 36.



DI-4

```

1      CGGGACTTCC TGGACGTGGC GGACTTCTCT GTGGTCTACG TCGCCGAGGC CCATTCCACA
      GCCCTGAAGC ACCTGCACCG CCTGAAGGAC CACCAGATGC AGCGGCTCCG GGTAAAGGTGT

61     GACGGCTGGT CCTTTGGCAA CAACTTTGAC ATCCGTCAGC ACCGGAGCCT GGAGGACAGG
      CTGCCGACCA GGAAACCGTT GTTGAAGCTG TAGGCAGTCG TGGCCTCGGA CCTCCTGTCC

121    CTGTCTGCAG CGCGGATCCT GGTTGAGAAT GATCCCCTGT GTCCTGTGGT GGTGGATGAG
      GACAGACGTC GCGCCTAGGA CCAAGTCTTA CTAGGGGACA CAGGACACCA CCACCTACTC

181    ATGAGTAATG TCTCAGCCAT CAAGTATGCT GCTCAGCCTG AGAGGCTGTA CGTGCTGCAG
      TACTCATTAC AGAGTCGGTA GTTCATACGA CGAGTCGGAC TCTCCGACAT GCACGACGTC
      ← DI-9

241    GCTGGAAAGG TCCTTTATAA GGGGGCGATG GGCCCTTGGG CCTACAATCC ACAAGAGGTG
      CGTCCTTTCC AGGAAATATT CCCCCGCTAC CCGGGAACCC GGATGTTAGG TGTCTCCAC

301    CTTTCGTTC TGCAGAAGAT GAGATAAGCT GAAGTTTGTG TTTTTTTTTT TTTACTGATC
      GAAAGCAAGG ACGTCTTCTA CTCTATTCGA CTTCNNNAAC AAAAAAAAAA AAATGACTAG
      ← DI-10

361    ATCACCGAGA TTGGTGATT TCGTAGTCGA TTTATCTCTG ATTCAGGTCA GTATCAATAT
      TAGTGGCTCT AACCCTAAA AGCATCAGCT AAATAAGACA TAAGTCCAGT CATAGTTATA

421    ACCAGGCATG TTCTGTAAA AAAAAAAAAAC AAGGATTTAA ATAAAGTTGT ATCCATCCAT
      TGGTCCGTAC AAGACAATTT TTTTTTTTGG TTCTAAATT TATTCAACA TAGGTAGGTA

497    CAAAAAAAAA AAAAAA
      GTTTTTTTTT TTTTTT

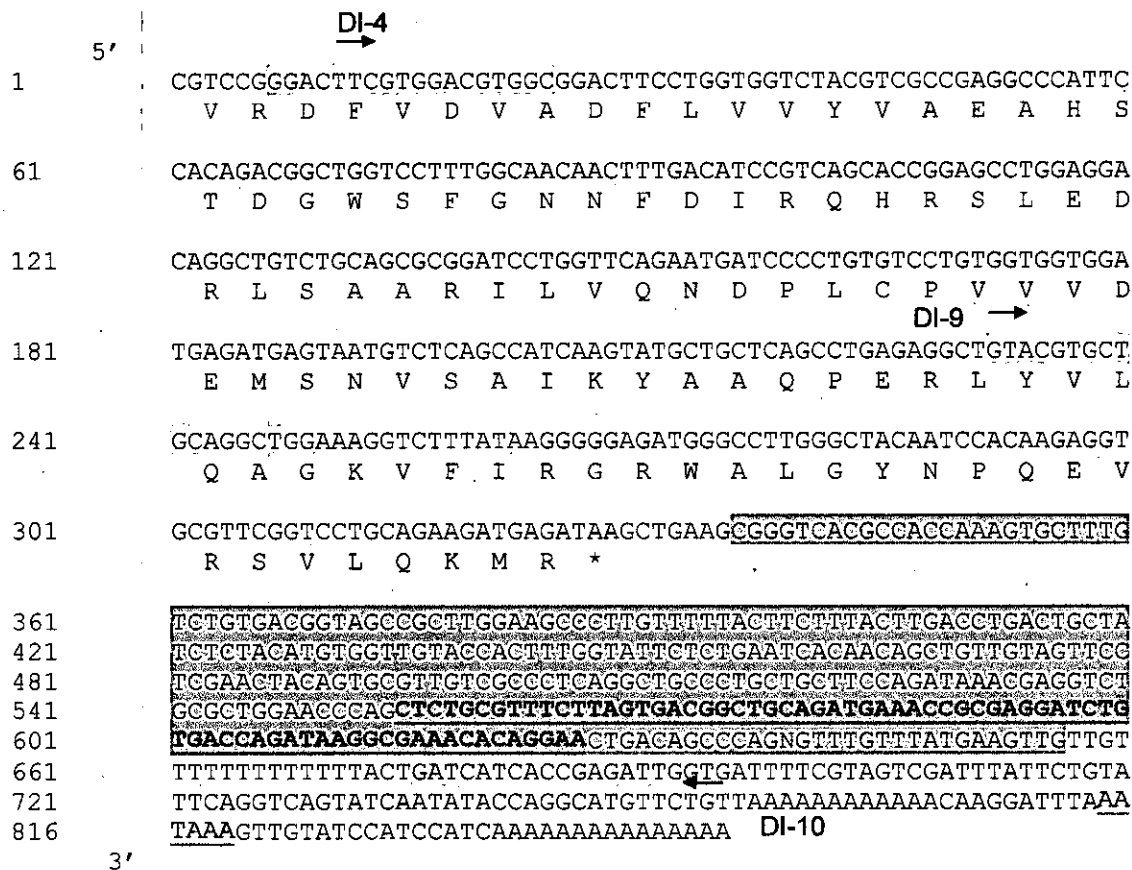
```

**Figura 34. Secuencia Parcial del Fragmento DI-4/PA141.** La zona sombreada indica la región que faltaba secuenciar, la cual corresponde a la región 3' no traducida del mensajero. En amarillo se resaltan la secuencia, posición y orientación de los oligos DI-4, DI-9 y DI-10.

Subsecuentes 3' RACEs se realizaron para comprobar que la secuencia del mRNA estuviera completa.

## VII - AMPLIFICACIÓN HACIA EL EXTREMO 5' DEL cDNA (5'RACE)

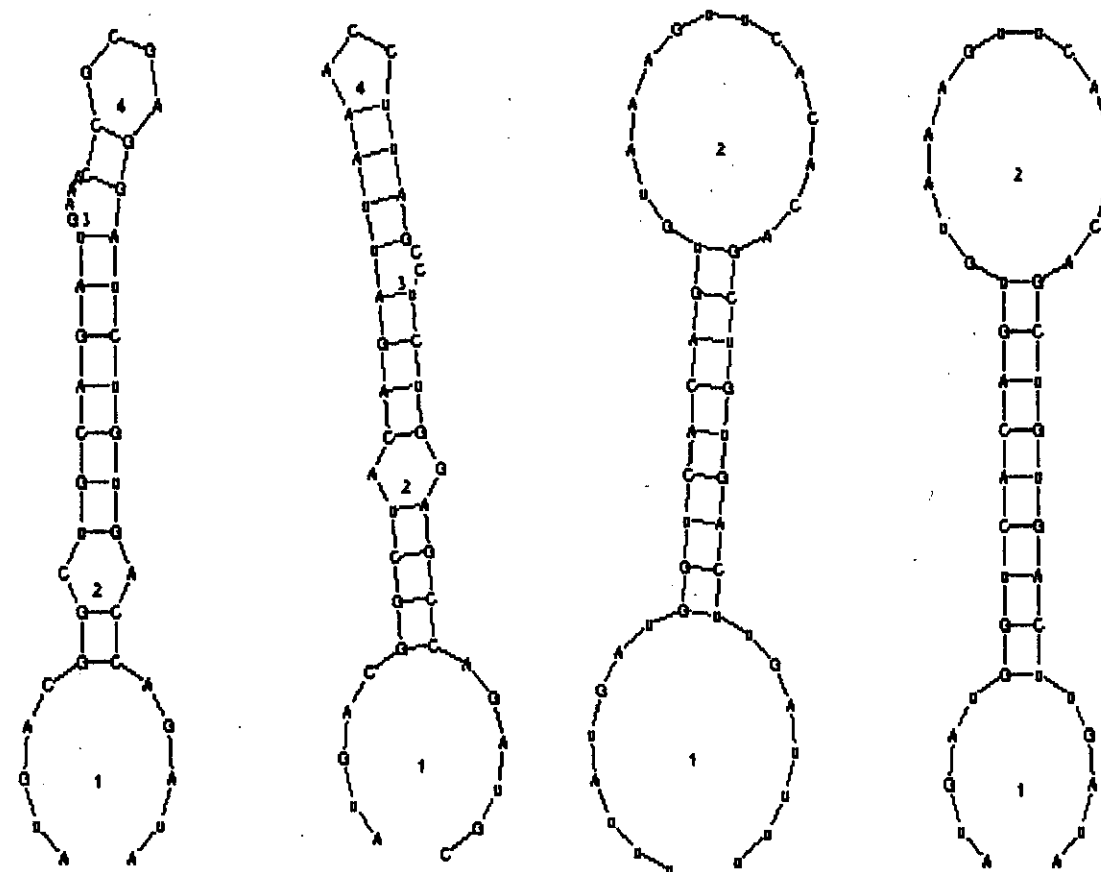
El extremo 5' del mensajero se obtuvo por transcripción reversa utilizando el oligo específico DI-5 y RNA total. Al RT resultante se le adicionó una cola de dCTP en el extremo 3'. Este transcrito se utilizó como templado del primer PCR con los oligos MCJ8/DI-5. El producto de esta reacción se utilizó como templado del segundo PCR utilizando ahora como iniciadores los oligos PA141/DI-6. En la Figura 37 se muestra la electroforesis del producto del segundo PCR en un gel de agarosa en donde se observan tres fragmentos amplificados.



**Figura 35. Secuencia Completa de Nucleótidos y de Aminoácidos del Fragmento DI-4/PA141.** En la región 3' no traducida se resalta en azul la secuencia que corresponde al elemento SECIS. En rojo se muestra la señal de poliadenilación. El sombreado gris indica la secuencia que faltaba para completar la región 3' no traducida de este mensajero. La posición de los oligos (DI-9 y DI-10), con los que se logró finalizar la secuencia del fragmento DI-4/PA141 se muestran en amarillo.

**A. PCR PARA IDENTIFICAR CLONAS CON EL FRAGMENTO PA141/DI-6.** Los productos gel-purificados de los fragmentos de cDNA amplificados en el 5'RACE (PA141/DI-6) se ligaron en pGEM-T y después de la transformación, se eligieron 5 colonias blancas de cada una de los fragmentos para corroborar por PCR la inserción de cada fragmento y su tamaño. Los resultados se ilustran en la Figura 38, en donde se observa que el tamaño de los fragmentos amplificados en las colonias 1 y 2 del primer fragmento corresponden a la amplificación del plásmido sin inserto; en la transformación del segundo fragmento se observaron 4 colonias positivas, de las cuales las colonias 1, 2 y 3 se seleccionaron para su

secuenciación. De las dos colonias positivas obtenidas de la transformación del tercer fragmento se seleccionó la colonia 1 para su secuenciación (Fig. 39)



*F. heteroclitus*

Tilapia

Rata

Humano

<i>F. heteroclitus</i>	ATGACGGCTGCAGATGAAACCGCGAGGATCTGTGACCAGATA
Tilapia	ATGACGGCTACAGATTAAACCTTAGCCTCTGGAGCCAGATGC
Rata	ATGATGGTCACAGTGTAAGTTCACACAGCTGTGACTTGATT
Humano	ATGATGGTCACAGTGTAAGTTCACACAGCTGTGACTTGATA

100% 75% 50%

Figura 36. Comparación de la Estructura Secundaria del elemento SECIS identificado en el mRNA de *F. heteroclitus* con el de la tilapia, la rata y el humano. La alineación de las secuencias de nucleótidos de estas regiones muestran las zonas consenso.

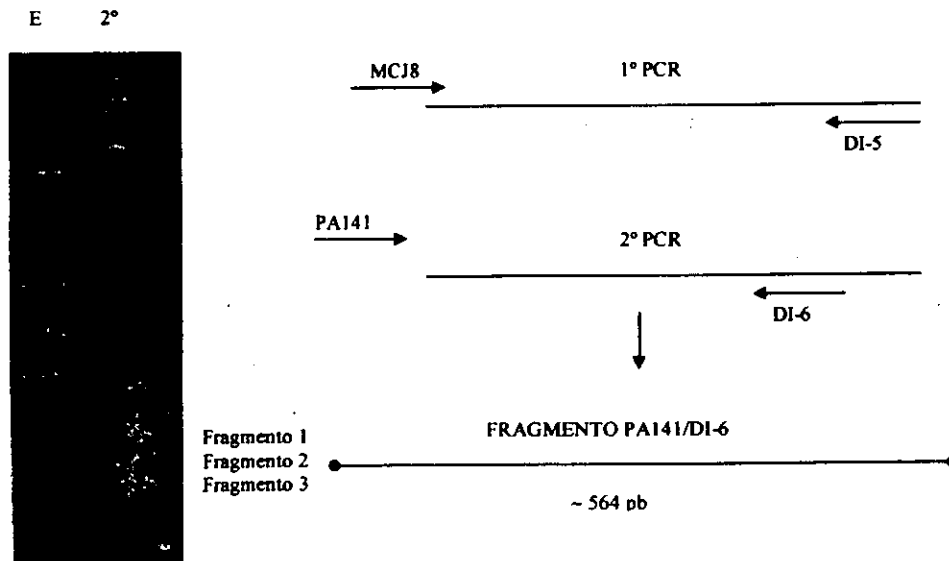


Figura 37. Productos Amplificados por el 5'RACE.

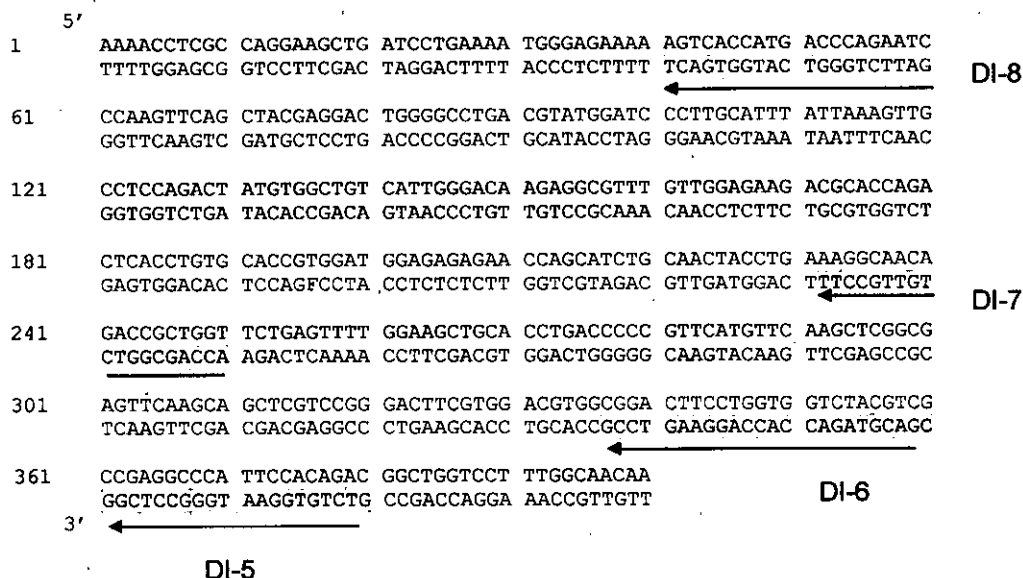


Figura 38. Productos del PCR de Colonias con Fragmentos del 5'RACE. Las flechas muestran las colonias seleccionadas para su secuenciación.

