



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE DOCTORADO EN
CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGIA

***CARACTERIZACIÓN CINÉTICA Y MOLECULAR DE LA(S)
DESYODASA(S) DE YODOTIRONINAS EN EL HÍGADO DEL
TIBURÓN CHILOSCYLLIUM PUNCTATUM***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA

M. EN. C. LIDIA MAYORGA MARTÍNEZ

TUTOR:

DR. CARLOS VALVERDE RODRÍGUEZ

COMITÉ TUTORAL:

DR. ABRAHAM LANDA PIEDRA

DR. ALFREDO VARELA ECHAVARRIA

CampusJuriquilla, Querétaro Junio 2009



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

Instituto de Neurobiología

Los miembros del jurado para examen de grado certificamos que la tesis elaborada por: Lidia Mayorga Martínez, cuyo título es: "Caracterización cinética y molecular de la(s) desyodasas de yodotironinas en el hígado del tiburón *Chiloscyllium punctatum*" se presenta como uno de los requisitos para obtener el grado de Doctora en Ciencias y cumple con los criterios de originalidad y calidad requeridos por la División de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Firma

Presidente

Dr. Jean Louis Charli Casalonga

Secretario (Tutor)

Dr. Carlos Valverde Rodríguez

Vocal

Dra. Verónica Guarner Lans

Vocal

Dra. María de la Luz Navarro Angulo

Vocal

Dra. Rocio Brenda Anguiano Serrano

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Carlos Valverde, GRACIAS por compartir su sabiduría. Por creer en mi y apoyarme desde que lo conocí. Por su gran paciencia, entusiasmo y empuje para el desarrollo y culminación de este trabajo.

A la Dra. Aurea Orozco por permitirme ser parte de tu grupo de trabajo, gracias Aurea por tu ayuda en todo momento, eres un ejemplo de disciplina en el trabajo.

A Paty Villalobos, porque en todo este tiempo me apoyaste, sacaste de dudas y guiaste en el laboratorio, gracias por tu amistad.

Al Dr. Abraham Landa y Dr. Alfredo Varela, miembros de mi comité tutorial que me acompañaron en mi formación durante varios semestres y alentaron en todo momento para hacer del proyecto lo mejor.

A los miembros del jurado de examen de grado: Dra. Brenda Anguiano, Dra. Luz Navarro, Dra. Verónica Guarnier y Dr. Jean Louis Charli agradezco su disposición para revisar mi tesis y sus valiosos comentarios para mejorarla.

A Carlota, Juan Carlos, Mony, Lucia, Miguel Angel, Angeles por su amistad y compañía durante este tiempo.

A las personas que me apoyaron para la realización de este trabajo:

A la Dra. Anaid Antaramian de la Unidad de Proteogenómica.

A Rafael Silva de la Biblioteca.

A Omar González de Cómputo.

A Lourdes Lara de Videoconferencia.

A Leonor Casanova de la Unidad de Posgrado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

Becario No: 142421.

A la Dirección General de Estudios de Posgrado de la UNAM

Becario No. 504013616.

INDICE

INDICE	i
INDICE DE FIGURAS	iv
INDICE DE TABLAS	v
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
ANTECEDENTES	5
1. EVOLUCIÓN DE LA FUNCION TIROIDEA	5
<u>1.1 Yodo: Metabolismo y Manejo del Halógeno por los Sistemas Vivos</u>	5
<u>1.2 Evolución de la Glándula Tiroides</u>	6
1.2.1. Urocordados	7
1.2.2. Cefalocordados	8
1.2.3. Craneados	9
2. LA FUNCIÓN TIROIDEA EN VERTEBRADOS	11
<u>2.1 Eje Hipotálamo-Hipófisis-Tiroides. Visión de Conjunto</u>	11
2.1.1. Tiroliberina o TRH	13
2.1.2. Hormona Estimulante de la Tiroides (TSH) o Tirotropina	13
<u>2.2 La Glándula Tiroides</u>	14
<u>2.3 Biosíntesis de las Hormonas Tiroideas (TH)</u>	16
2.3.1 Estructura Química	16
2.3.2 Transporte	18
2.3.3 Ingreso de las TH a sus Células Blanco	19
2.3.4 Mecanismos de Acción	20
2.3.5 Efectos fisiológicos de las TH	23
2.3.6 Metabolismo de las TH	24
3. DESYODACIÓN	26
<u>3.1 Desyodasas. Visión de conjunto</u>	28
3.1.1 Estructura	28
3.1.2 Localización Subcelular	29
3.1.3 Síntesis de Selenoproteínas	31

3.1.4 Bioquímica de la desyodación	34
<u>3.2 Desyodasa tipo 1</u>	35
3.2.1 Características Cinéticas/Bioquímicas	36
3.2.2 Características Moleculares	38
3.2.3 Regulación	39
<u>3.3 Desyodasa tipo 2</u>	40
3.3.1 Características Cinéticas/Bioquímicas	41
3.3.2 Características Moleculares	41
3.3.3 Regulación	43
<u>3.4 Desyodasa tipo 3</u>	44
3.4.1 Características Cinéticas/Bioquímicas	45
3.4.2 Características Moleculares	46
3.4.3 Regulación	47
<u>3.5. Filogenia de las Desyodasas</u>	48
4. LA DESYODACIÓN EN PECES	50
4.1 Agnatos	50
4.2 Óseos	52
4.3 Cartilaginosos	53
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	55
HIPÓTESIS	55
OBJETIVOS	55
MATERIAL Y MÉTODOS	56
Animales	56
Reactivos	56
Preparación de microsomas	56
Determinación de la actividad desyodativa ORD (D1 y D2)	57
Determinación de la actividad desyodativa IRD	57
Caracterización cinética	58
Clonación del cDNA y Análisis de la Secuencia	59

Extracción de RNA total	59
Síntesis de cDNA (RT) y PCR	59
Amplificación de los extremos 3' y 5' del cDNA (3' y 5' RACE)	60
Amplificación de la secuencia de cDNA completa	61
Análisis de las secuencias	62
Expresión de la proteína recombinante (D3)	62
Construcción de una quimera de D2 con SECIS de <i>Fundulus</i>	62
RESULTADOS	64
1. Caracterización cinética	64
1.1 Vía ORD	64
1.2 Vía IRD	69
2. Caracterización molecular	72
2.1 Clonación y caracterización de la(s) Desyodasas de la vía ORD	72
2.2 Clonación y caracterización de la D3 de la vía IRD	78
2.3 Caracterización de la D3 recombinante	83
DISCUSIÓN	85
CONCLUSIONES	93
PERSPECTIVAS	93
BIBLIOGRAFIA	94
ANEXOS	116
1 Condrictios	116
Diseño básico, Diversidad, Habitats, Reproducción	
2 <i>Chiloscyllium punctatum</i>	119
3 Producción	120
Mayorga M.L., Orozco A., Villalobos P. y Valverde-R.C. 2008 Cloning and characterization of a type 3 iodothyronine deiodinase (D3) in the liver of the chondrichthyan <i>Chiloscyllium punctatum</i> . Gen. Comp. Endocrinol. 156: 464-469.	

INDICE DE FIGURAS

1	Aspectos filogenéticos de la función tiroidea en los cordados	7
2	Evolución de la glándula tiroides	10
3	El Eje Hipotálamo-Hipófisis-Tiroides en Mamíferos	12
4	Distribución del tejido tiroideo y su organización en la glándula tiroides en diferentes vertebrados	15
5	Síntesis, almacenamiento y secreción de hormonas tiroideas	17
6	Estructura de las hormonas tiroideas.	18
7	Acción nuclear de las hormonas tiroideas	21
8	Vías metabólicas alternas del metabolismo de hormonas tiroideas	25
9	Vías Desyodativas	26
10	Estructura general del RNAm de selenoproteínas	32
11	Síntesis de selenoproteínas	33
12	Mecanismo catalítico propuesto para la D1 y su inhibición por PTU, IAC y GTG	37
13	Filogenia de las desyodasas de yodotironinas de vertebrados	49
14	Amplificación de los extremos del DNA complementario mediante 3' y 5' RACE	61
15	Construcción de una quimera entre el cDNA de un fragmento que incluye el marco de lectura abierto de la D2 de tiburón y un fragmento que contiene el elemento SECIS indispensable para la incorporación de Sec, de <i>Fundulus heteroclitus</i>	63
16	Efecto de la concentración de proteína en la actividad D1, D2 y D3	65
17	Actividad ORD de ¹²⁵ I rT ₃ . Análisis de Eadie-Hofstee	66
18	Cinética de la actividad ORD de ¹²⁵ I rT ₃ en función de la concentración de sustrato	67
19	Actividad ORD de ¹²⁵ I rT ₃ Mecanismo de reacción	68
20	Cinética de la actividad ORD de ¹²⁵ I-T ₄ en función de la concentración de sustrato	69
21	Actividad ORD de ¹²⁵ I T ₄ Mecanismo de reacción	70
22	Efecto de las hormonas T ₄ , rT ₃ y T ₃ en la actividad desyodativa T ₄ -ORD	70
23	Cinética de actividad T ₃ -IRD y mecanismo de reacción	71
24	A) Efecto de PTU en la actividad desyodativa T ₃ -IRD. B) Efecto de las hormonas T ₄ , rT ₃ y T ₃ en la actividad desyodativa T ₃ -IRD	71

25	D2 de <i>Ch. Punctatum</i> . .Fragmento Inicial (nucleótidos y aminoácidos deducida)	74
26	Secuencia de nucleótidos completa del fragmento de cDNA obtenido después de analizar el conjunto de los resultados de los 3' y 5' rce	76
27	Secuencia de nucleótidos y de aminoácidos deducida del fragmento de cDNA que codifica para la D2 en el hígado de <i>Ch.punctatum</i>	77
28	D3 de <i>Ch. Punctatum</i> . Secuencia (nucleótidos y aminoácidos) del fragmento Inicial	78
29	Secuencia (nucleótidos y aminoácidos) de la D3 del tiburón <i>Ch. punctatum</i>	80
30	Elemento SECIS de la D3 de <i>Ch. punctatum</i>	81
31	Patrón de hidrofobicidad de la D3 de <i>Ch. punctatum</i>	81
32	Comparación de la secuencia de aminoácidos de la D3 de <i>Ch.punctatum</i> con las reportadas para otras especies de vertebrados	82
33	Caracterización cinética de la D3 de <i>Ch. punctatum</i> recombinante	84

INDICE DE TABLAS

1	Características de las desyodasas de yodotironinas	35
2	Condiciones optimas de ensayo para la actividad D1, D2 y D3	65
3	Secuencia de los oligonucleótidos empleados para la clonación de los cDNA's que codifican para la D2 y la D3 del tiburón <i>Ch. punctatum</i>	73

RESUMEN

A nivel celular y en todos los vertebrados, la bioactividad de las hormonas tiroideas (TH) está finamente regulada por una familia de selenoproteínas llamadas desyodasas (Ds) de yodotironinas. Esta familia enzimática comprende tres isotipos: D1, D2 y D3, que difieren en sus propiedades cinéticas, moleculares y funcionales y catalizan dos rutas metabólicas diferentes pero complementarias. Dependiendo del anillo de la molécula de yodotironina del cual se remueve el átomo de yodo, estas vías metabólicas generan isómeros activos o inactivos de TH. La vía de desyodación del anillo externo (ORD) o de activación es catalizada por la D1 y la D2 y produce T_3 a partir de T_4 . Por otro lado, la vía de desyodación del anillo interno (IRD) o de inactivación es catalizada por la D1 y la D3 y produce los isómeros inactivos: rT_3 a partir de T_4 ; así como $3,3'$ - T_2 y $3',5'$ - T_2 a partir de T_3 y rT_3 respectivamente. Esta tesis reporta la caracterización operacional y molecular de las desyodasas presentes en el hígado del tiburón: *Chiloscyllium punctatum*. Los resultados muestran que a diferencia de otros vertebrados adultos el hígado de este condricio expresa las tres Ds. Para la vía rT_3 -ORD, la D1 mostró valores de K_m y V_{max} de 122 nM y 534.2 pmol ^{125}I /mg/h respectivamente; un mecanismo de reacción ping-pong, e insensibilidad a la inhibición por PTU (1 mM). En el caso de la vía T_4 -ORD, la D2 mostró una K_m de 1.1 nM y una V_{max} de 55 pmol ^{125}I /mg/h, siendo esta última una de las más altas reportadas en vertebrados e indicando una mayor abundancia relativa. El mecanismo de reacción de esta D2 fue de tipo secuencial, la enzima resultó insensible a la inhibición por PTU, y la preferencia por sustratos fue: $T_4 > rT_3 > T_3$. La D3 que cataliza la vía T_3 -IRD tiene una K_m de 2.7 nM, y una V_{max} de 1.02 pmol $3,3'$ - T_2 /mg/h y un mecanismo de reacción secuencial. Esta D3 es insensible a la inhibición por PTU y su preferencia por sustratos es $T_3 > T_4 > rT_3$. En cuanto a la caracterización molecular se clonaron los cDNA's que codifican para D2 y D3 mediante RT-PCR seguido de 3' y 5' RACE. Para la D2 se obtuvo un fragmento de 1100 pb. Este cDNA incluye el marco de lectura abierta con los codones de inicio y termino de la traducción, el triplete TGA que codifica para selenocisteína y una región 5'UTR de ~250 pb. La alineación de la secuencia de proteína deducida mostró un porcentaje de identidad del 68% con el resto de D2 de vertebrados, mientras que para D1 y D3 la identidad fue de 46 y 61% respectivamente. En cuanto a la D3 se clonó un fragmento de cDNA de 1298 nucleótidos que codifica una proteína deducida de 259 aminoácidos. El triplete TGA que codifica para selenocisteína está en la posición 123. La secuencia de inserción para selenocisteína (SECIS) se localiza 228 pb río arriba de la cola de poli(A) y corresponde a una forma 2. La secuencia de aa deducida mostró una identidad del 77 y 72% con otras D3 de peces y vertebrados, respectivamente. Se expresó la D3 recombinante en ovocitos de *X. leavis* mostrando características semejantes a la enzima nativa. La expresión de las tres Ds, en el hígado adulto de *Ch. punctatum* sugiere que este órgano juega un papel clave en la fisiología tiroidea, regulando las concentraciones de TH activas e inactivas. Al igual que en los teleosteos, los altos niveles de expresión de D2 hepática indican que dicho isotipo podría tener un papel clave en proveer T_3 a la circulación general. La expresión hepática de D3 en la vida adulta de este condricio pudiera estar asociada con la estrategia alimentaria de la especie que devora completamente a su presa e incluye tejido tiroideo, evitando la sobre-exposición a hormonas tiroideas exógenas y contribuyendo de esta manera a la homeostasis tiroidea.