**B. SECUENCIACIÓN DE PLÁSMIDOS CON LOS FRAGMENTOS GENERADOS POR EL 5'RACE.** Después de purificar y desnaturalizar el plásmido de las colonias

seleccionadas se prepararon las reacciones de secuenciación, utilizando los oligos M13 ff y ROG34 del vector. Únicamente la colonia 1 del fragmento 3 presentó la secuencia de la desyodasa tipo 1. Con esta reacción se alcanzaron a secuenciar 400 pb desde el oligo DI-2 hacia el extremo 5' del mensajero en estudio (Fig 39).

Posteriormente se mandó sintetizar el oligo DI-7 y para confirmar la secuencia anterior se volvió a sintetizar el cDNA por transcripción reversa con el oligo DI-5, en este caso en el primer PCR se utilizaron los oligos MCJ8/DI-6 y PA141/DI-7 para el segundo. El producto amplificado en el segundo PCR fue de ~400 pb. Éste se purificó, se ligó y se utilizó para transformar células competentes. La clona positiva 5 con el fragmento (PA141/DI-7) se preparó para su secuenciación con los oligos DI-7 y ROG34. La secuenciación de este fragmento nos permitió verificar el marco abierto de lectura y diseñar el oligo DI-8 (Fig. 40).



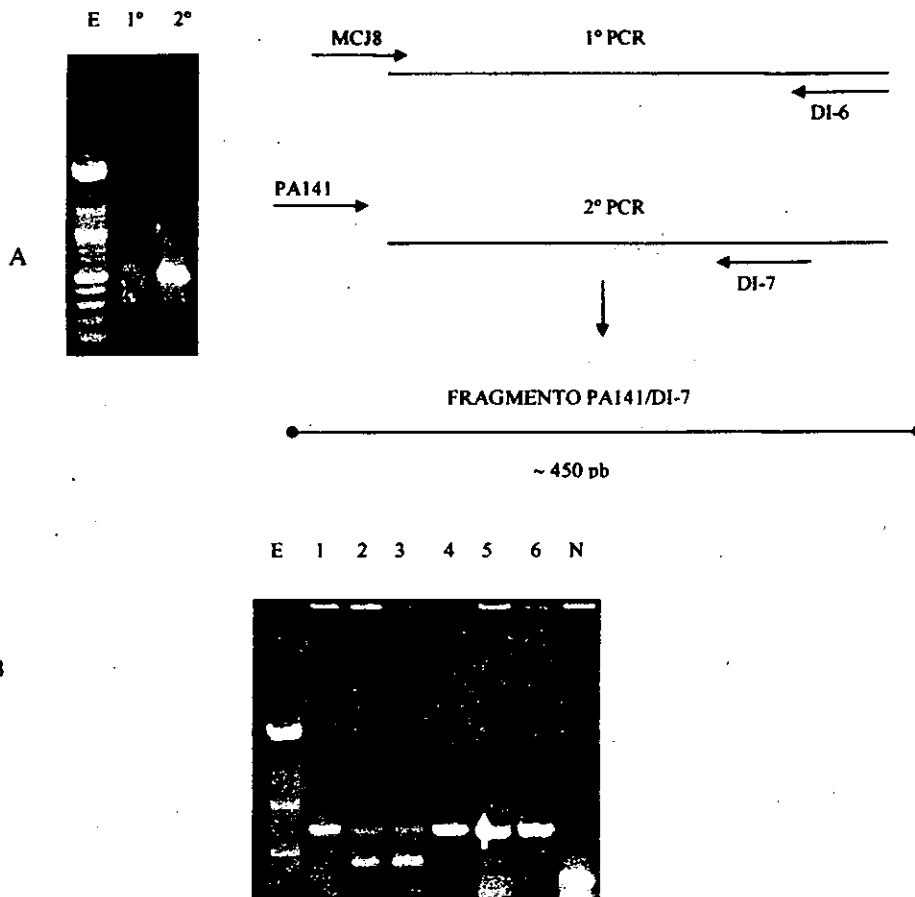
**Figura 39. Secuencia Parcial del Extremo 5' del Mensajero.** Las 400 pb indicadas aquí abarcan desde la secuencia del oligo DI-2. Debido a que el tamaño del fragmento PA141/DI-7 es de ~400 pb se supone que a esta secuencia sólo le faltan alrededor de 150 pb para completar el extremo 5'.

A partir de la clona con el fragmento PA141/DI-7, se prepararon las reacciones de secuenciación con el oligo DI-8 y M13 ff. Con esta secuencia se terminó de caracterizar el extremo 5' del mensajero.

En la Figura 41 se muestra la secuencia de nucleótidos completa del cDNA obtenido después de analizar el conjunto de resultados de las amplificaciones de los extremos 3' y 5' RACEs.

La alineación de la secuencia anterior con las secuencias de la regiones SECIS 1 y 2 reportadas en la tilapia se muestra en la Figura 42.

En la Figura 43 se muestra la secuencia de aminoácidos deducida a partir del cDNA clonado.



**Figura 40. Resultados del 5'RACE e Identificación de Clonas con el Fragmento PA141/DI-7.** En el panel A se muestran los productos del RT-PCR y en panel B el tamizaje de las colonias seleccionadas. Se seleccionó la colonia 5 para su secuenciación.

## Resultados

1	ATFGTTGTAA TAACAACATT	CACGGTGTAG GTGCCCACTC	GAGGACGGGT CTCTGCCCA	TGTAGCGATG ACATCGCTAC	TTTCTGCAGA AAAGACGTCT	AGTTGTTAGT TCAACAATCA
61	TTATCTGGCG AATAGACCGC	GCAGCATGTA CGTCGTACAT	TGTTCTGCTA ACAAGACGAT	CATTCTGGTT GTAAGACCAA	CTGAGCGCCA GACTCGCGGT	CGCTGAATGT GCGACTTACA
121	TTTAAAGTC AAATTTTCAG	CTCTCGCCAA GAGAGCGGTT	ACCTCGCCAG TGGAGCGGTC	GAAGCTGATC CTTCGACTAG	CTGAAAATGG GACTTTTACC	GAGAAAAAGT CTCTTTTCA
181	CACCATGACC GTGGTACTGG	CAGAATCCCA GTCTTAGGGT	AGTTCAGTA TCAAGTCGAT	CGAGGACTGG GCTCCTGACC	GGCCTGACGT CCGGACTGCA	ATGGGTCCCT TACCCAGGGA
241	TGCATTTATT ACGTAATAA	AAAGTTGCCT TTTCAACGGA	CCCAGACTAT GGTCTGATA	GTGGCTGTCA CACCGACAGT	TTGGGACAAG AACCTGTTC	AGGCGTTTGT TCCGAAAACA
301	TGGAGAAGAC ACCTCTTCTG	GCACCAGACT CGTGGTCTGA	CACCTGTGGT GTGGACACCA	CACCGTGGAT GTGGCACCTA	GGAGAGAGAA CCTCTCTCTT	CCAGCATCTG GGTCGTAGAC
361	CAACTACCTG GTTGATGGAC	AAAGGCAACA TTTCCGTTGT	GACCCTGGT CTGGCAGCCA	TCTGAGTTTT AGACTCAAAA	DI-1 → GGAAGCTGCA CCTTCGACGT	CCTGACCCCC GGACTGGGGG
421	DI-3 → GTTCATGTTT CAAGTACAAG	AAGCTCGGCG TTCGAGCCGC	AGTTC AAGCA TCAAGTTCTG	GCTCGTCCGG CGAGCAGGCC	DI-4 → GACTTCGTGG CTGAAGCACC	ACGTGGCGGA TGCACCGCCT
481	CTTCTGGTG GAAGGACCAC	GTCTACGTCG CAGATGCAGC	CCGAGGCCCA GGTCCGGGT	TTCCACAGAC AAGGTGTCTG	GGCTGGTCCCT CCGACCAGGA	TTGGCAACAA AACCCTGTGT
541	CTTTGACATC GAAACTGTAG	CGTCAGCACC GCAGTCGTGG	GGAGCCTGGA CCTCGGACCT	GGACAGGCTG CCTGTCCGAC	DI-5 ← TCTGCAGCGC AGACGTCCGG	DI-2 ← GGATCCTGGT CCTAGGACCA
601	TCAGAATGAT AGTCTTACTA	CCCCTGTGTC GGGGACACAG	CTGTGGTGGT GACACCACCA	GGATGAGATG CCTACTCTAC	AGTAATGTCT TCATFACAGA	CAGCCATCAA GTCGGTAGTT
661	GTATGCTGCT CATACGACGA	CAGCCTGAGA GTCGGACTCT	GGCTGTACGT CCGACATGCA	DI-9 → GCTGCAGGCT CGACGTCCGA	GGAAAGGTCT CCTTTCCAGA	TTATAAGGGG AATATTCCCC
721	GAGATGGGCC CTCTACCCGG	TTGGGCTACA AACCCGATGT	ATCCACAAGA TAGGTGTTCT	GGTGCCTTCG CCACGCAAGC	GTCCTGCAGA CAGGACGTCT	AGATGAGATA TCTACTCTAT
781	AGCTGAAGCG TCGACTTCGC	GGTCACGCCA CCAGTCCGGT	CCAAAGTGCT GGTTTCACGA	TTGTCTGTGA AACAGACACT	CGGTAGCCGC GCCATCGGGC	TTGGAAGCCC AACCTTCGGG
841	TTGTTTTTAC AACAAAAATG	TTCTTTACTT AAGAAATGAA	GACCTGACTG CTGGACTGAC	CTATCTCTAC GATAGAGATG	ATGTGGTTGT TACACCAACA	ACCACTTTGG TGTTGAAACC
901	TATTCTCTGA ATAAGAGACT	ATCACAACAG TAGTGTGTC	CTGTTGTAGT GACAACATCA	TCCTCGAACT AGGAGCTTGA	ACAGTGCCTT TGTCACGCAA	GTCGCCCTCA CAGCGGGAGT
961	GGCTGCCCTG CCGACGGGAC	CTGCTTCCAG GACGAAGGTC	ATAAACGAGG TATTTGCTCC	TCTGCGCTGG AGACGCGACC	AACCCAGCTC TTGGGTCGAG	TGCCTTTCTT ACGCAAAAGAA
1021	AGTGACGGCT TCACTGCCGA	GCAGATGAAA CGTCTACTTT	CCGCGAGGAT GGCGCTCCTA	CTGTGACCAG GACACTGGTC	ATAAGGGGAA TATTCGGCTT	ACACAGGAAC TGTGCTCTTG
1081	TGACAGCCCA ACTGTCGGGT	GNGTTTGT CNCAAAACAAA	ATGAAGTTGT TACTTCAACA	TGTTTTTTTT ACAAAAAAA	TTTTTACTGA AAAAATGACT	TCATCACCGA AGTAGTGGCT
1141	GATTGGTGAT CTAACCACCTA	TTTCGTAGTC AAAGCATCAG	GATTTATCT CTAATAAGA	GTATTCAGGT CATAAGTCCA	CAGTATCAAT GTCATAGTTA	ATACCAGGCA TATGGTCCGT
1201	DI-10 ← TGTTCGTGTTA ACAAGACAAT	AAAAAAAAAA TTTTTTTTTT	ACAAGGATTT TGTTCTCTAAA	AAATAAAGTT TTTATTTCAA	GTATCCATCC CATAGGTAGG	ATCAAAAAAA TAGTTTTTTT
1261	AAAAAAAA TTTTTTTT					

**Figura 41. Secuencia de Nucleótidos del cDNA que Codifica para la D1 en el Hígado *F. heteroclitus*. Se muestra la posición y orientación de todos los oligos diseñados para su secuenciación.**

# Resultados

Fundulus D1	NNCGATGTTTCTGCAGAAGTTGTTAGTTTATCTGGCGGCAGCATGTATGTTCTGCTACATTCTGGTTCTGAGCGCCACGC	80
SECIS til1	.....	0
SECIS til2	.....	0
Fundulus D1	TGAATGTTTTAAAAGTCTCTCGCCAAACCTCGCCAGGAAGCTGATCCTGAAAATGGGAGAAAAGTCACCATGACCCGAG	160
SECIS til1	.....	0
SECIS til2	.....	0
Fundulus D1	AATCCCAAGTTCAGCTACGAGGACTGGGGCCTGACGIATGGGTCCCTTGCAITTTATTAAGTTCGCTCCAGACTATGTG	240
SECIS til1	.....	0
SECIS til2	.....	0
Fundulus D1	GCTGTCATTGGGACAAGAGGCGTTTGTGGAGAAGACGCCAGACTCACCTGTGGTCACCGTGGATGGAGAGAGAACCA	320
SECIS til1	.....	0
SECIS til2	.....	0
Fundulus D1	GCATCTGCAACTACCTGAAAGGCAACAGACCCGCTGGTTCAGTTCGAGTTTGGAAAGCTGCACCTGACCCCGTTCATGTTCAAG	400
SECIS til1	.....	0
SECIS til2	.....	0
Fundulus D1	CTCGGCGAGTTC AAGCAGCTCGTCCGGACTTCGTGGACGTGGCGGACTTCCTGGTGGTCTACGTGCGCGAGGCCATTC	480
SECIS til1	.....	0
SECIS til2	.....	0
Fundulus D1	CACAGACGGCTGGTCCCTTGGCAACAACCTTTGACATCCGTGACGACCCGGAGCCTGGAGGACAGGCTGTCTGCAGCGCGGA	560
SECIS til1	.....	0
SECIS til2	.....	0
Fundulus D1	TCCTGGTTCAGAATGATCCCCTGTGTCCTGTGGTGGTGGATGAGATGAGTAATGTCTCAGCCATCAAGTATGCTGCTCAG	640
SECIS til1	.....	0
SECIS til2	.....	0
Fundulus D1	CCTGAGAGGCTGTACGTGCTGCAGGCTGGAAAGTCTTTATAAGGGGAGATGGGCCTGGGCTACAATCCACAAGAGGT	720
SECIS til1	.....	0
SECIS til2	.....	0
Fundulus D1	CGTTCGGTCTGCAGAAGATGAGATAAGCTGAAGCGGGTCACGCCACCAAAGTGCTTTGTCTGTGACGGTAGCCGCTTG	800
SECIS til1	.....	0
SECIS til2	.....	0
Fundulus D1	GAAGCCCTTGTTTTACTTCTTTACTTGACCTGACTGCTATCTCTACATGTGGTGTACCACTTTGGTATTCTCTGAATC	880
SECIS til1	.....	0
SECIS til2	.....	0
Fundulus D1	ACAACAGCTGTTGTAGTTCCTCGAACTACAGTGCCTGTGCGCCCTCAGGCTGCCCTGCTGCTTCCAGATAAACGAGGTCT	960
SECIS til1	.....	0
SECIS til2	.....	0
Fundulus D1	GCGCTGGAACCCAG	1040
SECIS til1	.....	69
SECIS til2	.....	68
Fundulus D1	ACTGACAGCCAGNGTTTGTATGAAGTTGTTGTTTTTTTTTTTACTGATCATCACCCGAGATTGGTGATTTT	1120
SECIS til1	.....	77
SECIS til2	.....	76
Fundulus D1	CGTAGTCGATTTATTCTGTATTGAGTTCAGTATCAATATACCAGGCATGTTCTGTAAAAAACAAGGATTAAA	1200
SECIS til1	.....	
SECIS til2	.....	
Fundulus D1	TAAAGTTGTATCCATCCATCAAAAAAAAAAAAAA	1235
SECIS til1	.....	
SECIS til2	.....	