ABSTRACT

Thyroid hormone (TH) bioactivity is finely regulated at the cellular level by a family of selenoproteins generically called iodothyronine deiodinases (Ds). This family of selenoenzymes is expressed in vertebrates and includes three distinct isotypes (D1, D2 and D3) with different kinetic, molecular, and functional properties. Depending of the ring of the molecule from which iodine atoms are removed, Ds catalyze two different but complementary metabolic routes that generate active or inactive iodothyronine isomers. The activating or outer-ring deiodinating (ORD) pathway is catalyzed by D1 and D2 and produces active iodothyronines by converting T_4 to T_3 . On the other hand, the inactivating or inner-ring deiodinating (IRD) pathway is catalyzed by D1 and D3 and produces the inactive isomers: rT_3 from T_4 , as well as $3,3\text{'-}T_2$ and $3\text{'},5\text{'-}T_2$ from T_3 and rT_3 respectively. This work shows the kinetic and molecular characterization of the hepatic deiodinases in the chondrichthye *Chiloscyllium punctatum*. The kinetic characterization using the preferential substrates and DTT as cofactor, revealed the expression of the three Ds. For D1 (rT_3) K_m and V_{max} values were 122 nM and 534.2 pmol ^{125}I /mg/h, respectively; a ping-pong type reaction mechanism, and was resistant to PTU (1 mM) inhibition. D2 K_m and V_{max} values for T_4 were 1.1 nM y 55 pmol ^{125}I /mg/h, respectively, this V_{max} value is higher than that of other vertebrates, indicating a high relative abundance; D2 presented a sequential type reaction mechanism; showed insensitivity to PTU (1 mM) inhibition and a preferential substrate of $T_4 > rT_3 > T_3$. The T_3 K_m and V_{max} values for D3 were 2.7 nM and 1.02 pmol $3,3\text{'-}T_2$ /mg/h, the reaction mechanism was sequential and the enzyme was insensitive to PTU (1 mM) inhibition; the preferential substrate was $T_3 > T_4 > rT_3$. By RT-PCR and 3' and 5' RACE, cDNAs encoding D2 and D3 were cloned. The D2 cDNA fragment was 1100 bp and includes a 5' UTR of ~250 pb. The fragment included the open reading frame (ORF) with the start and end triplets, as well as the TGA coding for selenocysteine. The predicted protein showed a 68% identity with the rest of vertebrate D2s, and an identity of 46 and 61% for D1 and D3, respectively. The D3 cDNA contained 1298 nucleotides and encodes a predicted protein of 259 amino acids. The triplet TGA coding for selenocysteine (Sec) is at position 123. The consensus selenocysteine insertion sequence (SECIS) was identified 228 bp upstream of the poly(A) tail and corresponds to a form 2. The deduced amino acid sequence was 77% and 72% identical to other D3 cDNAs in fishes and other vertebrates, respectively. The recombinant D3 was expressed in *X. leavis* oocytes and showed comparable catalytic activity to that of the native enzyme. The expression of the three Ds in the adult liver of *Ch. punctatum*, suggests that the liver plays an important role in thyroid physiology, regulating active and inactive TH concentrations. As in teleosts, the high levels of hepatic D2 expression shows that this enzyme could have an important role in T_3 production for the circulation. The hepatic D3 expression through adulthood may be associated with the alimentary strategy that includes the thyroid tissue in which the protection from the exogenous overload of the TH could be of physiological importance for thyroidal homeostasis.

INTRODUCCIÓN

Este trabajo se realizó en el laboratorio de fisiología evolutiva del INB bajo la tutoría del Dr. Carlos Valverde-R, cuya línea de investigación aborda, desde una perspectiva comparada, la fisiología de los sistemas tiroideos.

En muchas ocasiones y aduciendo que carecen de “novedad”, se menosprecian los estudios que, se afirma, “repiten” en algunas especies lo ya establecido en otras. A este respecto, es necesario enfatizar que la generación y ampliación del conocimiento nada tienen que ver con la simple repetición. La investigación de fenómenos ya estudiados o “viejos” en nuevas especies, brinda la oportunidad de entender diferencias y similitudes en el contexto de la evolución; y permite establecer relaciones filogenéticas entre los vertebrados y entre éstos y el resto de sistemas vivos. En efecto, complementados con las poderosas herramientas analíticas de la biología computacional, la genómica y la biología molecular, estos programas de investigación, han brindado nuevas respuestas a viejas preguntas. Este es el caso de la endocrinología comparada, cuyos modelos y conceptos han impactado profundamente en el desarrollo de la endocrinología misma; así como en la práctica clínica de la medicina humana y animal. Aunque son de sobra conocidas, es pertinente recordar algunas de estas contribuciones. El descubrimiento de las “neuronas glandulares” en la medula espinal de la mantaraya, dio lugar al concepto seminal de neurosecreción y al desarrollo de la neuroendocrinología (Scharrer., 1985, Sarnat., 1983). La primera demostración de la interacción hormona-DNA surgió del estudio de los cromosomas de la mosca y el efecto de la ecdisona (Ashburner., 1973). Igualmente, el hallazgo de que la calcitonina de peces es significativamente más potente que la de humanos ha permitido el tratamiento de alteraciones óseas incapacitantes como la enfermedad de Paget (Wallach y col., 1999, Norris, 1997). Los estudios fundamentales para comprender las bases biológicas de los ritmos circadianos, se han llevado a cabo en plantas, insectos y aves (Dawson y col., 2001, Yoshimura y col., 2003). Estos son solo algunos ejemplos de las repercusiones que la investigación comparada de la fisiología endocrina ha tenido en las ciencias biológicas.

Como ya se dijo, el trabajo de la presente tesis corresponde al área de la fisiología o función de los sistemas tiroideos. En todos los vertebrados, estos sistemas comprenden cuatro unidades o componentes funcionales principales. El clásico eje neuroendocrino hipotálamo-hipófisis-tiroides (HHT) y un cuarto eslabón o vía final común, en la que participa una familia ubicua de enzimas conocidas con el nombre genérico de desyodasas de yodotironinas (Ds) o ID (por sus siglas del inglés, *iodothyronine deiodination*). A través de esta vía se generan metabolitos inactivos o activos de TH que ejercen su función biológica al interactuar con los receptores nucleares de TH. Específicamente, la presente investigación se enfoca al estudio y caracterización bioquímica y molecular de la actividad desyodativa en el hígado del condrictio *Chiloscyllium punctatum*.

ANTECEDENTES

1. EVOLUCION DE LA FUNCION TIROIDEA

1.1. Yodo: Metabolismo y Manejo del Halógeno por los Sistemas Vivos

El yodo es uno de los elementos esenciales ultratraza más pesados que se metaboliza en los sistemas vivos y presenta propiedades antimicrobianas y antioxidantes. En los reinos animal y vegetal, diversos organismos poseen la capacidad de metabolizar yodo y otros halógenos naturales (fluoro, cloro y bromo), incorporándolos en una gran variedad de compuestos orgánicos. Actualmente se conocen más de 4,000 organohalógenos de origen biótico, cuya estructura química es tan diversa como el tipo de organismo que los produce. En efecto, todos estos halometabolitos se han identificado, extraído y purificado a partir de organismos que pertenecen a los tres dominios biológicos (para revisión véase: Gribble, 2003; Valverde-R y col., 2004).

En general, los mecanismos celulares involucrados en el metabolismo del yodo son los mejor estudiados pues se asocian con la captura, organificación y síntesis de hormonas tiroideas (TH, por sus siglas del inglés, *thyroid hormone*) y sus precursores en vertebrados y algunos invertebrados; o bien, con la síntesis de antibióticos y moléculas repelentes en plantas, bacterias y hongos. Siendo uno de los elementos naturales más escasos, no se sabe porque fue este y no otro halógeno el que se seleccionó para ser utilizado en la síntesis de las TH y otros yodometabolitos. Se ha sugerido que el yodo emergió como un sustrato para la síntesis de hormonas tiroideas en ecosistemas marinos ancestrales, donde la vegetación (algas marinas) de la superficie del océano, la cual concentra yodo, formó la base de la cadena alimenticia. El aporte adecuado del halógeno y/o sus metabolitos significó, inicialmente, una señal de suficiencia alimenticia y de condiciones propicias para el desarrollo y reproducción del organismo. Posteriormente, la capacidad en los metazoarios para sintetizar TH y otros yodometabolitos dio como resultado la regulación y diversificación funcional de los sistemas tiroideos propiamente dichos (Valverde-R y col. 2004; Yun y col., 2005; Heyland y Moroz., 2005).

En cuanto a las algas y otras plantas marinas, poco se sabe respecto a los mecanismos involucrados en la concentración del yodo; sin embargo, en estos organismos el halógeno forma parte de moléculas con actividad antibacteriana como la betadina (povidona yodada) que los protege de protozoarios y bacterias. Las algas marinas, particularmente las del orden *Laminariales*, acumulan yodo de manera activa y lo hacen en una proporción que es 30,000 veces mayor que la concentración del halógeno en el agua de mar. Alrededor del 14 % del contenido total de yodo en *Laminaria japonica* y del 38% en algunos sargazos, se encuentra organificado en el aminoácido tirosina formando monoyodotirosina (MIT) y diyodotirosina (DIT) (Küpper y col., 1998).

Diferentes artrópodos, anélidos, equinodermos (pepinos y galletas de mar) y moluscos, tienen la capacidad de sintetizar TH y compuestos similares; sin embargo, no se ha identificado una estructura anatómica específicamente asociada con dicha función. Por otro lado, la administración exógena de TH a estos organismos modifica diversas funciones como el desarrollo y reproducción (Heyland y col., 2006). Además de estas, se han reportado otras funciones para las HT en estas especies: el coral *Leptogorgia irgulata* contiene una sustancia semejante a la tiroxina o T₄ que al parecer esta involucrada en el metabolismo de calcio (Kingsley y col., 2001). Por otro lado, estas especies contienen aminoácidos yodados que forman parte de estructuras córneas o fibrosas como el exoesqueleto y la cutícula y se considera que dicha halogenación ocurre como una reacción extracelular no específica.

1.2. Evolución de la Glándula Tiroides

La historia evolutiva de la tiroides es una de las más interesantes entre las glándulas del sistema endocrino. En los tres subfilas de los cordados (urocordados, cefalocordados y craneados) se ha establecido la presencia de células especializadas en la captura y organificación de yodo (figura 1). El endostilo en uro y cefalocordados; la glándula subfaringea en los ciclostomos, y en el resto de los craneados la tiroides, concentran el halógeno (Valverde-R. y col., 2004). Tanto la glándula tiroides como el endostilo están asociadas con la región faríngea del tracto digestivo, sugiriendo una relación entre la función biosintética de TH y la ingestión de alimento.