**Figura 42. Alineación del cDNA de la D1 de *F. heteroclitus* con los Elementos SECIS identificados en el cDNA de la D1 del Riñón de Tilapia.**



## Resultados

```

1      ATTGTTGTAACACGGGTGAGGAGGACGGGTTGTAGCGATGTTTCTGCAGAAGTTGTTAGT
1      M F L Q K L L V

61     TTATCTGGCGGCAGCATGTATGTTCTGCTACATTCTGGTTCTGAGCGCCACGCTGAATGT
9      Y L A A A C M F C Y I L V L S A T L N V

121    TTTAAAAGTCTCTCGCCAAACCTCGCCAGGAAGCTGATCCTGAAAATGGGAGAAAAAGT
29     L K V L S P N L A R K L I L K M G E K V

181    CACCATGACCCAGAATCCCAAGTTCAGCTACGAGGACTGGGGCCTGACGTATGGGTCCCT
49     T M T Q N P K F S Y E D W G L T Y G S L

241    TGCATTTATTAAGTTGCCTCCCAGACTATGTGGCTGTCATTGGGACAAGAGGCGTTTGT
69     A F I K V A S Q T M W L S L G Q E A F V

301    TGGAGAAGACGCACCAGACTCACCTGTGGTCACCGTGGATGGAGAGAGAACCAGCATCTG
89     G E D A P D S P V V T V D G E R T S I C

361    CAACTACCTGAAAGGCAACAGACCGCTGGTTCTGAGTTTTGGAAGCTGCACCTGACCCCC
109    N Y L K G N R P L V L S F G S C T * P P

421    GTTCATGTTCAAGCTCGGCGAGTTCAGCAGCTCGTCCGGGACTTCGTGGACGTGGCGGA
129    F M F K L G E F K Q L V R D F V D V A D

481    CTTCTGGTGGTCTACGTCGCCGAGGCCATTCCACAGACGGCTGGTCTTTGGCAACAA
149    F L V V Y V A E A H S T D G W S F G N N

541    CTTTGACATCCGTCAGCACCGGAGCCTGGAGGACAGGCTGTCTGCAGCGCGGATCCTGGT
169    F D I R Q H R S L E D R L S A A R I L V

601    TCAGAATGATCCCCTGTGTCTGTGGTGGTGGATGAGATGAGTAATGTCTCAGCCATCAA
189    Q N D P L C P V V V D E M S N V S A I K

661    GTATGCTGCTCAGCCTGAGAGGCTGTACGTGCTGCAGGCTGGAAAGGTCTTTATAAGGGG
209    Y A A Q P E R L Y V L Q A G K V F I R G

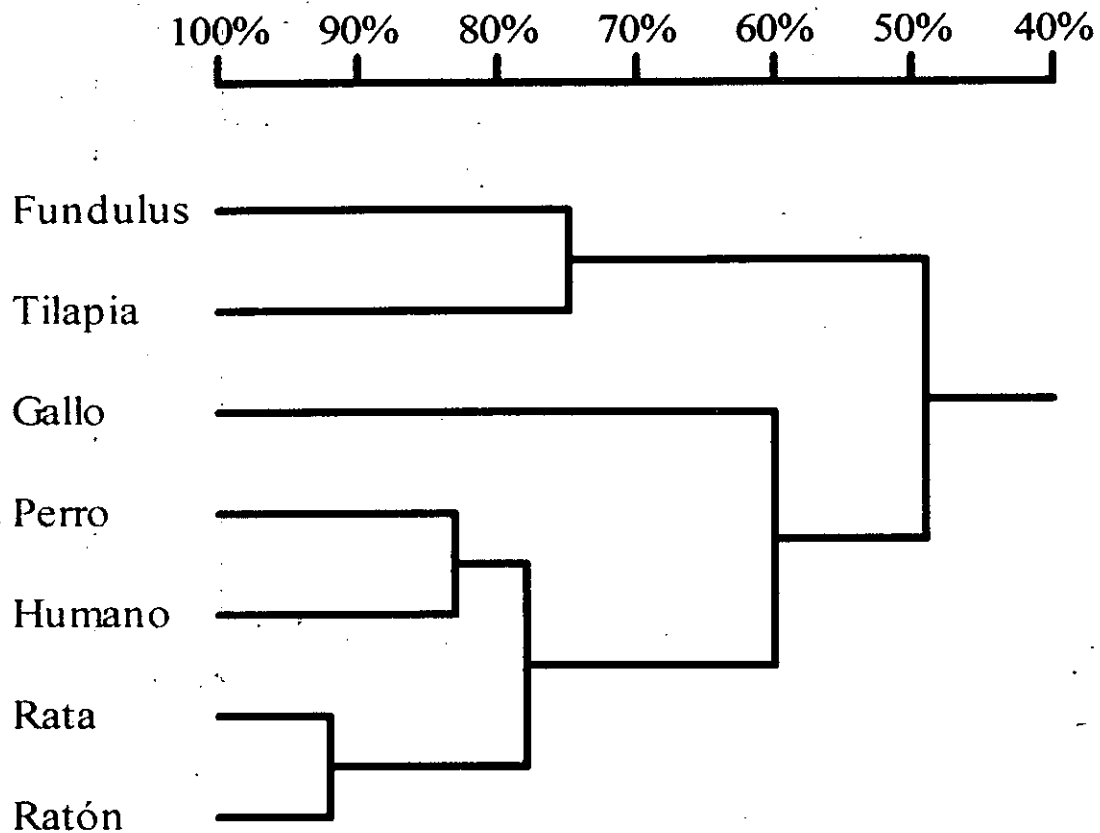
721    GAGATGGGCCTTGGGCTACAATCCACAAGAGGTGCGTTCGGTCTGCAGAAGATGAGATA
229    R W A L G Y N P Q E V R S V L Q K M R *

781    AGCTGAAGCGGGTCACGCCACCAAAGTGCTTTGTCTGTGACGGTAGCCGCTTGGAAAGCCC
841    TTGTTTTTACTTCTTTACTTGACCTGACTGCTATCTCTACATGTGGTTGTACCACTTTGG
901    TATTCTCTGAATCACAACAGCTGTTGTAGTTCCTCGAACTACAGTGCGTTGTGCGCCCTCA
961    GGCTGCCCCTGCTGCTTCCAGATAAACGAGGTCTGCGCTGGAACCCAGCTCTGCGTTTCTT
1021   AGTGACGGCTGCAGATGAAACCGCGAGGATCTGTGACCAGATAAGGCCGAAACACAGGAAC
1081   TGACAGCCCAGNGTTTGTATGAAGTTGTTGTTTTTTTTTTTTTTTACTGATCATCACCGA
1141   GATTGGTGATTTTCGTAGTCGATTTTATTCTGTATTTCAGGTCAGTATCAATATACCAGGCA
1201   TGTTCTGTTAAAAAACAAGGATTTAAATAAAGTTGTATCCATCCATCAAAAAA
1261   AAAAAAA

```

**Figura 43. Secuencia de Nucleótidos y Secuencia de Aminoácidos Deducida del cDNA que Codifica para la D1 en el Hígado de *F. heteroclitus*. Se observa el codón que codifica para la selenocisteína en la posición 413-415 en color fucsia. La secuencia SECIS de 72 nucleótidos se resalta en azul. La señal de poliadenilación se muestra en rojo .**

La Figura 44 muestra un árbol que indica el porcentaje de identidad entre las secuencias de aminoácidos deducidas de los cDNAs reportados para la D1 en otros vertebrados y la de *F. heteroclitus*.



**Figura 44. Porcentaje de Identidad de la Secuencia de Aminoácidos de la D1 de *F. heteroclitus* con la Reportada en Otros Vertebrados.**

En la Figura 45 se presenta la alineación de las secuencias de aminoácidos para las D1's reportadas en diferentes especies, con la obtenida en este trabajo. Como se observa se encuentran conservadas varias zonas consenso en los vertebrados.

Fundulus	MFLQKLLVYIAAACMECYILVLSATLNVLKVLSENLAARKLILKMGFRVTMFCQNEKFSYEDAGLTYGSLAFITKVASQIMAL	80
*Tilapia	MFLQKIVLYIISTACMECYMLGKFLMLVLLQFESISLAKKEILRMGEITMFCQNERFNYYEDAGLTFMSLAFITKTASSHMAL	80
Gallo	...LSIRVLIHKKLILLOVPLSVVVGKTMMLLEEDTTIRYILKLGESRNRNQNEKFSYENAGEIFESFOYLLFVLKVKAR	77
Perro	MGLPRPVLEARRLWVILLOVAVOVAVGKVELKLEEARVYOHVAVNGR...NEHEFSYDNAAFILYFMOMFWFVLKVCWQ	75
Rata	MGLSQLWLWIKRLVITLLOVALEAVGKVLMTLEFERVKONILAMGORTGMTRHERHAPDNAVETLESIOYFWFVLKVRWQ	80
Ratón	MGLPOLWLWIKRLVITLLOVALEAVGKVLMTLEFGRVKOSILAMGORTGMARNERHAPDNAVETLESIOYFWFVLKVRWQ	80
Humano	MGLPOPGLWIKRLVWVLLLEVAHVVGKVLILLLEDRVFRNILAMGERTGMTRHEHFHSHDNVLETLESIOYFWFVLKVRWQ	80
Fundulus	SLGQEAFCVGEDAHDSPVWTVDGERSTICNYLKCNRFLMISFGSCTNFPFMEKLCETKQIVRIVDVADELWVYVAEAHSTI	160
*Tilapia	SLGEEAFVCGEADHDSPVWVMDREKTSISKYLKCNRFLMISFGSCTNFPFMYKLDDEKQIVKDRSDVADELWVYVAEAHSTI	160
Gallo	RLEDEAHECRPAENTFVVAINGEMOHLFSEMRDNAPLLENFGSCTNFPSEMLKEDDENKIVKDRSSIAEFLILLYLEEAHAV	157
Perro	REEDRTEPCGLAFNCFVVRLSGORCNLWDEMOGNRPLMINEFGSCTXPESELLKEDQFKRLVDLFASTADFLILLYLEEAHAS	155
Rata	REEDRAEYCCGLAFNCTVVRLSGOKCNVWDEIQGSRPLMINEFGSCTNPESELLKEDQFKRLVDLFASTADFLILLYLEEAHAI	160
Ratón	REEDRAEFCGLAFNCTVVRLSGOKCNLWDEIQGSRPLMINEFGSCTNPESELLKEDQFKRLVDLFASTADFLILLYLEEAHAI	160
Humano	REEDTTTELGLAFNCFVVRLSGORCNLWEEEMOGNRPLMINEFGSCTXPESEMFKEDQFKRLVDLFASTADFLILLYLEEAHAS	160
Fundulus	DGWSFGNNEDIRCHRSLEDPLSAARILVONDELCPVWVTEWSNVSAIKYAAQPERLYVWLCACKVFIQRWALGYNFQEV	239
*Tilapia	DGWAFFKNNYDINCHOSLEDPLSAAQVIVOSEILCPVWVTEVTTIKYCALPERILEYLLACKVLYKCGKGPWYNYFAEV	240
Gallo	DGWAHRNIVVILKNHRSLEDPKTAAQEQOKNEILCPVVLITVENLSSSKYAAALPERIYVWLCACNVLYKCGVGPWNYHLEEV	237
Perro	DGWAFFKNVNIERTHOTIDRLOCAARLILDRALPCFVWVTEVYRNOSSOFYAAALPERILEYLLACKVLYKCGKGPWNYHLEEV	235
Rata	DGWAFFKNVDIRCHRSLEDPLRAAHLILARSFCFVWVTEVYRNOSSOLYAAALPERIYVWLCACRILYKCGKGPWNYHLEEV	240
Ratón	DGWAFFKNVDIRCHRSLEDPLRAAHLILARSFCFVWVTEVYRNOSSOLYAAALPERIYVWLCACRILYKCGKGPWNYHLEEV	240
Humano	DGWAFFKNVMDIRNIONIDPLCAAHLLARSFCFVWVTEVYRNOSSOLYAAALPERIYVWLCACRILYKCGKGPWNYHLEEV	240
Fundulus	FSILQKMR	247
*Tilapia	FSILENIK	248
Gallo	FAVLENLK	245
Perro	FAVLEKTHS	244
Rata	FAVLENLCIPPGHMPQF	257
Ratón	FAVLENLCCTPPRHVPQL	257
Humano	FAVLEKTHS	249



Figura 45. Comparación de la Secuencia de Aminoácidos de la Desyodasa tipo 1 de *F. heteroclitus* con la Reportada en Otros Vertebrados

Fundulus	MF L Q K I L L V Y	AAACMECY	LVLVSAT	LNVK	VS	ENLAK	KL	ILKMG	EL	IKMG	EK	VIHQ	ME	KF	SYED	GL	MG	SLAE	IKVASO	IMAL	80	
*Tilapia	MF L Q K I V I V Y	STACMECY	M L G K F I M L V	Q F E S	I	SLAK	KH	ILRMG	EK	ILRMG	EK	ITMQ	NE	RF	NYED	GL	EM	SLAE	IKTASSH	IMAL	80	
Gallo	.. LSIRV	HKLLIL	OVLLSV	VGKTMM	LE	DTI	RY	ILKLG	EF	ILKLG	EF	SRMN	QNE	KI	SYEN	GE	FE	SOYLL	EVKVK	KR	77	
Perro	MGI PRPVILW	RRFVW	LLOVA	VOVAVG	KVFLK	LE	ARVK	OH	VAMNG	K	..	NE	HF	HF	SYDN	AE	LY	MOYF	WFLKVC	W	75	
Rata	MGI SOLWLV	KRIVIL	FLQVA	LEVAIG	KVMTL	LE	ERVK	ON	LAMGO	K	IGM	TR	HE	RE	APDN	VE	FE	SI	OYF	WFLKVR	W	80
Ratón	MGI POLWLV	KRIVIL	FLQVA	LEVAIG	KVMTL	LE	GRVK	OS	LAMGO	K	IGM	TR	HE	RE	APDN	VE	FE	SI	OYF	WFLKVR	W	80
Humano	MGI POPGLW	KRIWV	LLGEVA	VHVWG	KVLLI	LE	DRVK	RN	LAMGE	K	IGM	TR	HE	RE	SHDN	IE	FE	STOY	F	WFLKVR	W	80

Fundulus	SI GOEAFV	GEDA	DSE	W	IVD	GER	TSIC	N Y L K G N	R P L M	S	FGS	C T X E	P E M	F H	T G E	T K O	L V R	D V D V	A D E L	V V V A	E A H S I J	160
*Tilapia	SI GEAFV	GEAI	DSP	W	IVD	REK	TSI	S K Y L K G N	R P L M	S	FGS	C T X E	P E M	F H	T G E	T K O	L V R	D V D V	A D E L	V V V A	E A H S I J	160
Gallo	RLEDFAHE	CRPA	NIE	VV	A I N G	E M O H	L E S E M R	D N	R P L M	N	P G S	C T X E	S E M	L H	K E D E	F N K I	V K D F	S S I	A D E L	I I I I	E A H V	157
Perro	RLEDRTPE	GDAP	NCP	VV	R L S G	O R C N I W	D E M O G N	R P L M	N	P G S	C T X E	S E M	L H	K E D E	F N K I	V K D F	S S I	A D E L	I I I I	E A H V	155	
Rata	RLEDRAEY	GDAP	NCP	VV	R L S G	O K C N I W	D E F I O G	S R P L M	N	P G S	C T X E	S E M	L H	K E D O	F N K R	V D	D F A S T	A D E L	I I I I	E A H A T	160	
Ratón	RLEDRAEH	GDAP	NCP	VV	C I L S G	O K C N I W	D E F I O G	S R P L M	N	P G S	C T X E	S E M	L H	K E D O	F N K R	V D	D F A S T	A D E L	I I I I	E A H A T	160	
Humano	RLEDITTEL	GDAP	NCP	VV	R L S G	O R C N I W	E F E M O G N	R P L M	N	P G S	C T X E	S E M	L H	K E D O	F N K I	V K D F	S S I	A D E L	V V V A	E A H S I J	160	