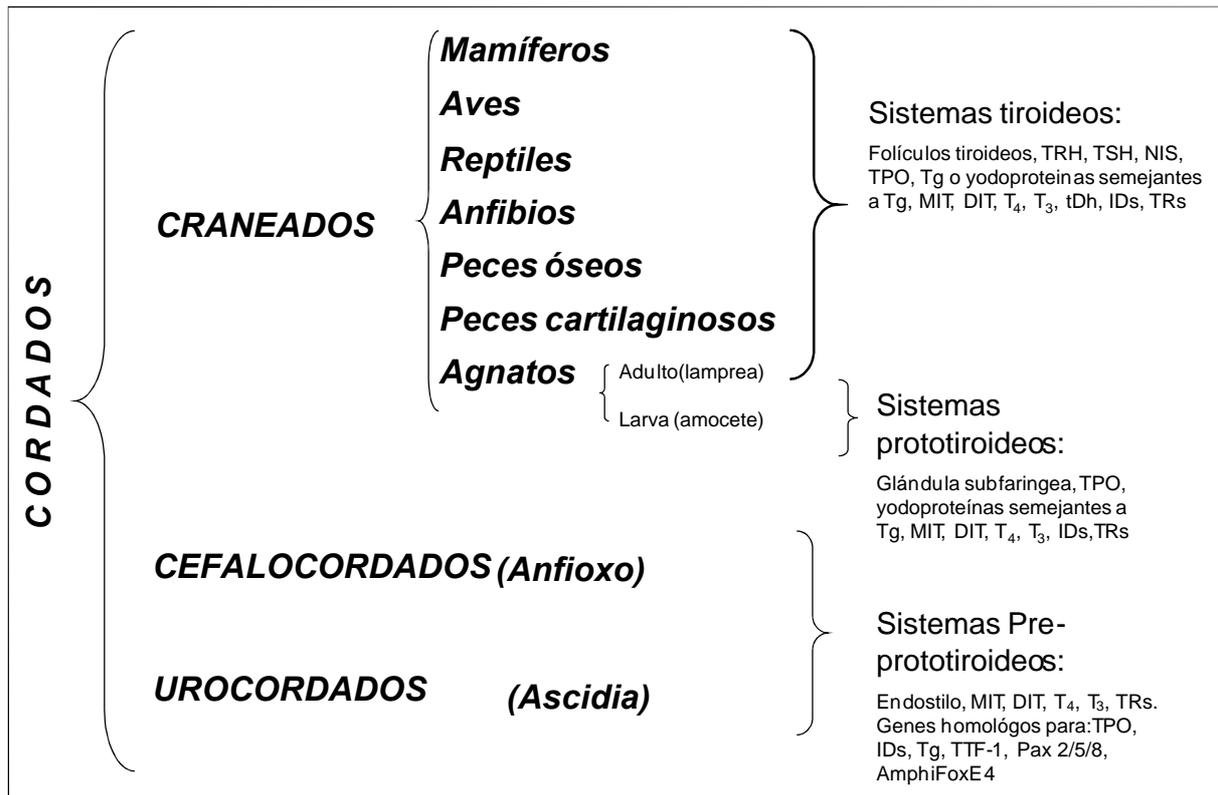


Figura 1. Aspectos Filogenéticos de la Función Tiroidea en los Cordados. Los sistemas pre-prototiroideos, prototiroideos y tiroideos son definidos por una serie de marcadores funcionales, bioquímicos y moleculares característicos del metabolismo de yodo. Los sistemas pre-prototiroideos se encuentran en uro y cefalocordados. Los sistemas prototiroideos en agnatos pueden considerarse como la transición hacia un eje HHT verdadero. Los sistemas tiroideos se caracterizan por poseer un eje HHT funcional. TRH, tiroliberina; TSH, tirotropina; NIS simportador Na/I; TPO, tiroperoxidasa; Tg, tiroglobulina; MIT, monoyodotirosina; DIT, diyodotirosina; T₄, T₃ tiroxina y triyodotironina respectivamente; tDh, deshalogenasa tiroidea; IDs, desyodasas; TRs, receptores de hormonas tiroideas; TTF-1, factor de transcripción tiroideo 1; Pax 2/5/8, factores de transcripción pax 2,5, y 8; AmphiFoxE4, factor de transcripción FoxE4 del anfioxo. (Modificada de Valverde-R y col., 2004).

Los sistemas prototiroideos o primordiales se definen como aquellos sistemas desarrollados por los agnatos y en los que se tiene un sistema regulatorio de deshalogenación enzimática que precede a la regulación neuroendócrina de los sistemas tiroideos.

1.2.1. Urocordados

Los urocordados pertenecen al *subfilum Urochordata* y se dividen en tres clases taxonómicas: *Asciacea*, *Larvacea* y *Thaliacea*. Las ascidias (también conocidas como tunicados), son cordados ancestrales que frecuentemente se

refieren como protocordados ya que durante su estadio larvario poseen características de cordados: tienen un notocordio y espina dorsal. Después de este estadio larvario de vida libre, sufren una metamorfosis donde pierden la cola y hay un rearrreglo de los órganos internos. En su forma adulta las similitudes con los cordados se pierden (Kargong., 1998).

En las ascidias se han encontrado diversos elementos precursores de la glándula tiroidea. La primera evidencia en cordados de la síntesis de TH proviene de estudios realizados en el endostilo de urocordados. El endostilo es una glándula exocrina secretora de moco que se localiza en la región faríngea. Cerca de la apertura del endostilo existen células especializadas que acumulan yodo del agua de mar y lo organifican en los residuos tiroso de una glicoproteína que es secretada a la luz de la faringe. Esta mucoproteína participa en la función alimenticia, atrapa partículas de alimento que son arrastradas a la faringe por corrientes de agua causadas por movimientos de los cilios faríngeos. Los cilios mueven el moco con el alimento atrapado hacia el tracto digestivo (Norris., 1997). En el endostilo se ha identificado actividad así como la expresión de peroxidasa (Kobayashi y col., 1983; Ogasawara y col., 1999). Por otro lado, en el genoma de *Ciona intestinalis* se han identificado genes putativos homólogos (ortólogos) a aquellos que participan en la síntesis y metabolismo de TH en vertebrados como la peroxidasa tiroidea (TPO), el transportador de yodo (NIS), las oxidases tiroideas (Duox1 y Duox2) y los receptores nucleares de TH (Dehal y col., 2002). También, en *Halocynthia roretzi* se identificó el ortólogo de un gen que expresa actividad desyodativa y que por sus características cinéticas parece corresponder al isotipo D1 (Shepherdley y col 2004). Los niveles de T_4 y T_3 se han medido en sangre y tejidos de ascidias (Fredriksson y col 1993). La presencia de TH en ascidias se ha documentado en su etapa adulta y larvaria; aunque en su etapa adulta no se ha establecido una función clara de las TH, en la etapa larvaria la T_4 parece estar involucrada en la metamorfosis (Particolo y col., 2001, D' Agati y Cammarata M., 2006).

1.2.2. Cefalocordados

El anfioxo (*Branchiostoma lanceolatum*) es el mejor modelo conocido para estudiar los orígenes y evolución de la metamorfosis en los cordados y,

consecuentemente, de los precursores de la función tiroidea en cefalocordados. Al igual que en la ascidia, el endostilo del anfioxo se considera un precursor de la glándula tiroides. Existen múltiples evidencias que apoyan esta idea; por ejemplo, se ha mostrado que las células del endostilo del *B. lanceolatum* expresan los genes homólogos de vertebrados TTF-1, TTF2 y pax-8 (factor de transcripción tiroideo 1 y 2, y factor de transcripción pax-8), que codifican para factores de transcripción reguladores de la morfogénesis de la glándula tiroides; así como, de tiroperoxidasa o TPO (*thyroid peroxidase*), tiroglobulina (Tg) y del receptor de la hormona estimulante de la tiroides o TSH (por sus siglas del inglés, *thyroid stimulating hormone*) (Holland y Holland., 1999, Ogasawara, 2000, Venkatesh y col., 1999). Recientemente se identificaron los ortólogos de los genes para TPO y desyodasas en el genoma del *B. floridae*, pero no el de la Tg. También se clonó y expresó el gene del TR α que presenta un 74% de homología con su contraparte en el humano. Sorprendentemente, los estudios de transactivación revelaron que este TR del anfioxo no une T₃. Esta paradoja se resolvió con el descubrimiento de que el ligando específico es el ácido triyodo-tiroacético (TRIAC) que hasta ese momento se consideraba un catabolito de la T₃ (Paris y col., 2008).