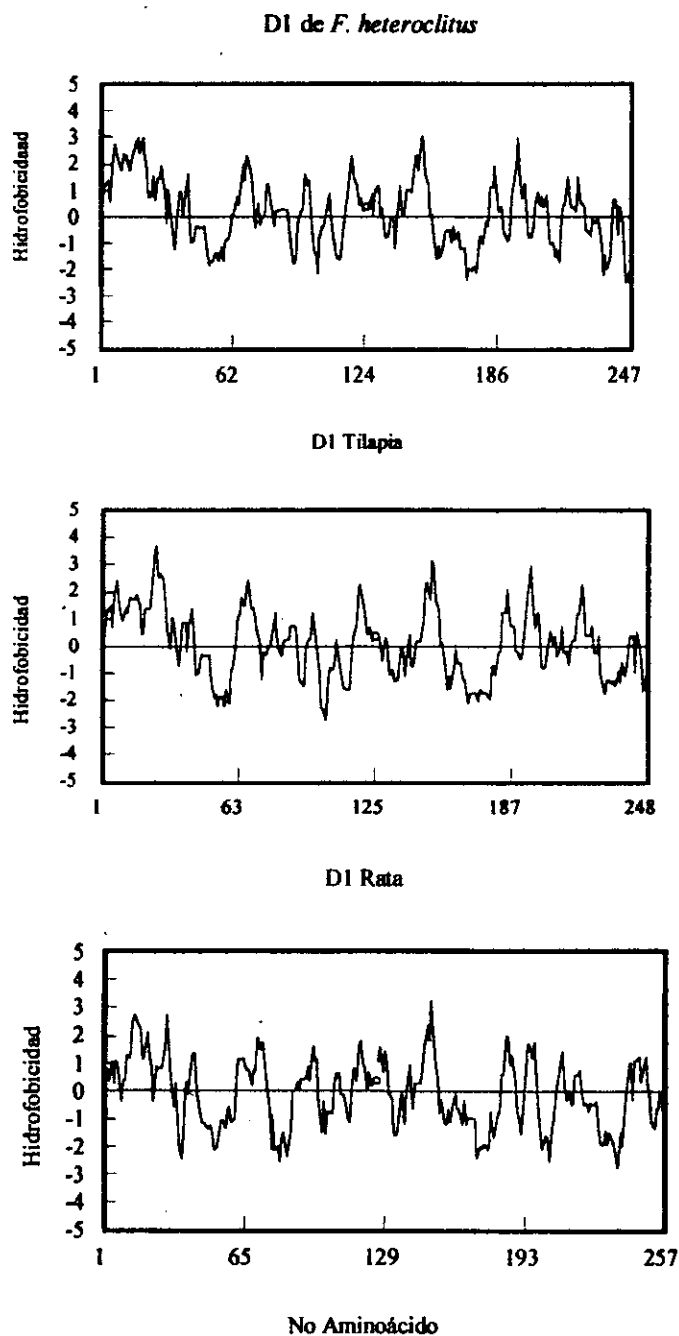
Fundulus	DGWA	SI GN	EDTIR	RS	IL	EDP	LSA	ARI	VOND	IL	CPV	V V	E M	S N V S	A I K Y	A A	Q P E R I	V V I	C A C	K V F I	R C R W	L . G	239
*Tilapia	DGWA	SI GN	YDIN	OS	IL	EDP	LSA	QVI	VOSE	IL	CPV	V V	E M	S N V S	A I K Y	A A	Q P E R I	V V I	C A C	K V F I	R C R W	L . G	240
Gallo	DGWA	HRNN	WVTK	RS	IL	EDP	KI A	QHI	OOKN	IL	CPV	V V	E M	N L S S	S S K Y	A A	Q P E R I	V V I	C A C	N V I K	C G K G P K	C	237
Perro	DGWA	HKNN	VNI	RS	IL	ODR	LR	AARI	LARS	P	CPV	V V	E M	R N O S	S O F	A A	Q P E R I	V V I	C A C	R I O C K	K P G P W N	I H	235
Rata	DGWA	HKNN	VDI	RS	IL	ODR	LR	AARI	LARS	P	CPV	V V	E M	R N O S	S O F	A A	Q P E R I	V V I	C A C	R I O C K	K P G P W N	I H	240
Ratón	DGWA	HKNN	VDV	RS	IL	ODR	VR	AARI	LARS	P	CPV	V V	E M	R N O S	S O F	A A	Q P E R I	V V I	C A C	R I O C K	K A G P W N	I H	240
Humano	DGWA	TKNN	MDT	RN	IL	ODP	LR	QAARI	LARS	P	CPV	V V	E M	R N O S	S O F	A A	Q P E R I	V V I	C A C	R I O C K	K S G P W N	I H	240

Fundulus	RS	L	Q	N	M	R																	247
*Tilapia	RS	L	Q	N	M	R																	248
Gallo	RAV	L	EN	LK																			245
Perro	RAV	L	EN	LK																			244
Rata	RAV	L	EN	LK																			257
Ratón	RAV	L	EN	LK																			257
Humano	RAV	L	EN	LK																			249



Figura 45. Comparación de la Secuencia de Aminoácidos de la Desyodasa tipo 1 de *F. heteroclitus* con la Reportada en Otros Vertebrados

Por último se comparó la hidrofobicidad de las secuencias de aminoácidos de la D1 hepática del *F. heteroclitus* con la D1 del hígado de rata y con la D1 del riñón de tilapia, en la Figura 46 se muestran los resultados de este análisis.



**Figura 46. Patrón de Hidrofobicidad de la D1 de *F. heteroclitus*, Tilapia y Rata.**

## DISCUSIÓN

En el cDNA clonado se identificaron las características estructurales específicas del mensajero que codifica para la D1 en otros vertebrados. Como se esquematiza en la figura 47, este cDNA tiene un tamaño de 1269 nucleótidos y codifica para una proteína de 247 aminoácidos. El codón de iniciación se localiza en la posición 38-40 en dirección 3'. La señal de poliadenilación AATAAA ocupa la posición 1232-1237 en la región 3' no traducida. En el marco abierto de lectura (ORF) se identificó el codón falso de paro (TGA) que codifica para la inserción del aminoácido selenocisteína. El elemento SECIS, necesario para la recodificación de este codón durante la traducción se encontró en la región 3' no traducida del mensajero a 224 pb en dirección 5' respecto a la señal de poliadenilación.

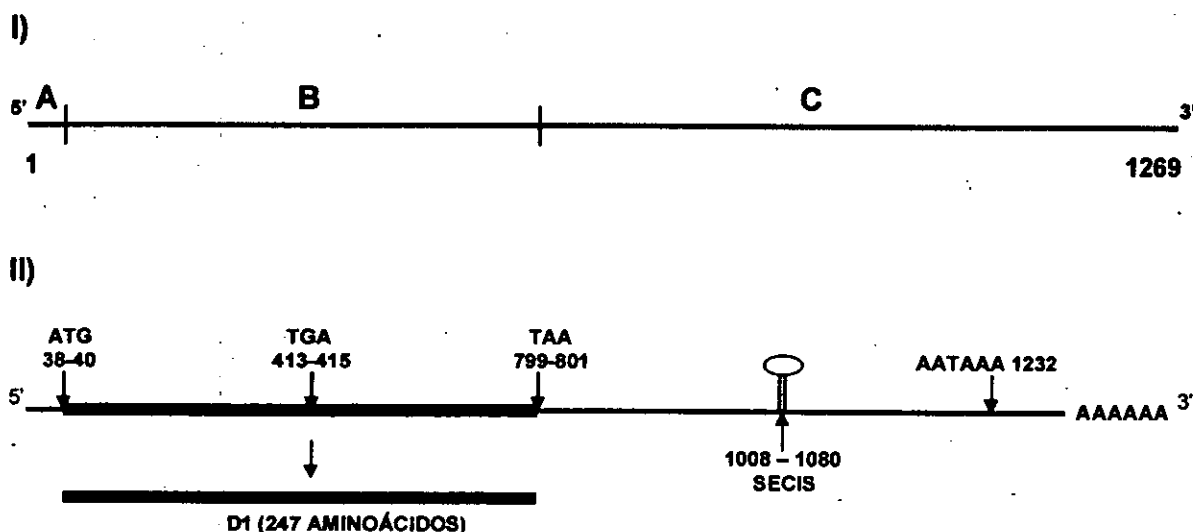


Figura 47. Esquema de las Características Estructurales del cDNA Clonado. I) A, región 5' no traducida; B, marco abierto de lectura (ORF) o región codificante; C, región 3' no traducida (3'UTR). II) ATG, codón de inicio de la traducción; TGA codón falso de paro que codifica para la inserción del aminoácido selenocisteína (Se-Cys); TAA, codón de paro de la traducción; SECIS, secuencia para la recodificación de Se-Cys; AATAAA, señal de poliadenilación; AAAAAA, cola de poli-A.

### I. TAMAÑO DEL MENSAJERO

El cDNA aislado en esta tesis es hasta la fecha, el más pequeño de los cDNAs que se han reportado para la D1 (1269 nucleótidos). Las diferencias en el tamaño inter-especie no son sorprendentes, y a la fecha, todos los cDNAs que se

han reportado para la D1 han mostrado diferentes tamaños. La longitud del cDNA básicamente se modifica en el tamaño del extremo 3' no traducido, ya que el tamaño de la región codificante varía de 732 a 771 nucleótidos y el de la región 5' no traducida entre 7 y 60 nucleótidos, (Cuadro 10).

**Cuadro 10. Tamaño de los cDNAs Clonados para la D1 en Vertebrados.**

	REFERENCIA.	REGIÓN 5' NO TRADUCIDA	MARCO ABIERTO DE LECTURA	REGIÓN 3' NO TRADUCIDA	cDNA CLONADO
<i>F. heteroclitus</i>	cDNA clonado en este trabajo	37	741	491	1269
Tilapia	Sanders et al. 1997	16	744	1641	2401
Gallo	Van der Geyten et al. 1997	-	738	633	1371
Perro	Toyoda et al. 1994	40	732	738	1510
Rata	Berry et al. 1991	7	771	1322	2100
Ratón	Maia et al. 1995	60	771	849	1680
Humano	Mandel et al. 1992	7	747	1467	2221

El tamaño está expresado como número de nucleótidos en las regiones especificadas

También se han encontrado diferencias intra-especie, como en el caso de hígado y de glándula mamaria de rata en donde se han clonado dos mensajeros para la D1 de diferente tamaño (2.1 y 1.6 kb); (Berry et al. 1991a; Navarro et al. 1997). Incluso, se han encontrado diferencias a nivel intra-órgano, como en el hígado de la rata en donde se expresan ambos mensajeros para la D1 (1.6 y 2.1 kb) al reducir 50 % los requerimientos de selenio. Además, cuando este oligoelemento se depleta completamente de la dieta, sólo se expresa el mensajero corto (Berry & Larsen, 1992; DePalo, 1994). Inicialmente, la presencia del mensajero corto se interpretó como secundaria a la degradación del mensajero largo; sin embargo, posteriormente se corroboró que los mensajeros cortos tanto de la glándula mamaria de rata (Navarro et al. 1997), como del hígado de perro (Toyoda et al. 1994) y de ratón (Maia et al. 1995) son funcionales, aunque la actividad específica de la D1 hepática en estas especies es 10 veces menor a la

actividad hepática en rata (Shoenmaker et al. 1992). Esto indica que el tamaño de los mensajeros podría participar en su regulación y que es importante estudiar el efecto que ejerce el tamaño de los mensajeros sobre su vida media y su velocidad de recambio.

## II. CODÓN DE INICIO DE LA TRADUCCIÓN ATG

El codón de iniciación de la traducción del cDNA de la D1 de *F. heteroclitus* se localiza en la posición 38-40 en dirección 3'. El tamaño de la secuencia 5' no traducida que antecede al codón de iniciación es variable en los vertebrados en los que se ha clonado el cDNA para estas enzimas (Cuadro 10).

La especificación del lugar de inicio de la traducción en una molécula de mRNA está determinada fundamentalmente por la proximidad al extremo "caperuza" 5' de la molécula. En este sitio la subunidad ribosómica pequeña se une al mRNA e inicia la búsqueda de un codón de iniciación ATG. Los nucleótidos que rodean inmediatamente al lugar de inicio de la traducción influyen en la eficiencia con que será reconocido el codón ATG durante el proceso de búsqueda (Alberts et al. 1994).

Se ha reportado que la secuencia del extremo 5' no traducida de algunos mRNAs puede participar en el control de la traducción. Este mecanismo de control post-transcripcional se describió inicialmente para el mRNA de la ferritina al cual se une una proteína represora de la traducción en la región 5' no traducible. Esta proteína represora se disocia del mensajero cuando se une al hierro. La liberación del mensajero reactiva su traducción y esto a su vez incrementa los niveles de ferritina para que cumpla su función como reservorio de Fe. Así, en condiciones de deficiencia de hierro, el mensajero de la ferritina no se traduce (Alberts et al. 1994).

Se cree que el selenio podría actuar a través de un mecanismo similar. En el caso de la selenoenzima glutatión peroxidasa (GPO) se ha reportado que el aporte del selenio regula la estabilidad de los mensajeros para esta enzima. La deficiencia del selenio disminuye tanto la cantidad del mensajero como de la enzima GPO, sin modificarse la tasa de transcripción (Toyoda et al. 1990a). La disminución del



aporte de selenio disminuye la actividad D1 hepática, así como la concentración del mensajero largo, mientras que en la tiroides incrementan ambos, enzima y mensajero (DePalo et al. 1994). La actividad D1 de la glándula tiroides es más resistente a la depleción del selenio y no se conoce el tamaño del mensajero en la glándula.

### III. SEÑAL DE POLIADENILACIÓN

La señal de poliadenilación presente en el cDNA de la D1 de *F. heteroclitus* es la secuencia AATAAA, localizada en la posición 1232-1237 después del elemento SECIS. La presencia de esta secuencia corroboró que se había alcanzado el extremo 3' terminal del DNA complementario. De las señales de poliadenilación, el cDNA clonado presentó la que utiliza el 90 % de los mensajeros hasta ahora conocidos (Manley, 1988), mientras que el cDNA de la D1 del hígado de perro, ratón, rata y tilapia presentan la señal de poliadenilación ATTTAA la cual es utilizada por el 10 % de los mensajeros. El cDNA de la D1 de la rata presenta dos señales de poliadenilación, la primera es la secuencia ATTTAA y la segunda es la señal de poliadenilación menos utilizada (TATAAA). Whale y Keller (1992) refieren que los mensajeros que utilizan las señales de poliadenilación menos frecuentes presentan múltiples sitios de poliadenilación y esto regula la expresión de la proteína. La presencia de dos señales de poliadenilación en la D1 de rata sugiere que la primera señal da lugar al mensajero corto. Por lo que la presencia de sitios alternativos de poliadenilación es uno de los factores que podrían participar en la regulación de la expresión de la proteína.

Además de los sitios alternativos de poliadenilación, en la región 3' UTR existen otras secuencias que participan en la regulación de la expresión mediante varios mecanismos. Entre éstas se encuentran las secuencias que modifican la estabilidad del mensajero y las que afectan la iniciación de la traducción.

Los mRNAs inestables son ricos en secuencias AU debido a que estas secuencias aceleran la eliminación de la cola de poli-A del extremo 3'. Otros mRNAs son inestables porque contienen lugares de reconocimiento para

endonucleasas específicas que cortan el mRNA en sus regiones UTR 3'. En el cDNA de la selenoproteína tioredoxina reductasa se ha encontrado que en la región 3'UTR existen múltiples secuencias repetidas AU (AUUUA), que disminuyen la estabilidad del mensajero debido a que se acelera la degradación de la cola de poli-A (Gasdaska, 1999). En el caso del mensajero de la D1 de *F. heteroclitus* no encontramos regiones ricas en secuencias AU.

Se ha observado que el incremento en la longitud de las colas de poli-A estimula notablemente la iniciación de la traducción debido a que existen proteínas de unión a la región poli-A que catalizan la entrada de la subunidad ribosómica grande en el ribosoma. En el caso del mensajero para la hormona del crecimiento se reportó que a mayor tamaño de la cola de poliadenilación del mensajero es mayor su estabilidad (Murphy et al. 1992). A la fecha no se conoce el efecto que ejerce el tamaño de las colas de poli-A de los mensajeros de las D1s sobre la expresión de estas enzimas.