1.2.3. Craneados

En los craneados o vertebrados existe ya una glándula tiroides funcional. Los ciclostomos (o agnatos) son la clase más arcaica de los vertebrados (figura 1) y la lamprea es uno de los organismos mejor estudiados del grupo. La función tiroidea de la lamprea es peculiar. En su fase larvaria (amocete), este organismo posee una glándula exocrina bilobulada y estructuralmente más compleja que el endostilo denominada glándula subfaringea. Durante la metamorfosis de larva a adulto, la glándula subfaringea se diferencia en una glándula tiroides y deja de funcionar como un órgano exocrino accesorio del tracto intestinal. Sin embargo, tanto la glándula subfaringea (larva) como la tiroides (adulto) no están bajo el control neuroendocrino del eje HHT (ver adelante) y se ha sugerido que el principal mecanismo de regulación es la desyodación periférica de las TH, principalmente a nivel intestinal (Eales y col., 2000). Dicho sistema prototiroideo de ciclostomos se considera como un paso evolutivo hacia un eje HHT verdadero (Valverde-R., y col., 2004). Para la integración de los sistemas tiroideos con un eje HHT verdadero, hay hechos

precedentes que son importantes como son la captura y organificación de yodo, así como la desyodación.

La información revisada hasta aquí ha llevado a proponer el modelo evolutivo de la glándula tiroides, desde urocordados hasta la lamprea, que se ilustra en la figura 2.

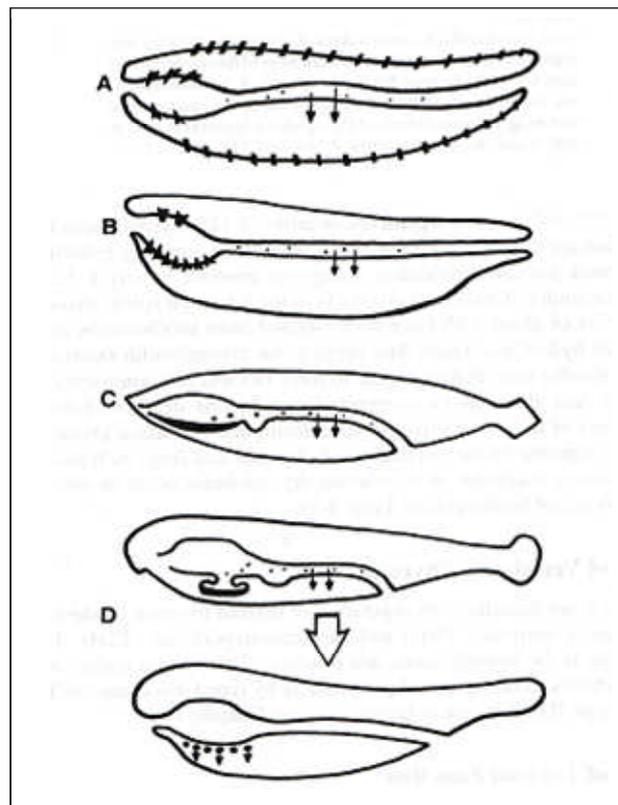


Figura 2. Evolución de la Glándula Tiroides. Las flechas, líneas diagonales y áreas sombreadas indican la distribución de proteínas o compuestos yodados en cada organismo. A) Inicialmente las mucoproteínas yodadas sintetizadas y excretadas por el endostilo, se distribuyeron sobre la superficie del cuerpo y en el tracto digestivo anterior; para después situarse en la región de la boca. B) Las mucoproteínas liberadas de la región de la boca pasan al intestino donde se digieren y liberan yodotirosinas y tironinas. C) El anfiexo produce yodoproteínas en el endostilo. D) En los agnatos, la metamorfosis del endostilo (o glándula subfaringea) a glándula tiroides ocurre durante la transformación de la larva amocete a la lamprea adulta (Norris., 1999).

2. LA FUNCION TIROIDEA EN VERTEBRADOS

En esta sección se resume la abundante información que sobre el particular existe en mamíferos. Para el resto de vertebrados se destacará aquella que es relevante al tema central de la tesis; es decir, la relacionada a los peces.

2.1. Eje Hipotálamo-Hipófisis-Tiroides. Visión de Conjunto

Como se esquematiza en la figura 3, la función de la glándula tiroides es controlada por el clásico eje neuroendocrino hipotálamo-hipófisis. El tripéptido TRH (del inglés, *thyrotropin releasing hormone*) sintetizado en las neuronas del núcleo paraventricular del hipotálamo, estimula la producción y secreción de la hormona hipofisiaria tirotropina o TSH. A su vez, la TSH estimula el crecimiento y función de las células foliculares tiroideas también llamadas tirocitos; dando como resultado la producción y secreción de las hormonas tiroxina (T_4) y triyodotironina (T_3). La T_4 es la principal TH secretada por la tiroides y por su conversión metabólica subsiguiente se considera una pro-hormona. Las TH ingresan a todas las células del organismo a través de un proceso mediado, al menos parcialmente, por transportadores membranales específicos (véase más adelante). Una vez ingresada, la T_4 puede desyodarse (desyodasa tipo 1 y 2) para producir la hormona activa T_3 ; o bien, inactivarse (desyodasa tipo 3) para producir la triyodotironina reversa (rT_3). De esta manera, la desyodación de las TH se considera el cuarto eslabón funcional del eje hipotálamo-hipófisis-tiroides (HHT), ya que se encarga de regular de manera tejido-específica, la concentración intracelular de hormona tiroidea activa o inactiva (para revisión véase: Bianco y col., 2002; Kuiper y col., 2005, Gereben y col., 2008). El principal mecanismo de acción de las hormonas tiroideas esta mediado por su unión a receptores nucleares específicos o TR del inglés *thyroid hormone receptor*. Esta interacción TH-TR puede estimular o bien, inhibir (reprimir) la transcripción genómica. Por esta razón se considera que los TRs son factores reguladores de la transcripción dependientes de ligando; es decir, dependientes de la TH. Por su parte y a través de un mecanismo de retroalimentación (negativo o positivo), la unión de la TH a su receptor determina la regulación fina del eje HHT (Yen y col., 2006). Esta asa de retroalimentación puede ser por acción directa de la T_3 o indirecta de la T_4 que se convierte a T_3 en la hipófisis o el hipotálamo (Lechan y Feteke., 2005).

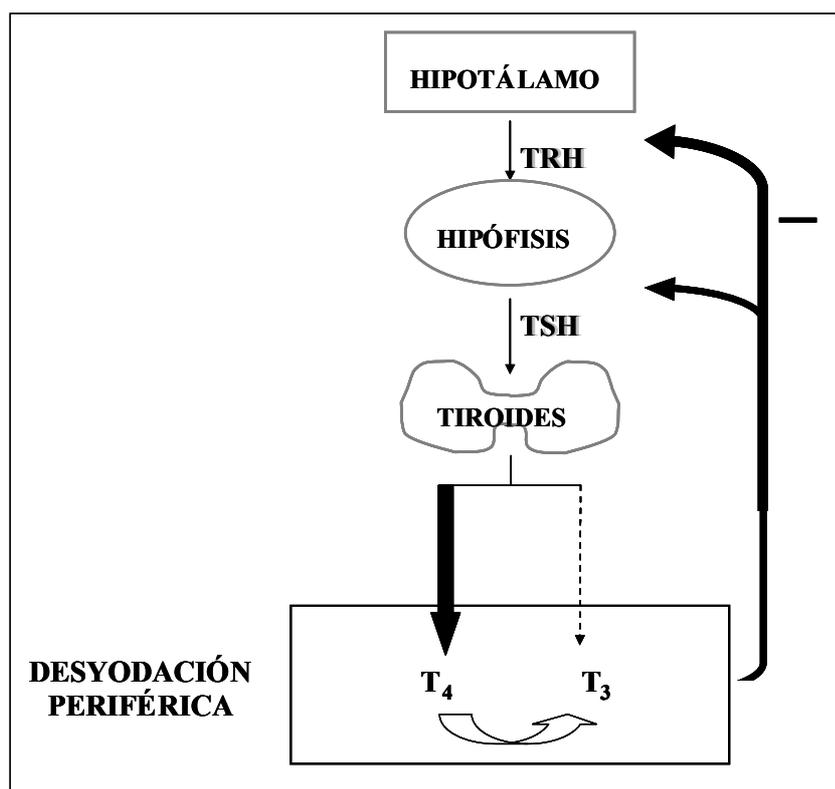


Figura 3. El Eje Hipotálamo-Hipófisis-Tiroides en Mamíferos. La TRH hipotalámica liberada al sistema porta hipotálamo hipofisiario alcanza su sitio específico de acción, los tirotropos hipofisiarios y estimula la síntesis y liberación de la tirotropina o TSH. Esta glucoproteína regula, en la glándula tiroides, la síntesis y secreción de hormonas tiroideas. Del compartimento vascular, las tironinas son depuradas por los diferentes órganos. Este recambio compartimentalizado incluye la monodesyodación de la T₄ a T₃. La concentración intracelular de tironinas establece mecanismos de retroalimentación que regulan la operación del eje. La T₃ regula a la TSH y TRH a través de un mecanismo de retroalimentación negativo.

En contraste con los vertebrados superiores, el control hipotalámico sobre el tejido tiroideo de peces parece ser predominantemente inhibitorio (Leatherland., 1994).

La somatostatina por ejemplo tiene un efecto inhibitorio sobre la secreción de TSH en el pez dorado (Peter y McKeown, 1975). Se han descrito efectos contradictorios de la TRH sobre los niveles plasmáticos de las HT. Mientras que la TRH es ligeramente estimulante en salmónidos (Eales y Himick., 1988), ésta exhibe un efecto inhibitorio en *Poecilia reticulata* (Bromage., 1975). Sin embargo, la mayoría de los estudios no han detectado cambio en la actividad tiroidea disparada por TRH (Gorbman y Hyder., 1973, Dickhoff y col., 1978). En teleósteos la TSH parece ser la hormona reguladora de la función tiroidea y sus efectos pueden ser mimetizados por las gonadotropinas de mamíferos (Byamungu y col., 1990).

2.1.1. Tiroliberina o TRH

Esta neurohormona es un tripeptido cuya estructura química pyroGlu-His-Pro-NH₂ esta conservada en todos los vertebrados. Se sintetiza en las neuronas del núcleo paraventricular cuyos axones proyectan a la eminencia media del hipotálamo y es transportada a la glándula hipófisis por el sistema local de circulación porta hipotálamo-hipofisiario. En la hipófisis, la TRH se une a receptores de membrana específicos (TRHR por sus siglas del ingles, *thyrotropin releasing hormone receptor*) localizados en los tirotropos. El receptor a TRH pertenece a la familia de proteínas con siete segmentos transmembranales. En los tirotropos este receptor está acoplado a una proteína Gq (metabolismo de los fosfoinosítidos membranales). La TRH estimula la síntesis, liberación y glucosilación de la TSH, que es necesaria para que la hormona sea biológicamente activa (para revisión vease: Scanlon y Toft., 2000). En la membrana plasmática de los tirotropos, al parecer, se localiza la piroglutamil aminopeptidasa (PAGP, del ingles *pyroglutamyl aminopeptidase*), una ectoenzima que inactiva a la TRH (Scanlon y Toft., 2000). Sin embargo, las evidencias experimentales sugieren que la piroglutamil aminopeptidasa II (PPII) no esta localizada en tirotropos (Bauer y col., 1990, Cruz R y col., 2008). Mas bien, parece que la PPII que está localizada en los tanicitos de la eminencia media del hipotálamo y degrada a la TRH antes de su llegada a la adenoipófisis (Sanchez y col., 2009). La distribución en el cerebro de neuronas inmunoreactivas a TRH (TRHir) se ha estudiado en aves, anfibios y teleósteos. En estos vertebrados, la expresión de TRH se ha detectado principalmente en neuronas del núcleo preóptico e hipotálamo; sin embargo, también se ha encontrado la presencia de TRH en neuronas de otras regiones del cerebro. En peces cartilaginosos se ha estudiado la distribución de neuronas TRHir y se ha encontrado un patrón semejante al resto de vertebrados (Teijido y col., 2002). En los peces, la estructura química y el mecanismo de acción de la TRH son similares a los descritos en mamíferos y otros vertebrados (Bentley., 1998).

2.1.2. Hormona Estimulante de la Tiroides (TSH) o Tirotopina.

Esta hormona hipofisiaria es una glicoproteína de aproximadamente 32 kDa y consta de 2 subunidades: la α y la β ; es sintetizada y secretada en la adenohipófisis

por células especializadas llamadas tirotrópos. Cada subunidad es codificada por un gen diferente, modificada postraduccionalmente y acoplada para formar un heterodímero. La TSH opera a través de su unión a un receptor específico (TSHR) localizado en la membrana plasmática de los tirocitos. El mecanismo de acción de la TSH está mediado por las vías de Gs (adenilatociclasa y producción de cAMP) y Gq. A través de este mecanismo estimula la expresión de los genes que regulan la captura de yodo y la síntesis –hormonogénesis- y liberación de las TH (para revisión vease: Cohen y col., 2000, Rapoport, 2000).