El elemento SECIS localizado en la región 3'UTR de las selenoproteínas constituye un mecanismo de regulación de la expresión de estas moléculas, ya que dirige la elección entre la incorporación de selenocisteína o paro de la traducción. Debido al papel tan relevante en la regulación de la expresión en las desyodasas se describirá más adelante.

#### **IV. CODÓN TGA QUE CODIFICA PARA Se-Cys**

Gracias a las técnicas de la biología molecular se sabe que las tres desyodasas bioquímicamente identificadas pertenecen a una familia de selenoproteínas estructuralmente relacionadas. Las selenoproteínas se caracterizan por presentar uno o más residuos del aminoácido selenocisteína en su estructura. Todas las selenoenzimas identificadas a la fecha son oxidorreductasas y el residuo Se-Cys ocupa el sitio activo. Este residuo es codificado por el codón TGA. El codón TGA es una de las señales de paro de la traducción más utilizadas, sin embargo, los cDNAs que codifican para las selenoproteínas se caracterizan por la presencia del codón TGA dentro del marco abierto de lectura. Para la

recodificación del codón de paro como un codón para insertar Se-Cys durante la traducción se requiere al elemento SECIS, el cual se discutirá en detalle más adelante.

Uno de los hallazgos más relevantes de este trabajo fue la identificación del codón TGA en el cDNA clonado. En efecto, en el cDNA del hígado de *F. heteroclitus* el codón TGA se identificó en el marco abierto de lectura y ocupa la posición 413-415 en dirección 3' del mensajero completo. Después de la traducción de este codón la selenocisteína ocupa la posición 126 en la secuencia de aminoácidos (Fig 43). Cabe resaltar que la posición de este residuo está conservada en la D1 de la tilapia, el ratón, la rata y el humano. La conservación de este rasgo en los cDNAs clonados para la D1 nos demuestra su importancia funcional.

Las secuencias de nucleótidos que flanquean al codón TGA codifican para aminoácidos homólogos en las D1s clonadas. Esto sugiere que son importantes funcionalmente, ya que participan en la conformación de la estructura tridimensional del sitio activo de estas enzimas. Desde el punto de vista de la eficiencia de la traducción se ha visto que las secuencias que flanquean al triplete TGA no afectan el reconocimiento por la secuencia SECIS.

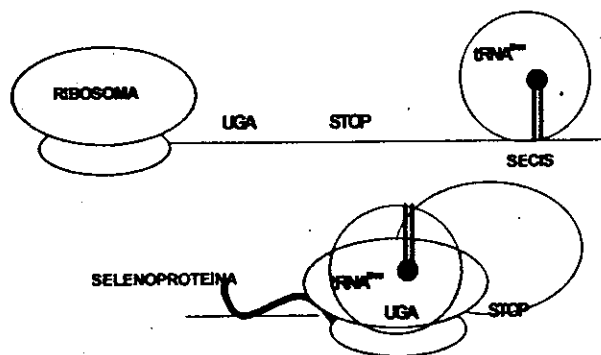
## **V. SECUENCIA QUE RECODIFICA EL CODÓN PARA LA SELENOCISTEÍNA DURANTE LA TRADUCCIÓN (SECIS)**

Para el proceso de traducción de las selenoproteínas se requieren múltiples componentes: a) tRNAs cargados con Se-Cys (selenocisteil-tRNA<sup>Sec</sup>), b) enzimas que producen estos tRNAs y 3) un mecanismo de recodificación del codón TGA como una señal para la inserción del residuo Se-Cys, entre otros. El mecanismo de reconocimiento del codón TGA en eucariotas lo constituye una región conservada (SECIS) que se encuentra en la región 3' no traducida de los mensajeros que codifican a las selenoproteínas. Así, esta secuencia forma una estructura secundaria plegada (tallo-horquillas) que interacciona con la selenocisteil-tRNA<sup>Sec</sup> y el ribosoma. La caracterización funcional del elemento SECIS ha revelado que

tanto la estructura primaria como la estructura secundaria de esta región son importantes para su función. Las secuencias inmediatas al codón TGA no afectan al reconocimiento. También se ha identificado que para la óptima función de los elementos SECIS son necesarios tres residuos de ácido adenilico AAA en la horquilla del extremo superior por lo que se cree que es un sitio de interacción con la selenocisteil-tRNA<sup>Sec</sup>. También se ha reportado que las secuencias conservadas no apareadas ATGA y TGG<sup>A</sup> en el brazo 5' y 3' del tallo, afectan la función de este sistema. Mediante mutaciones de esta región se ha demostrado que para la óptima función de este elemento SECIS se requiere de una distancia mínima respecto a la posición del codón UGA (Berry et al. 1991c; Berry et al. 1993b). En el cDNA de la D1 de rata la distancia entre el codón UGA y el elemento SECIS es de 1.2 kb, pero el elemento funciona aún cuando la distancia se incrementa a 2.7 kb (Low & Berry, 1996). Con todo esto el mecanismo propuesto para la recodificación del codón UGA es a través de la formación de un complejo formado por SECIS, selenocisteil-tRNA<sup>Sec</sup> y el ribosoma (Fig. 48). También se propone que este complejo debe interaccionar con un factor de elongación, ya que este componente es necesario para la traducción de las selenoproteínas en procariotes.

El cDNA de *F. heteroclitus* contiene una secuencia homóloga a la secuencia consenso SECIS en la región 3' no traducida. Este elemento SECIS tiene un tamaño de 72 nucleótidos (1008-1080). A diferencia del cDNA de la D1 de tilapia que presentó dos regiones SECIS, nosotros sólo encontramos una región SECIS, como en el resto de las D1s clonadas hasta ahora. La presencia de dos regiones SECIS también se ha reportado en otras selenoproteínas como la selenoproteína P (Berry et al. 1993b). La alineación de los elementos SECIS reportados en el cDNA de tilapia con la secuencia completa del cDNA clonado del hígado de *F. heteroclitus* reveló que existe un elevado porcentaje de identidad entre estas secuencias (85%), (Fig. 42). La comparación de la estructura secundaria de la región SECIS de *F. heteroclitus* con la del humano, la rata y la tilapia predijo que este elemento presenta un arreglo típico de la SECIS forma 1 reportada para los cDNAs que codifican la D1 en otros vertebrados (Fig. 36). Es importante resaltar que también

se identificaron en esta secuencia los tres residuos de ácido poliadenílico necesarios para la función de esta secuencia en la posición 1041-1043 justo en la horquilla mayor. La distancia entre la parte media del elemento SECIS y el codón TGA fue de 630 pb. Aún cuando todos los hallazgos indican que la secuencia SECIS del cDNA clonado lleva a cabo la función de recodificación del codón TGA durante la traducción de este mensajero, la capacidad funcional de esta secuencia SECIS no podrá demostrarse hasta que se hagan estudios de expresión del mensajero.



**Figura 48. Mecanismo Propuesto para la Incorporación de la Selenocisteína.** La estructura secundaria del elemento SECIS y sus secuencias consenso interaccionan con el selenocisteil-tRNA<sup>Sec</sup>, este complejo se pliega para alcanzar el ribosoma evitando así que el codón UGA interrumpa la traducción y en vez de esto sea incorporada la selenocisteína.

## VI. LA SELENOPROTEÍNA CLONADA ES UNA DESYODASA HOMÓLOGA A LAS D1s DE OTROS VERTEBRADOS

A pesar de que las desyodasas no se han purificado, los recursos metodológicos que ofrecen la bioquímica y la biología molecular han permitido establecer las principales propiedades funcionales, cinéticas y moleculares de estas proteínas. Así, a partir del análisis de las secuencias de aminoácidos deducidas de los cDNAs de las desyodasas se ha encontrado que existen tres tipos de estas enzimas y esto concuerda con la observación de los tres procesos catalíticos

descritos bioquímicamente. Además, a partir de estos estudios y debido a su estrecha relación estructural y funcional se ha propuesto que estas enzimas evolucionaron a partir de un gen ancestral común. En apoyo a lo anterior, el porcentaje de identidad de la secuencia de aminoácidos deducida del cDNA clonado con todas las desyodasas reportadas a la fecha mostró que su relación estructural es mayor con las D1s (49 %), que con las D2s (34 %) o las D3s (38%) (Fig. 44).

**A. PRESENCIA DEL RESIDUO DE SELENOCISTEÍNA (Se-Cys).** La comparación de la secuencia de aminoácidos de las D1s ha mostrado que en los diferentes vertebrados existen grupos de aminoácidos conservados a lo largo de toda la escala evolutiva. En este sentido, actualmente se han identificado los aminoácidos que pudieran tener un papel crítico en la función de la D1. Entre estos, el aminoácido selenocisteína ocupa el lugar más relevante. En efecto, en la D1 de *F. heteroclitus* se encontró el residuo Se-Cys en la posición 126, el cual se encuentra flanqueado por una secuencia de aminoácidos 100 % conservada en las D1s (FGSCTXP). Lo anterior sugiere, que las interacciones entre ese grupo de aminoácidos confieren las propiedades estructurales críticas para la función de la enzima. En la Figura 49 se muestra la alineación de la secuencia de aminoácidos del sitio catalítico de las Ds clonadas. Como se observa, además de que este grupo de aminoácidos está muy conservado en todas las desyodasas, resalta la homología entre las D1s de peces. También resulta interesante que el residuo de prolina en la posición 128 es homólogo entre las D1s de peces y las D2s y D3s. De acuerdo con esto proponemos que el residuo de prolina que ocupa la posición 128 en las D1s de peces podría ser el responsable de la baja sensibilidad de estas enzimas a ser inhibidas por PTU, ya que como sabemos las D2s y D3s se caracterizan por ser poco sensibles a su inhibición por este compuesto.

	DESYODASA TIPO 1											124		128	
<i>F. heteroclitus</i>	R	P	L	V	L	S	F	G	S	C	T	*	P	P	F
Tilapia	R	P	L	V	L	S	F	G	S	C	T	*	P	P	F
Gallo	R	P	L	I	L	N	F	G	S	C	T	*	P	S	F
Rata	R	P	L	V	L	N	F	G	S	C	T	*	P	S	F
Ratón	R	P	L	V	L	N	F	G	S	C	T	*	P	S	F
Perro	R	P	L	V	L	N	F	G	S	C	T	*	P	S	F
Humano	R	P	L	V	L	N	F	G	S	C	T	*	P	S	F

	DESYODASA TIPO 3														
Humano	R	P	L	V	L	N	F	G	S	C	T	*	P	P	F
Rata	R	P	L	V	L	N	F	G	S	C	T	*	P	P	F
Xenopus	R	P	L	V	L	N	F	G	S	C	T	*	P	P	F

	DESYODASA TIPO 2														
<i>F. heteroclitus</i>	R	P	L	V	V	N	F	G	S	A	T	*	P	P	F
Pollo	R	P	L	V	V	N	F	G	S	A	T	*	P	P	F
Ratón	R	P	L	V	V	N	F	G	S	A	T	*	P	P	F
Rata	R	P	L	V	V	N	F	G	S	A	T	*	P	P	F
Rana	R	P	L	V	V	N	F	G	S	A	T	*	P	P	F
Humano	R	P	L	V	V	N	F	G	S	A	T	*	P	P	F

Figura 49. Secuencia de Aminoácidos del Sitio Activo de las Desyodasas tipo 1, 2 y 3. La posición de la selenocisteína está representada por un asterisco. En rojo se resaltan las diferencias entre estas secuencias.

Como se ha señalado la actividad de las desyodasas depende de la presencia del residuo Se-Cys en el sitio activo. El significado fisiológico de Se-Cys quedo demostrado con la mutación del codón TGA, por uno que codifica para la cisteína (TGT). Los resultados de estos trabajos mostraron que la actividad de la enzima mutante fue 90 % menor a la de la enzima nativa. Lo anterior indica que aún cuando el grupo de aminoácidos del sitio activo son importantes para la función de estas enzimas, el residuo Se-Cys es indispensable para que las desyodasas sean activas catalíticamente.

**B. PRESENCIA DE LAS CISTEÍNAS EN LAS POSICIONES 124 Y 194.** Se ha demostrado que los residuos de cisteína en las proteínas participan en la función de estas biomoléculas porque pueden proporcionar un átomo de azufre nucleofílico o alterar la conformación de la proteína mediante la formación de enlaces disulfuro.

Las desyodasas presentan 6-7 residuos de cisteína de los cuales la Cys<sup>124</sup> y Cys<sup>194</sup> son las más conservadas. Debido a que en todas las D1s y D3s clonadas está conservado el residuo de cisteína localizado a dos residuos del extremo amino de la Se-Cys (Cys<sup>124</sup>), se realizaron estudios de mutagénesis encaminados a analizar el efecto de la posición de este aminoácido sobre la actividad de estas enzimas. Debido a que en las D2s esta posición está ocupada por un residuo de alanina se construyó la mutante Cys<sup>124</sup>Ala. La Km y Vmax de la enzima mutante *in vitro* fueron menores y fue menos sensible a la inhibición por PTU (Sun et al. 1997). Posteriormente se demostró que la mutación Cys<sup>124</sup>Ala y Cys<sup>194</sup>Ala afecta las características cinéticas de la actividad 5'D1 en los ensayos *in vitro*. Los efectos de estas mutantes en homogenados son complejos y dependen del cofactor empleado, estos efectos son aún más notables cuando se utilizan como cofactores el glutatión o la tioredoxina. La función de estas mutantes no se alteró *in vivo*, por lo que se llegó a la conclusión de que los residuos de cisteína en la posición 124 y 194 no determinan catalítica o estructuralmente la actividad de esta enzima (Croteau et al. 1998).

En la D1 de *F. heteroclitus* se encuentran conservadas las cisteínas de la posición 124 y 194. Aunque se ha reportado que no tienen importancia funcional *in vivo* (Croteau et al. 1998), es interesante que estas cisteínas estén conservadas en todas las D1s clonadas. Para nosotros este dato constituyó una evidencia más que identifica a nuestra proteína como una D1.

**C. PRESENCIA DE LOS RESIDUOS DE HISTIDINA EN LAS POSICIONES 158 Y 174.** Otros residuos de aminoácidos que parecen ser esenciales para la actividad D1 son las histidinas en las posiciones 158 y 174 (Berry, 1992). Estas histidinas están cercanas al sitio activo (Se-Cys) y son esenciales para la unión al sustrato. La D1 posee otro residuo de histidina en la posición 185 pero no participa en la desyodación, ya que su remoción no tiene efecto en la actividad de la D1. Con los estudios de mutagénesis se encontró que la remoción de la histidina 158 dio como resultado una proteína totalmente inactiva. Lo anterior sugiere que este residuo juega un papel muy importante en la catálisis o en la conformación de la enzima



(Berry, 1992). Los compuestos que reaccionan con histidinas como el rosa de bengala y el dietilpirocarbonato (DEPC) también inhiben la actividad ORD (Mol et al. 1984). El cambio de la histidina 174 por asparagina o glutamina alteró la reactividad por el sustrato y redujo la inhibición por el DEPC y por el rosa de bengala, indicando que este residuo es crítico para la desyodación.

La D1 de *F. heteroclitus* también presentó los residuos de histidina en la posición 158 y 174. Esto apoya la relevancia fisiológica de estos residuos.

**D. PRESENCIA DE LA FENILALANINA EN LA POSICIÓN 65.** La D1 de perro difiere de las D1s de rata y humano debido a que exhibe una ORD baja para  $rT_3$ . Este dato hizo que se evaluaran las diferencias estructurales entre las D1s conocidas con la del perro. La D1 hepática del perro tiene una  $K_m$  para la  $rT_3$  25 veces menor que la del humano y su especificidad por el sustrato es  $T_3S(IRD) > T_2S(ORD) > rT_3(ORD) > T_4 \approx T_3(IRD)$ . La especificidad por el sustrato de la D1 de humano es  $rT_3(ORD) > T_2S(ORD) \approx T_4 \approx T_3(IRD)$ . Entre las diferencias en la estructura primaria de estas enzimas se encontró que en la D1 de rata y la de humano existe un residuo de Phe en la posición 65, mientras que en la D1 del perro esta posición está ocupada por una leucina (Fig 45). El análisis por mutagénesis demostró que esta Phe en la posición 65 de la D1 de rata y humano, es la que confiere especificidad para catalizar preferencialmente a la  $rT_3$  (Toyoda et al. 1994). En la D1 de *F. heteroclitus* el aminoácido en la posición 65 es una tirosina. Esto es distinto a la leucina del perro y a la fenilalanina del resto de las D1s. Así, la D1 del hígado de *F. heteroclitus* y del hígado de perro son las únicas D1s que no presentan el aminoácido Phe en la posición 65. A la fecha no se conoce el efecto que esta diferencia podría tener en la especificidad de la D1 de *F. heteroclitus* ya que, aún no se ha evaluado su actividad utilizando como sustratos a las tironinas sulfatadas  $T_3S$  y  $T_2S$ . Sin embargo, se sabe que la D1 hepática de *F. heteroclitus* tiene una  $K_m$  para  $rT_3$  5 veces menor que la reportada en mamíferos (Orozco, 1997).

**E. ANÁLISIS DE HIDROPATÍA.** El análisis de hidropatía de la secuencia de aminoácidos de las D1s ha mostrado que en el extremo amino terminal se

encuentra una región hidrofóbica de aproximadamente 35 aminoácidos que indica la posición de la porción transmembranal que atraviesa la bicapa lipídica. Esta secuencia inicia entre los aminoácidos 11-12 y termina entre los aminoácidos 34-39. La comparación del análisis de hidropatía de la D1 de *F. heteroclitus* con la D1 de rata y la D1 de tilapia mostró primeramente que existe gran similitud en la distribución de tendencias del carácter hidrofóbico e hidrofílico de estas cadenas polipeptídicas (Fig. 46).

## VII. EL HÍGADO DE *F. heteroclitus* EXPRESA LA DESYODASA TIPO 1

La desyodación periférica de las hormonas tiroideas en mamíferos y en otros vertebrados ha sido uno de los tópicos más estudiados de la fisiología tiroidea durante los últimos 20 años. Los resultados de estos estudios han revelado la importancia fisiológica de estas vías metabólicas fundamentales en la regulación de la bioactividad de las hormonas tiroideas. Así, a la fecha se ha completado la caracterización de las propiedades bioquímicas de estas enzimas en mamíferos. Los estudios en otros vertebrados han mostrado ciertas discrepancias debido a la falta de estandarización de las condiciones de ensayos, pero lo que sí es consistente es la relevancia fisiológica y la conservación de estas enzimas a lo largo de la evolución. La disponibilidad de técnicas de biología molecular ha permitido iniciar el estudio de la estructura molecular básica de estas enzimas y de los factores que regulan su expresión.

Los estudios de la desyodación en peces también han resaltado la relevancia fisiológica de estas enzimas en esta clase de vertebrados. La caracterización bioquímica inicial de las vías desyodativas en peces mostró resultados contradictorios. Ésto impulsó su reevaluación. En este replanteamiento se estandarizaron las condiciones de los ensayos de la vía ORD y así, Orozco y col. encontraron que en el hígado de la trucha arcoiris (1997) y el *F. heteroclitus* (2000) se expresa actividad desyodativa D1 y D2. A partir de este hallazgo, el hígado de estos peces se constituye en un excelente modelo para continuar con el estudio de la regulación de estas enzimas. En este contexto, de los vertebrados estudiados, el hígado de peces es el único que co-expresa la D1 y la D2. Fuera de

este órgano de peces, sólo la hipófisis de rata presenta esta expresión. Así, en este trabajo se clonó y caracterizó un cDNA que de acuerdo a sus características estructurales corresponde a un mRNA que codifica para la D1 en el hígado de *F. heteroclitus*.

## CONCLUSIONES

Los hallazgos más importantes de la presente tesis son los siguientes:

1. El cDNA clonado presenta el codon TGA que codifica para la selenocisteína en el marco abierto de lectura.
2. El cDNA clonado presenta la secuencia para la inserción del aminoácido selenocisteína (SECIS) en la región 3' no traducida.
3. La secuencia de aminoácidos deducida del cDNA clonado muestra un 48 % de identidad con las secuencias de aminoácidos de las D1s del resto de los vertebrados estudiados.
4. Los residuos de histidina esenciales para la actividad de la enzima están presentes en las posiciones 158 y 174.

Por todo lo anterior podemos concluir que:

**EL HÍGADO DE *Fundulus heteroclitus* EXPRESA LA DESYODASA TIPO 1**

**ESTA PROTEÍNA ES UNA SELENOENZIMA HOMÓLOGA A LAS D1s DEL RESTO DE VERTEBRADOS**

## PERSPECTIVAS

Como se ha mencionado antes, este trabajo forma parte de un proyecto más amplio encaminado al estudio de la regulación de las desyodasas, utilizando como modelo el hígado de algunos teleósteos. Para avanzar hacia esta meta, a partir de los resultados obtenidos en esta tesis se pretenden alcanzar los siguientes objetivos a mediano plazo:

1. Continuar con la caracterización funcional de la enzima clonada en este trabajo. Para este fin se clonará el D1-cDNA en un vector diseñado para la expresión de proteínas en ovocitos de *Xenopus laevis*. Se evaluará la actividad desyodativa de la proteína traducida en homogenados de ovocitos. Una vez comprobado que se tiene clonada una enzima D1 funcional, se determinarán sus parámetros cinéticos y se compararán con los reportados en homogenados de hígado de *F. heteroclitus*.
2. A partir de los resultados de la caracterización bioquímica se hará una construcción para evaluar el efecto del residuo de prolina en la posición 128 (P<sup>128</sup>), sobre la sensibilidad de este enzima a la inhibición por PTU. Para avanzar en el conocimiento de las relaciones estructura-función de estas enzimas se determinará si la insensibilidad de la D1 de *F. heteroclitus* está determinada por P<sup>128</sup>, ya que en las D1s el residuo de la posición 128 lo ocupa una serina (S). Por esta razón se hará la mutación P<sup>128</sup>S y después de expresar esta mutante se determinará si se altera su sensibilidad al PTU, respecto a la enzima nativa.
3. También se pretende realizar el análisis de northern blot utilizando como sonda el D1-cDNA clonado. El objetivo de este análisis será verificar el tamaño del mensajero clonado y su expresión en el hígado de *F. heteroclitus*. Además, evaluaremos la regulación de la expresión del mensajero de la D1. Entre los factores que nos interesa probar están algunos medioambientales (temperatura, salinidad) y fisiológicos (ayuno y HT).

## REFERENCIAS

- Aceves C y Valverde-R C. 1989. Type I, 5'-monodeiodinase activity in the lactating mammary gland. *Endocrinol.* **124**, 2818-2820.
- Aceves C, Pineda O, Ramírez-C I, Navarro ML y Valverde-R C. 1999. Mammary type I deiodinase is dependent on the suckling stimulus: differential role of norepinephrine and prolactin. *Endocrinol.* **140**, 1-6.
- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K y Watson JD. 1994. *Biología Molecular de la Célula*. (pp. 494-497). Barcelona: Ediciones Omega.
- Ball JN. 1981. Hypotalamic control of the pars distalis in fishes, amphibians and reptiles. *Gen. Comp. Endocrinol.* **44**, 135-170.
- Baxter J y Funder J. 1979. Hormone receptors. *N. Engl. J. Med.* **301**, 1149-1156.
- Becker KB, Schneider MJ, Davey JC y Galton VA. 1995. The type III deiodinase in *Rana catesbeiana* tadpoles is encoded by a thyroid hormone-responsive gene. *Endocrinol.* **136**, 4424-4431.
- Behne D, Kyriakopoulos A, Meinhold H y Köhrle J. 1990. Identification of type I iodothyronine 5'-deiodinase as a selenoenzyme. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **173**, 1143-1149.
- Bentley PJ. 1998. *Comparative Vertebrate Endocrinology*. (p. 31). Cambridge UK: Cambridge University Press.
- Berry MJ. 1992. Identification of essential histidine residues in rat type I iodothyronine deiodinase. *J. Biol. Chem.* **267**, 18055-18059.
- Berry MJ y Larsen PR. 1992. The role of selenium in thyroid hormone action. *Endocrin. Rev.* **13**, 207-219.
- Berry MJ, Banu L y Larsen PR. 1991a. Type I iodothyronine deiodinase is a selenocysteine-containing enzyme. *Nature* **349**, 438-440.
- Berry MJ, Kieffer JD, Harney JW y Larsen PR. 1991b. Selenocysteine confers the biochemical properties of type I iodothyronine deiodinase. *J. Biol. Chem.* **266**, 14155-14158.
- Berry MJ, Banu L, Chen Y, Mandel SJ, Kieffer JD, Harney JW y Larsen PR. 1991c. Recognition of UGA as a selenocysteine codon in type I deiodinase requires sequences in 3' untranslated region. *Nature* **353**, 273-276.
- Berry MJ, Grieco D, Taylor BA, Maia AL, Kieffer JD, Beamer W, Glover E, Poland A y Larsen PR. 1993a. Physiological and genetic analysis of inbred mouse strains with a type 1 iodothyronine 5' deiodinase defect. *J. Clin. Invest.* **92**, 1517-1528.
- Berry MJ, Banu L, Harney JW y Larsen PR. 1993b. Functional characterization of the eucaryotic SECIS elements with direct selenocysteine insertion at UGA codons. *EMBO J.* **12**, 3315-3322.
- Biddiscombe S e Idler DR. 1983. Plasma levels of thyroid hormones in sockeye salmon. (*Oncorhynchus nerka*). Decrease before spawning. *Gen. Comp. Endocrinol.* **52**, 467-470.
- Bromage NR. 1975. The effects of mammalian thyrotropin-releasing hormone on the pituitary-thyroid axis of teleost fish. *Gen. Comp. Endocrinol.* **25**, 292-297.

- Brown SB, MacLatchy DL, Hara TJ y Eales JG. 1991. Effects of cortisol on aspects of 3,5,3'-triiodo-L-thyronine metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Gen. Comp. Endocrinol.* **81**, 207-216.
- Buettner C, Harney JW y Larsen PR. The 3'-untranslated region of human type 2 iodothyronine deiodinase mRNA contains a functional selenocysteine insertion sequence element. *J. Biol. Chem.* **273**, 33374-33378.
- Byamungu N, Cornielle S, Mol K, Darras V y Kühn ER. 1990. Stimulation of thyroid function by several pituitary hormones results in an increase in plasma thyroxine and reverse triiodothyronine in tilapia (*Tilapia nilotica*). *Gen. Comp. Endocrinol.* **80**, 33-40.
- Byamungu N, Mol K y Kühn ER. 1992. Evidence for the kidney as an important resource of 5'-monodeiodination activity and stimulation by somatostatin in *Oreochromis niloticus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **88**, 199-208.
- Clarke DJ, Burchell B y George SG. 1992. Functional and immunochemical comparison of hepatic UDP-glucuronosyltransferases in a piscine and a mammalian species. *Comp. Biochem. Physiol.* **102B**, 425-432.
- Croteau W, Whittemore SL, Schneider MJ y St. Germain DL. 1995. Cloning and expression of a cDNA for a mammalian type III iodothyronine deiodinase. *J. Biol. Chem.* **270**, 16569-16575.
- Croteau W, Davey JC, Galton VA y St Germain DL. 1996. Cloning of the mammalian type II iodothyronine deiodinase: A selenoprotein differentially expressed and regulated in the human brain and other tissues. *J. Clin. Invest.* **98**, 405-417.
- Croteau W, Bodwell JE, Richardson JM y St Germain DL. 1998. Conserved cysteines in the type I deiodinase selenoprotein are not essential for catalytic activity. *J. Biol. Chem.* **273**, 25230-25236.
- Cyr DG, MacLatchy DL y Eales JG. 1988. The influence of short-term 17- $\beta$ -estradiol treatment on plasma T3 levels and in vitro hepatic T4 5'-monodeiodinase activity in immature rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **69**, 431-438.
- Chan HH y Eales JG. 1975. Identification of iodoamino acids in the plasma and bile of brook trout, *Salvelinus fontinalis* (Mitchill). *Can. J. Zool.* **53**, 97-101.
- Chomczynski P y Sachi N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**, 156-159.
- Chopra IJ, Salomon DH, Chopra V, Yung WS, Fisher DA y Nakamura Y. 1978. Pathways of metabolism of thyroid hormones. *Rec. Prog. Horm. Res.* **34**, 521-532.
- Chopra IJ. 1996. Nature, source and relative significance of circulating thyroid hormones. En: Braverman LE, Utiger RD (Eds.), Warner and Ingbar's *The Thyroid: A Fundamental and Clinical Text*. (pp. 111-124). Philadelphia: Lippincott-Raven.
- Davey JC, Becker KB, Schneider MJ, St Germain DL y Galton VA. 1995. Cloning of a cDNA for the type II iodothyronine deiodinase. *J. Biol. Chem.* **270**, 26786-26789.
- Davey JC, Schneider MJ, Becker KB y Galton VA. 1999. Cloning of a 5.8 kb cDNA for a mouse type 2 deiodinase. *Endocrinol.* **140**, 1022-1025.
- Davis PJ. 1991. Cellular actions of thyroid hormones. En: Braverman LE, Utiger RD (Eds.), Warner and Ingbar's *The Thyroid: Fundamental and Clinical Text* (pp. 190-203). Philadelphia: Lippincott-Raven.

- Davis PJ y Davis FB. 1996. Nongenomic actions of thyroid hormone. *Thyroid* **6**, 497-504.
- DeGroot Leslie J y Taurog Alvin. 1979. Secretion of thyroid hormone. En: DeGroot LJ, Cahill GF, Odell WD, Martini L, Potts JT, Nelson HD, Steinberg E y Winegrad AL. (Eds.), *Endocrinology*. (pp.343-347). USA: Grune & Stratton.
- DeLuze A, Leloup J, Papkoff H, Kikuyama S y Kawauchi H. 1989. Effects of vertebrate prolactins and growth hormones on thyroxine 5'-monodeiodination in the eel (*Anguilla anguilla*): a potential bioassay for growth hormone. *Gen. Comp. Endocrinol.* **73**, 186-193.
- DePalo D, Kinlaw WB, Zhao C, Engelberg-Kulka H y St Germain DL. 1994. Effect of selenium deficiency on type I 5'-deiodinase. *J. Biol. Chem.* **269**, 16223-16228.
- Dickhoff WW, Folmar LC y Gorbman A. 1978. Changes in plasma thyroxine during smoltification of coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **36**, 229-232.
- Docter R y Krenning EP. 1990. Role of cellular transport system in the regulation of thyroid hormone bioactivity. En: Greer MA (Ed.), *The Thyroid Gland*. (pp. 233-254). New York: Raven Press.
- Dutkiewicz M, Witeska A y Naumann A. 1995. The deiodination of thyroxine to triiodothyronine in the testes of patients with prostate cancer. *Int. Urol. Nephrol.* **27**, 81-85.
- Eales JG. 1972. Radiothyroxine metabolism in several freshwater teleost fishes. *Can. J. Zool.* **50**, 623-631.
- Eales JG. 1979. Comparison of L-thyroxine and 3,5,3'-triiodo-L-thyronine kinetics in fed and starved rainbow trout. *Salmo gairdneri*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **45**, 167-174.
- Eales JG y Brown SB. 1993. Measurement and regulation of thyroidal status in teleost fish. *Rev. Fish Biol.* **3**, 299-347.
- Eales JG y Finnson KR. 1991. Response of hepatic thyroxine 5'-deiodinase of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, to chronic ingestion of 3,5,3'-triiodo-L-thyronine. *J. Exp. Zool.* **257**, 230-235.
- Eales JG y Himick BA. 1988. The effects of TRH on plasma thyroid levels of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) and arctic charr (*Salvelinus alpinus*). *Gen. Comp. Endocrinol.* **72**, 333-339.
- Eales JG y Shostak S. 1985. Free T<sub>4</sub> and T<sub>3</sub> in relation to total hormone, free hormone indices and protein in plasma of rainbow trout and arctic charr. *Gen. Comp. Endocrinol.* **58**, 291-302.
- Engler D y Burger AG. 1984. The deiodination of the iodothyronines and their derivatives in man. *Endocr. Rev.* **5**:151-184.
- Escobar F, Escobar H y Morreale G. 1992. Fisiología del tiroides. En: Tresguerres JAF. (Eds.), *Fisiología Humana*. (pp. 947-970). España: McGraw Hill-Interamericana.
- Evans DH. 1993. *The Physiology of Fishes*. (p. 479). Boca Raton FLA: CRC Marine Science Series.
- Everts ME, Docter R, Moerings EPCM, van Koetsveld PM, Visser TJ, De Jong M, Krenning EP y Hennemann G. 1994. Uptake of thyroxine in cultured anterior pituitary cells of euthyroid rats. *Endocrinol.* **134**, 2490-2497.



- Fenton B, Orozco A y Valverde-R C. 1997. Kinetic characterization of skin inner-ring deiodinative pathway and its correlation with circulating level of reverse tri-iodothyronine in developing rainbow trout. *J. of Endocrinol.* **154**, 547-554.
- Finnson KW, McLeese M y Eales JG. 1999. Deiodination and deconjugation of thyroid hormone conjugates and type I deiodination in liver of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **115**, 387-397.
- Gasdaska JR, Harney JW, Gasdaska PY, Powis G y Berry MJ. 1999. Regulation of human thioredoxin reductase expression and activity by 3'-untranslated region selenocysteine insertion sequence and mRNA instability elements. *J. Biol. Chem.* **274**, 25379-25385.
- Gereben B, Bartha T, Tu HM, Harney JW, Rudas P y Larsen PR. 1999. Cloning and expression of the chicken type 2 iodothyronine 5'-deiodinase. *J. Biol. Biochem.* **274**, 13768-13776.
- Gómez VE, Bolaños F y Valverde RC. 1990. Tiroides. En: Malacara JM, García VM y Valverde-R C (Eds.) *Fundamentos de Endocrinología*. México: Salvat.
- Gorbman A. 1969. Thyroid functions and its control in fishes. En: *Fish Physiology*, Volumen II. (pp. 241-271). New York: Academic Press.
- Gorbman A y Hyder M. 1973. Failure of mammalian TRH to stimulate thyroid function in the lungfish. *Gen. Comp. Endocrinol.* **20**, 588-589.
- Gorbman A y Bem HA. 1983. *A TextBook of Comparative Endocrinology* New York: John Wiley and Sons.
- Goswani VA y Rosenberg IN. 1988. Effects of glutathione on iodothyronine 5' deiodinase activity. *Endocrinol.* **123**, 192-202.
- Grace de Jesus E, Hirano T e Inui Y. 1991. Changes in cortisol and thyroid hormone concentrations during early development and metamorphosis in the Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **82**, 369.
- Grau GE, Dickhoff WW, Bem HA y Folmar LC. 1981. Lunar phasing of the thyroxine surge preparatory to the seaward migration of salmonid fish. *Science* **211**, 607-609.
- Grau GE, Helms LM, Shimoda SK, Ford CA, LeGrand J y Yamauchi K. 1986. The thyroid gland of the Hawaiian parrot-fish and its use as an *in vitro* model system. *Gen. Comp. Endocrinol.* **61**, 100-108.
- Guyton Arthur C. 1992. *Tratado de Fisiología Médica*. (pp. 867-871). España: McGraw-Hill-Interamericana.
- Hashimoto H, Igarashi N, Miyakawa T y Sato T. 1995. Effects of tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1 beta, and interleukin-6 on type I iodothyronine 5'-deiodination in rat thyroidal cell line FRTL-5. *J. Interfer. Cyto. Res.* **15**, 367-375.
- Higgs DA y Eales JG. 1977. Influence of food deprivation of radiothyronine and radioiodide kinetics in yearling brook trout, *Salvelinus fontinalis* (Mitchill), with a consideration of the extent of L-Thyroxine conversion to 3,5,3'-triiodo-L-thyronine. *Gen Comp. Endocrinol.* **78**, 29-40.
- Hove VD y Broucke MF. 1980. Secretion of thyroid hormone. En: Visscher MD (Ed.), *The Thyroid* (pp. 61-79). New York: Raven Press.

- Inui Y, Tagawa M, Miwa S y Hirano T. 1989. Effects of bovine TSH on the tissue thyroxine level and metamorphosis in prometamorphic flounder larvae. *Gen. Comp. Endocrinol.* **74**, 68-76.
- Ishii H, Inada M, Tanaka K, Mashio Y, Naito K, Nishikawa M, Mtsuzuca F, Kuma K e Imura H. 1983. Induction of outer and inner ring monodeiodinases in human thyroid gland by thyrotropin. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **57**, 500-505.
- Jakobs TC, Schumtzler C y Köhrle J. 1995. Identification of a T3 responsive element in the upstream regulatory region of the hyman type I 5'-deiodinase gene. *Thyroid* **5**, S130 (Abstract).
- Jakobs TC, Koehler MR, Schumtzler C, Glaser F, Schmid M y Köhrle J. 1997. Structure of the human type I iodothyronine 5'-deiodinase gene and localization to chromosome 1p32-p33. *Genomics* **42**, 361-363.
- Kaplan MM y Utiger RD. 1978. Iodothyronine metabolism in rat liver homogenates. *J. Clin. Invest.* **61**, 459-471.
- Kaplan MM. 1980. Thyroxine 5'-monodeiodination in rat anterior pituitary homogenates. *Endocrinol.* **106**, 567-576.
- Kaplan MM. 1984. The role of thyroid hormone deiodination in the regulation of hypothalamus-pituitary function. *Neuroendocrinol.* **38**, 254-260.
- Köhrle J. 1990. Thyrotropin (TSH) action on thyroid hormone deiodination and secretion: one aspect of thyrotropin regulation of thyroid cell biology. *Horm. Metab. Res.* **23**(Suplemento), 18-28.
- Köhrle J. 1996. Thyroid hormone deiodinases: selenoenzyme family acting as gate keepers to thyroid hormone action. *Acta Med. Austriaca* **23**, 17-30.
- Köhrle J. 1999. Local activation and inactivation of thyroid hormones: the deiodinase family. *Mol. Cell Endocrinol.* **151**, 103-119.
- Köhrle J y Hesch RD. 1984. Biochemical characteristics of iodothyronine monodeiodination by rat liver microsomes: the interaction between iodothyronine substrate analogues and the ligand binding site of iodothyronine deiodinase resembles that of the TBPA-iodothyronine ligand binding site. *Horm. Metab. Res.* **14** (Suplemento), 42-45.
- Köhrle J, Hesch RD y Leonard JL. 1991. Intracellular pathways of iodothyronine metabolism. En: Braverman LE, Utiger RD (Eds.), Warner and Ingbar's *The Thyroid: A Fundamental and Clinical Text*. (pp. 143-189). Philadelphia: Lippincott-Raven.
- Köhrle J, Oertel M, Hoang-Vu, Schnieders F y Brabant G. 1993. Type I 5'-deiodinase: a marker for differentiated thyroid carcinoma? *Exp. Clin. Endocrinol.* **101** (Suplemento 3), 60-72.
- Köhrle J, Schomburg L, Drescher S, Fekete E y Bauer K. 1995. Rapid stimulation of type I 5'-deiodinase in rat pituitaries by 3,3',5-triiodo-L-thyronine. *Mol. Cell Endocrinol.* **108**, 17-21.
- Köhrle J, Jakobs TC y Schumtzler C. 1997. Genetics of iodothyronine deiodinase enzymes. *Thyroid* **7**, 687-687 (resumen).
- Kühn ER, Mol KA y Darras VM. 1993. Control strategies of thyroid hormone monodeiodination in vertebrates. *Zoological Sci. (Tokyo)* **10**, 6, 873-885.

- Krenning EP y Docter R. 1986. Plasma membrane transport of thyroid hormone. En: Hennemann G (Ed.), *Thyroid Hormone Metabolism*. (pp. 107-31). New York: Marcel Dekker Inc.
- Lagler K, Bardach JE, Miller RR y Passino M. 1977. *Ichthyology*. (pp. 343-344). New York: John Wiley & Sons.
- Lanni A, Moreno M, Lombardi A y Goglia F. 1996. Calorigenic effect of diiodothyronines in the rat. *J. Physiol.* **494**, 831-837.
- Larsen PR, Davies TF y Hay LD. 1998. The thyroid gland. En: Wilson JD, Foster DW, Kronenberg HM y Larsen PR (Eds.), *Williams Textbook of Endocrinology*. (pp. 389-516). Philadelphia: W.B. Saunders Co.
- Leatherland JF. 1988. Endocrine factors affecting thyroid economy of teleost fish. *Amer. Zool.* **28**, 319-328.
- Leatherland JF, Reddy PK, Yong AN, Leatherland A y Lam TJ. 1990. Hepatic 5'-monodeiodinase activity in teleosts *in vitro*: a survey of thirty-three species. *Fish physiol. Biochem.* **8**, 1-10.
- Leonard JL. 1991. Identification and structure analysis of iodothyronine deiodinases. En: Dreer M (Ed.), *The Thyroid Gland* (pp.285). New York: Raven Press.
- Leonard JL y Farwell AP. 1997. Thyroid hormone-regulated actin polymerization in brain. *Thyroid* **7**, 147-151.
- Leonard JL y Köhrle J. 1996. Intracellular pathways of iodothyronine metabolism. En: Baverman LE, Utiger RD (Eds.), Warner and Ingbar's *The thyroid: A Fundamental and Clinical Text*. (pp. 125-161). Philadelphia: Lippincott-Raven.
- Leonard DM y Leonard JM. 1996. Characterization of the subunit structure of type I iodothyronine deiodinase. Program of the 69<sup>th</sup> Meeting of the American Thyroid Association, San Diego, CA, Resumen # 64.
- Leonard JL y Rosenberg IN. 1980. Iodothyronine 5'-deiodinase from rat kidney: Substrate specificity and the 5'-deiodination of reverse triiodothyronine. *Endocrinology* **107**, 1376-1383.
- Leonard JL y Visser TJ. 1984. Selective modification of the active center of renal iodothyronine 5'-deiodinase by iodoacetate. *Biochem. Biophys. Acta* **787**, 122-130.
- Leonard JL y Visser TJ. 1986. Biochemistry of deiodination. En: Hennemann (Ed.), *Thyroid Metabolism*. (pp. 189-229). Al New York: Marcel Dekker.
- Low S y Berry M. 1996. Knowing when not to stop: selenocysteine incorporation in eukaryotes. *TIBS* **21**, 203-208.
- MacKenzie DS. 1982. Stimulation of the thyroid gland of the teleost fish, *Gillichthys mirabilis*, by tetrapod pituitary glycoprotein hormones. *Comp. Biochem. Physiol.* **72A**, 477-482.
- MacLatchy DL y Eales JG. 1992. Properties of T<sub>4</sub> 5'-deiodinating systems in various tissues of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **86**, 313-322.
- MacLatchy DL y Eales JG. 1993. Effect of T<sub>3</sub> or T<sub>4</sub> challenge on inner- and outer-ring deiodination of T<sub>3</sub> and T<sub>4</sub> in the liver, kidney and gill of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *J. Exp. Zool.* **265**, 637-645.

- Maia AL, Berry MJ, Saberg R, Herney JW y Larsen PR. 1995. Structural and functional differences in the dio 1 gene mice with inherited type I deiodinase deficiency. *Mol. End.* **9**, 969-980.
- Mandel SJ, Berry MJ, Kieffer JD, Harney JW, Warne RL y Larsen PR. 1992. Cloning and in vitro expression of the human selenoprotein, type I iodothyronine deiodinase. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **75**, 1133-1139.
- Manley JL. 1988. Polyadenylation of mRNA precursors. *B.B. Acta* **950**, 1-12.
- Matty AJ. 1985. The Thyroid Gland. En: *Fish Endocrinology*, (pp. 54-83). Australia: Crom Helm.
- McCann UD, Shaw EA y Kaplan MM. 1984. Iodothyronine deiodination reaction types in several rat tissues: Effects of age, thyroid status, and glucocorticoid treatment. *Endocrinol.* **114**, 1513-1521.
- McNabb FM. 1992. *Thyroid Hormones*. New Jersey: Prentice Hall.
- Milne RS y Leatherland JF. 1980a. Studies on the relationship between osmotic or ionic regulation and thyroid gland activity in two salmonids fishes, *Salmo gairdneri*. (Richardson) and *Oncorhynchus kisutch* Walbaum. *J. Fish Biol.* **16**, 349-360.
- Milne RS y Leatherland JF. 1980b. Changes in plasma thyroid hormone following administration of exogenous pituitary hormones and steroid hormones to rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Comp. Biochem. Physiol.* **66A**, 679-686.
- Miyashita K, Murakami M, Iriuchijama T, Takeuchi T y Mori M. 1995. Regulation of rat liver type I iodothyronine deiodinase mRNA levels by testosterone. *Mol. Cell Endocrinol.* **115**, 161-167.
- Mol K. 1996. A study on peripheral deiodination of thyroid hormones in fish. Tesis doctoral. Universidad de Leuven.
- Mol JA y Visser TJ. 1985. Synthesis and some properties of sulfate esters and sulfamates of iodothyronines. *Endocrinol.* **117**, 1-7.
- Mol JA, Docter R, Kaptein E, Jansen G, Hennemann G y Visser TJ. 1984. Inactivation and affinity-labeling of rat liver iodothyronine deiodinase with N-bromoacetyl-3,3',5-triiodothyronine. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **124**, 475-483.
- Mol JA, Kaptein E, Darras VM, de Greef, Kühn ER y Visser TJ. 1993. Different thyroid hormone-deiodinating enzymes in tilapia (*Oreochromis niloticus*) liver and kidney. *FEBS Lett.* **321**, 140-144.
- Moreno M, Berry MJ, Horst C, Thoma R, Goglia F, Harney JW, Larsen PR y Visser TJ. 1994. Activation and inactivation of thyroid hormone by type I iodothyronine deiodinase. *FEBS Lett.* **344**, 143-146.
- Moreno M, Lombardi A, Lombardi P, Goglia F y Lani A. 1998. Effect of 3,5-diiodo-L-thyronine on thyroid stimulating hormone and growth hormone serum levels in hypothyroid rats. *Life Sci.* **26**, 2369-2377.
- Morin PP, Hara TJ y Eales JG. 1993. Thyroid hormone deiodination in brain, liver, gill, heart and muscle of Atlantic salmon (*Salmo salar*) during photoperiodically-induced parr smolt transformation. Outer and Inner-ring thyroxine deiodination. *Gen. Comp. Endocrinol.* **85**, 376-384.

- Murphy D, Pardy K, Seah V y Carter D. 1992. Posttranscriptional regulation of rat growth hormone gene expression: increased message stability and nuclear polyadenylation accompany thyroid hormone depletion. *Mol. Cell Endocrinol.* **12**, 2624-2632.
- Navarro L, Landa A, Valverde R-C y Aceves C. 1997. Mammary gland type I iodothyronine deiodinase is encoded by a short messenger ribonucleic acid. *Endocrinol.* **138**, 4248-4254.
- Naumann A, Naumann J, Witeska A y Dutkiewicz M. 1993. 5'-Deiodinase type I in human kidney cancer. *J. Endocrinol. Invest.* **16** (Suplemento 2), 76 (Resumen).
- O'Mara BA, Dittrich W, Lauterio TJ y St Germain DL. 1993. Pretranslational regulation of type I 5'-deiodinase by thyroid hormones and in fasted and diabetic rats. *Endocrinol.* **133**, 1715-1723.
- Orozco A. 1997. Actividad 5'desiodasa hepática en dos especies de teleósteos eurihalinos: la trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) y el *Fundulus heteroclitus*. Caracterización cinética y efecto de la salinidad. Tesis doctoral. UNAM.
- Orozco A, Silva EJ y Valverde-RC. 1997. Rainbow trout liver expresses two iodothyronine phenolic ring deiodinase pathways with the characteristics of mammalian types I and II 5'-deiodinases. *Endocrinol.* **138**, 254-258.
- Orozco A y Valverde-R C. 1997. Environmental salinity selectively modifies the outer-ring deiodinating activity in the rainbow trout liver and kidney. 70<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Thyroid Association (233). Colorado Springs, Colorado, USA, del 15 al 19 de Octubre de 1997.
- Orozco A, Linser PJ, y Valverde-RC. 1998. Salinity modifies hepatic outer ring deiodinating (ORD) activity in *Fundulus heteroclitus*. En: *Annals of the New York Academy of Sciences y Trends in Comp. Endocrin. Neurobiol.* 409-411.
- Orozco A, Jeziorski MC, Greenberg RM, Linser PJ y Valverde-RC. 1999. Cloning of the gene and complete cDNA encoding a type II deiodinase in *Fundulus heteroclitus*. 72<sup>nd</sup> Annual Meeting of the American Thyroid Association (168). Palm Beach, FL, USA.
- Orozco A, Linser PJ y Valverde-R C. 2000. Kinetic characterization of outer-ring deiodinase activity (ORD) in the liver, gill and retina of killifish *Fundulus heteroclitus*. *Comp. Biochem. Physiol.* **126**, 283-290.
- Osborn RH y Simpson TH. 1969. Thyroxine metabolism in plaice (*Pleuronectes platessa* L.). *Gen. Comp. Endocrinol.* **13**, 524.
- Parry JE, Zhang C y Eales JG. 1994. Urinary excretion of thyroid hormones in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **95**, 310-319.
- Pekary AE, Berg L, Santini F, Chopra I y Hershman JM. 1994. Cytokines modulate type I iodothyronine deiodinase mRNA levels and enzyme activity in FRTL-5 rat thyroid cells. *Mol. Cell Endocrinol.* **101**, R31-R35.
- Peter RE. 1970. Comparison of activity of the pronephric thyroid and the pharyngeal thyroid of the goldfish *Carassius auratus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **15**, 88-94.
- Peter RE y McKeown BA. 1975. Hypothalamic control of prolactin and thyrotropin secretion in teleosts, with special reference to recent studies on the goldfish. *Gen. Comp. Endocrinol.* **25**, 153-165.

- Pimlott NJ y Eales JG. 1983. *In vitro* study of hepatic iodothyronine deiodination in rainbow trout. *Salmo gairdneri*. *Can. J. Zool.* **61**, 547-552.
- Pontecorvi A y Robbins J. 1986. Energy dependent uptake of 3,5,3'-triiodo-L-thyronine in rat skeletal muscle. *Endocrinol.* **119**, 2755-2761.
- Refetoff S, Robin NI y Fang NS. 1970. Parameters of thyroid function in serum of 16 selected vertebrates species: A study of PBI, serum T<sub>4</sub>, free T<sub>4</sub> and the pattern of T<sub>4</sub> and T<sub>3</sub> binding to serum proteins. *Endocrinol.* **86**, 793-805.
- Refetoff S. 1979. Thyroid hormone transport. En: DeGroot LJ, Cahill GF, Odell WD, Martini L, Potts JT, Nelson HD, Steinberg E y Winegrad AL. (Eds.), *Endocrinology Vol I*. (pp.347-357). USA: Grune & Stratton.
- Riley WW y Eales JG. 1993. Characterization of L-thyroxine transport into hepatocytes isolated from juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Gen. Comp. Endocrinol.* **90**, 31-42.
- Riley WW y Eales JG. 1994. Characterization of 3,5,3'-triiodo-L-thyronine transport into hepatocytes isolated from juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and comparison with L-thyroxine transport. *Gen. Comp. Endocrinol.* **95**, 301-309.
- Robbins J. 1991. Thyroid hormone transport proteins and the physiology of hormone binding. En: Braverman LE & Utiger RD (Eds.), *The thyroid: A Fundamental and Clinical Text*. (pp. 96 - 109). New York: Lippincott-Raven.
- Robbins J y Bartalena L. 1986. Plasma transport of thyroid hormones. En: Hennemann G. (Ed.), *Thyroid hormone metabolism*. (pp. 3-38). New York: Marcel Dekker, Inc.
- Robbins J, Cheng S, Gershengorn MC, Glinoe D, Cahnmann HJ y Heldoch H. 1978. Thyroxine transport proteins of plasma. Molecular properties and biosynthesis. *Reg. Prog. Horm. Res.* **34**, 477-519.
- Salvatore D, Low SC, Berry M, Maia AL, Harney JW, Croteau W, St. Germain DL y Larsen PR. 1995. Type 3 iodothyronine deiodinase: cloning, in vitro expression, and functional analysis of the placental selenoenzyme. *J. Clin. Invest.* **96**, 2421-2430.
- Sanders JP, Van der Geyten S, Kaptein E, Darras VM, Kühn ER, Leonard JL y Visser TJ. 1997. Characterization of a propylthiouracil-insensitive type I iodothyronine deiodinase. *Endocrinol.* **138**, 5153-5160.
- Sanders JP, Van der Geyten S, Kaptein E, Darras VM, Kühn ER, Leonard JL y Visser TJ. 1999. Cloning and characterization of type III iodothyronine deiodinase from the fish *Oreochromis niloticus*. *Endocrinol.* **140**, 3666-3673.
- Sawada K, Hummel BCW y Walfish PG. 1986. Intermediate Mr cytosolic components potentiate hepatic 5' deiodinase activation by thiols. *Biochem. J.* **238**, 787-791.
- Schmutzler C, Jakobs TC, Dreher I, Glaser F y Köhrle J. 1998b. Regulation of type I 5'-deiodinase (5'DI) by proinflammatory cytokines in the human hepatocarcinoma cell line HepG2. *J. Endocrinol. Invest.* **21**, 2-2 (Resumen).
- Schoenmaker CHH, Pigmans IGAJ, Hawkins HC, Freedman RB y Visser TJ. 1989. Iodothyronine deiodinase is not identical to protein disulfide isomerase. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **162**, 857-868.
- Schoenmaker CHH, Pigmans IGAJ y Visser TJ. 1992. Species differences in liver type I iodothyronine deiodinase. *B B Acta* **1121**, 160-166.

- Schreck R, Schnieders F, Schmutzler C y Köhrle J. 1994. Retinoids stimulate type I iodothyronine 5'-deiodinase activity in human follicular thyroid carcinoma cell lines. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **79**, 791-798.
- Shields CA y Eales JE. 1986. Thyroxine 5'-monodeiodinase activity in hepatocytes of rainbow trout, *Salmo gairdneri*: distribution, effects of starvation and exogenous inhibitors. *Gen. Comp. Endocrinol.* **63**, 334-343.
- Sinclair DAR y Eales JG. 1972. Iodothyronine-glucuronide conjugates in the bile of brook trout, *Salvelinus fontinalis* (Mitchill) and other freshwater teleosts. *Gen. Comp. Endocrinol.* **19**, 552-559.
- Sower SA y Schreck EB. 1982. Steroid and thyroid hormones during sexual maturation of coho salmon *Oncorhynchus kisutch* in seawater or freshwater. *Gen. Comp. Endocrinol.* **47**, 42-53.
- Sower SA, Sullivan CV y Gorbman A. 1984. Changes in plasma estradiol and effects of T3 on plasma estradiol during smoltification of coho salmon *Oncorhynchus kisutch*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **54**, 486-492.
- St Germain DL, Dittrich W, Morganelli CM y Cryns V. 1990. Molecular cloning by hybrid arrest of translation in *Xenopus laevis* oocytes. *J. Biol. Chem.* **262**, 20087-20090.
- St Germain DL. 1994. Iodothyronine deiodinases. *Trends Endocrinol. Metab.* **5**, 36-42.
- St Germain DL, Schwartzman RA, Croteau W, Kanamori A, Wang Z, Brown DD y Galton VA. 1994. A thyroid hormone-regulated gene in *Xenopus laevis* encodes type III iodothyronine 5-deiodinase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91**, 7767-7771.
- Sun BC, Hamey JW, Marla JB y Larsen PR. 1997. The role of the active site cysteine in catalysis by type I iodothyronine deiodinase. *Endocrinol.* **138**, 5452-5458.
- Swanson P, Grau EG, Helms LM y Dichoff WW. 1988. Thyrotropic activity of salmon pituitary glycoprotein hormones in the Hawaiian parrotfish thyroid *in vitro*. *J. Exp. Zool.* **245**, 194-199.
- Sweeting RM y Eales JG. 1992a. The acute influence of ingested thyroid hormones on hepatic deiodination pathways in the rainbow trout, (*Oncorhynchus mykiss*). *Gen. Comp. Endocrinol.* **81**, 207-216.
- Sweeting RM y Eales JG. 1992b. Thyroxine 5'-monodeiodinase activity in microsomes from isolated hepatocytes of rainbow trout: Effect of growth hormone and 3,5,3'-triiodothyronine. *Gen. Comp. Endocrinol.* **88**, 169-177.
- Tang KT, Braverman LE y DeVito WJ. 1995. Tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma modulate gene expression of type I 5'-deiodinase, Thyroid peroxidase, and thyroglobulin in FRTL-5 rat thyroid cells. *Endocrinol.* **136**, 881-888.
- Tata JR. 1980. The action of growth and development hormones. *Biol. Rev.* **55**, 285-319.
- Toyoda H, Himeno S e Imura N. 1990a. Regulation of glutathione peroxidase mRNA level by dietary selenium manipulation. *B. B. Acta.* **1049**, 213-215.
- Toyoda N, Nishikawa M, Horimoto M, Yoshikawa N, Mori Y, Yoshimura M, Masaki H, Tanaka K e Inada M. 1990b. Sinergistic effect of thyroid hormone and thyrotropin on iodothyronine 5'-deiodinase in FRTL-5 rat thyroid cells. *Endocrinol.* **127**, 1199-1205.

- Toyoda N, Nishikawa M, Mori Y, Gondou A, Ogawa Y, Yonemoto T, Yoshimura M, Masaki H e Inada M. 1992. Thyrotropin and triiodothyronine regulate 5'-deiodinase messenger ribonucleic acid levels in FRTL-5 rat thyroid cells. *Endocrinol.* **131**, 389-394.
- Toyoda N, Harney JW, Berry MJ y Larsen PR. 1994. Identification of critical amino acids for 3,5,3'-triiodothyronine deiodination by human type I deiodinase based on comparative functional-structural analyses of the human dog and rat enzymes. *J. Biol. Chem.* **32**:20329-20334.
- Toyoda N, Zavacki A M, Maia AL, Harney JW y Larsen PR. 1995a. A novel retinoid X receptor-independent thyroid hormone response element is present in the human type I deiodinase gen. *Mol. Cell. Biol.* **15**:5100-5112.
- Toyoda N, Harney JW, Berry MJ y Larsen PR. 1995b. Identification of critical amino acids for 3,3',5'-triiodothyronine deiodination by human type deiodinase based on comparative functional-structural analyses of the human, dog and rat enzymes. *J. Biol. Chem.* **269**, 20329-20334.
- Toyoda N, Berry MJ, Harney JW y Larsen PR. 1995c. Topological analysis of the integral membrane protein type I Iodothyronine deiodinase. *J. Biol. Chem.* **270**, 12310-12318.
- Toyoda N, Kleinhaus N y Larsen PR. 1996. The structure of the coding region and 5'-flanking region of the type 1 iodothyronine deiodinase (*dio 1*) gene is normal in a patient suspected congenital *dio 1* deficiency. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **81**, 2121-2124.
- Toyoda N, Kaptein E, Berry MJ, Harney JW, Larsen PR y Visser TJ. 1997. Structure activity relationships for thyroid hormone deiodination by mammalian type I iodothyronine deiodinase. *Endocrinol.* **138**, 213-219.
- Valverde-RC y Aceves C. 1989. Circulating thyronines and peripheral monodeiodination in lactating rats. *Endocrinol.* **124**, 1340-1344.
- Valverde-RC, Croteau W, Lafleur GL, Orozco A y St Germain DL. 1997. Cloning and expression of a 5'-iodothyronine deiodinase from the liver of *Fundulus heteroclitus*. *Endocrinol.* **138**, 642-648.
- Valverde RC, Orozco RA, Aceves C y Romero RC. 1998. Control y regulación de la función tiroidea. En: Soc. Mex. C. Fisiol. (Ed.), *Texto de Fisiología México*:PRONFOPAB-SEP.
- Van der Geyten S, Sanders JP, Kaptein E, Darras VM, Kühn ER, Leonard JL y Visser TJ. 1997. Expression of chicken hepatic type I and type III iodothyronine deiodinases during embryonic development. *Endocrinol.* **138**, 5144-5152.
- Vijayan MM, Flett PA y Leatherland JF. 1988. Effect of cortisol on the *in vitro* hepatic conversion of thyroxine to triiodothyronine in brook trout charr (*Salvelinus fontinalis*) Mitchell. *Gen. Comp. Endocrinol.* **70**, 312-318.
- Visser TJ. 1979. Mechanism of action of iodothyronine 5'-deiodinase. *Biochem. Biophys. Acta.* **569**, 302-308.
- Visser TJ, Van der Does-Tobe I, Docter R y Hennemann G. 1976. Subcellular localization in rat liver of an enzyme converting T4 to T3 and possible involvement of essential thiol groups. *Biochem. J.* **157**, 479-482.
- Visser TJ, Fekkes D, Docter R y Hennemann G. 1978. Sequential deiodination of thyroxine in rat liver homogenates. *Biochem. J.* **174**, 221-229.



- Visser TJ, Fekkes D, Docter R y Hennemann G. 1979. Kinetics of enzymatic reductive deiodination of iodothyronines. *Biochem. J.* **179**, 489.
- Visser TJ, Leonard JL, Kaplan MM y Larsen PR. 1982. Kinetic evidences suggesting two mechanisms for iodothyronine 5'-deiodination in the rat cerebral cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 5080.
- Visser TJ, Kaplan MM, Leonard JL y Larsen PR. 1983. Evidence for two pathways of iodothyronine 5'-deiodination in rat pituitary that differ in kinetic propylthiouracil sensitivity, and response to hypothyroidism. *J. Clin. Invest.* **71**, 992-1002.
- Visser TJ, Kaptein E, Terpstra OT y Krenning EP. 1988. Deiodination of thyroid hormone by human liver. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **67**, 17-24.
- Visser TJ, van Buren JCJ, Rutgers M, Eelkman Rooda SJ y de Haerder WW. 1991. The role of sulfatation in the thyroid hormone metabolism. *Trends Endocrinol. Metab.* **1**, 211.
- Wahle E y Keller W. 1992. The biochemistry of 3'-end cleavage and polyadenylation of messenger RNA precursors. *Ann. Rev. Biochem.* **61**, 419-440.
- Weinberg C, Thompson CC, Ong ES, Lebo R, Groul DJ y Evans RM. 1986. The *c-erb-A* gene encode a thyroid hormone receptor. *Nature* **324**, 641-646.
- Winzer R, Schmutzler C, Jakobs TC, Ebert R, Rendl J, Reiners C y Köhrle. 1998. RT-PCR analysis of thyrocyte-relevant genes in fine-needle aspiration biopsies of the human thyroid. *Thyroid* **8**, 981-987.
- Yamano K e Inui Y. 1995. cDNA cloning of thyroid hormone receptor for the japanese flounder. *Gen. Comp. Endocrinol.* **99**, 197-203.
- Zhang CY, Kim S, Harney JW y Larsen PR. 1998. Further characterization of thyroid hormone response elements in the human type I iodothyronine deiodinase gene. *Endocrinol.* **139**, 1156-1163.