Con excepción de los agnatos la TSH está presente en el resto de los craneados. En lampreas adultas, la hipofisectomía no altera la función tiroidea. En cuanto a los peces cartilagosos, particularmente en tiburones, el eje hipófisis-tiroidea parece estar bien establecido. En 1940, Gorbman encontró que los extractos hipofisarios de teleósteos, anfibios, aves, y mamíferos estimulaban el tejido tiroideo del pez dorado. Estudios posteriores usando una gran variedad de especies mostraron que aunque las TSHs presentes en las diferentes especies no eran idénticas si presentaban los mismos efectos biológicos. Sin embargo, mientras que las diferentes preparaciones de TSH son activas en teleósteos, la TSH de estos peces tiene poca actividad en mamíferos. Al ir ascendiendo en la escala filogenética, se encuentra que las preparaciones de TSH de un pez pulmonado; así como de anfibios, reptiles y aves estimulan claramente la actividad tiroidea de mamíferos y teleósteos. En los condriactios, la tiroidea responde a TSH homologa pero no a las hormonas de mamíferos y teleósteos (Jackson y Sage., 1973). La TSH de condriactios estimula la tiroidea de mamíferos. En cuanto a los agnatos o ciclostomos, la TSH mamífera incrementa la actividad tiroidea en *Eptatretus stouti*, aunque la actividad de TSH no se ha demostrado en *Myxine glutinosa* (Kerkof y col., 1973). Lo anterior sugiere que la TSH ha sufrido cambios en su estructura durante la evolución (Bentley, 1998).

2.2 La Glándula Tiroidea

Como se esquematiza en la figura 4, la forma de la glándula tiroidea en los vertebrados es muy diversa. Sin embargo, independientemente de esta heterogeneidad anatómica, la unidad morfofuncional es común en todas ellas y está

constituida por el folículo tiroideo. En ciclóstomos adultos y muchos teleósteos, la tiroides se encuentra fragmentada en cúmulos de folículos distribuidos a lo largo de la región faríngea. En algunas especies de teleósteos y algunos tetrápodos, el tejido conectivo encapsula la tiroides como una glándula con uno o dos lóbulos. Un hecho interesante en peces es la localización de folículos tiroideos en áreas no faríngeas, frecuentemente el riñón (Leatherland, 1994). La tiroides en peces elasmobranquios

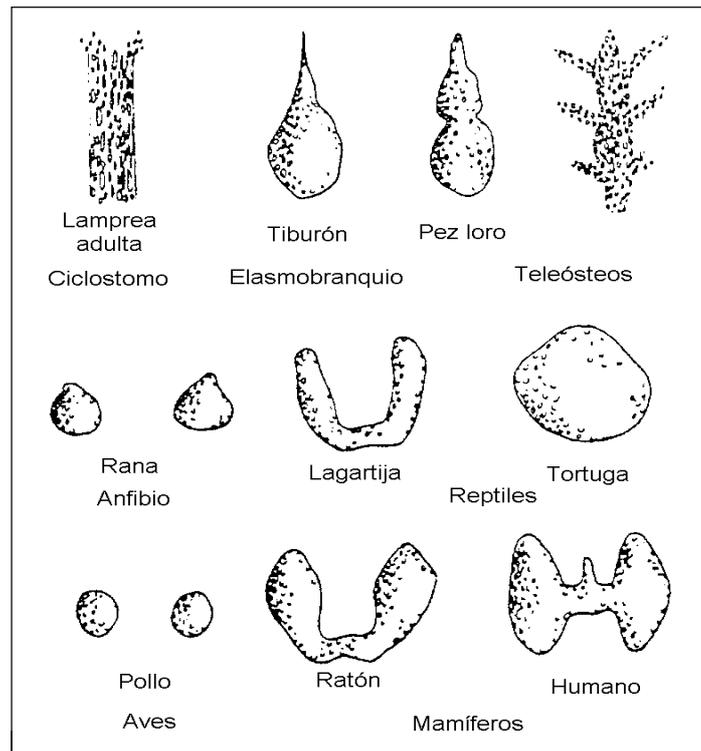


Figura 4. Distribución del Tejido Tiroideo y su Organización en la Glándula Tiroides en Diferentes Vertebrados (Capen .C., 2000)

generalmente se encuentra agregada en un solo órgano encapsulado cerca de la mandíbula inferior. En anfibios hay dos lóbulos tiroideos redondos. En los reptiles la forma de la tiroides es variable, las tortugas presentan un disco largo de tejido tiroideo enfrente del corazón y la lagartija presenta una glándula bilobulada conectada por un istmo que cruza la traquea.

En los mamíferos la glándula consiste en muchos folículos encapsulados por tejido conectivo. En todos los vertebrados, la tiroides se origina a partir de un conglomerado celular e invaginación endodérmica localizada en la línea media en el piso de la faringe primitiva, entre el primer y segundo arco branquial. En el humano es el primer tejido endocrino glandular que aparece en el desarrollo embrionario. El

folículo tiroideo es una estructura esférica que consta de dos partes: un epitelio simple de células altamente especializadas denominadas tirocitos o células foliculares y el lumen folicular, un espacio o cavidad sacular extracelular central que almacena al coloide tiroideo, formado principalmente por la tiroglobulina (para revisión vease: Bentley, 1998, Gorbman y col., 1983; Capen C., 2000).

2.3. Biosíntesis de las Hormonas Tiroideas

La glándula tiroides es un órgano endocrino especializado y es el único que posee la maquinaria enzimática y la organización anatómica para sintetizar y almacenar hormonas tiroideas. La vía metabólica del yodo que conduce a la biosíntesis de las TH ocurre en tres etapas secuenciales: *i.* el transporte activo (captura) del yoduro al interior de los tirocitos; *ii.* la oxidación del yoduro, y *iii.* su organificación en residuos tirosilo específicos de la molécula de tiroglobulina. Como se muestra en la figura 5, en la hormonogénesis propiamente dicha participan al menos las siguientes siete proteínas: el transportador sodio/yoduro Na/I o NIS por sus siglas del inglés; *sodium/iodine symporter*; la Pendrina (PDS); la tiroglobulina (Tg); diferentes chaperonas moleculares (calnexina, BiP); la tiroperoxidasa (TPO); la oxidasa tiroidea de NADPH (THOX) y la deshalogenasa tiroidea (tDh), (para revisión vease: Taurog., 2000, Solis-Sainz y Valverde-R., 2006, Moreno et al., 2008).

2.3.1. Estructura Química

Las yodotironinas son derivados yodados de dos moléculas del aminoácido tirosina. Los dos aminoácidos se unen por un puente éter eliminando un residuo de alanina de una tirosina y uniendo un grupo hidroxilo al anillo fenólico de la otra tirosina. Como se muestra en la figura 6, la estructura química resultante es la molécula de tironina, en la cual los carbonos del anillo externo o fenólico adicionado se designan con el símbolo “prima (’)”. El núcleo de tironina constituye la unidad estructural básica de las TH. Variando el número y posición de los átomos de yodo en la molécula, se pueden derivar las estructuras de los miembros de esta familia de hormonas.

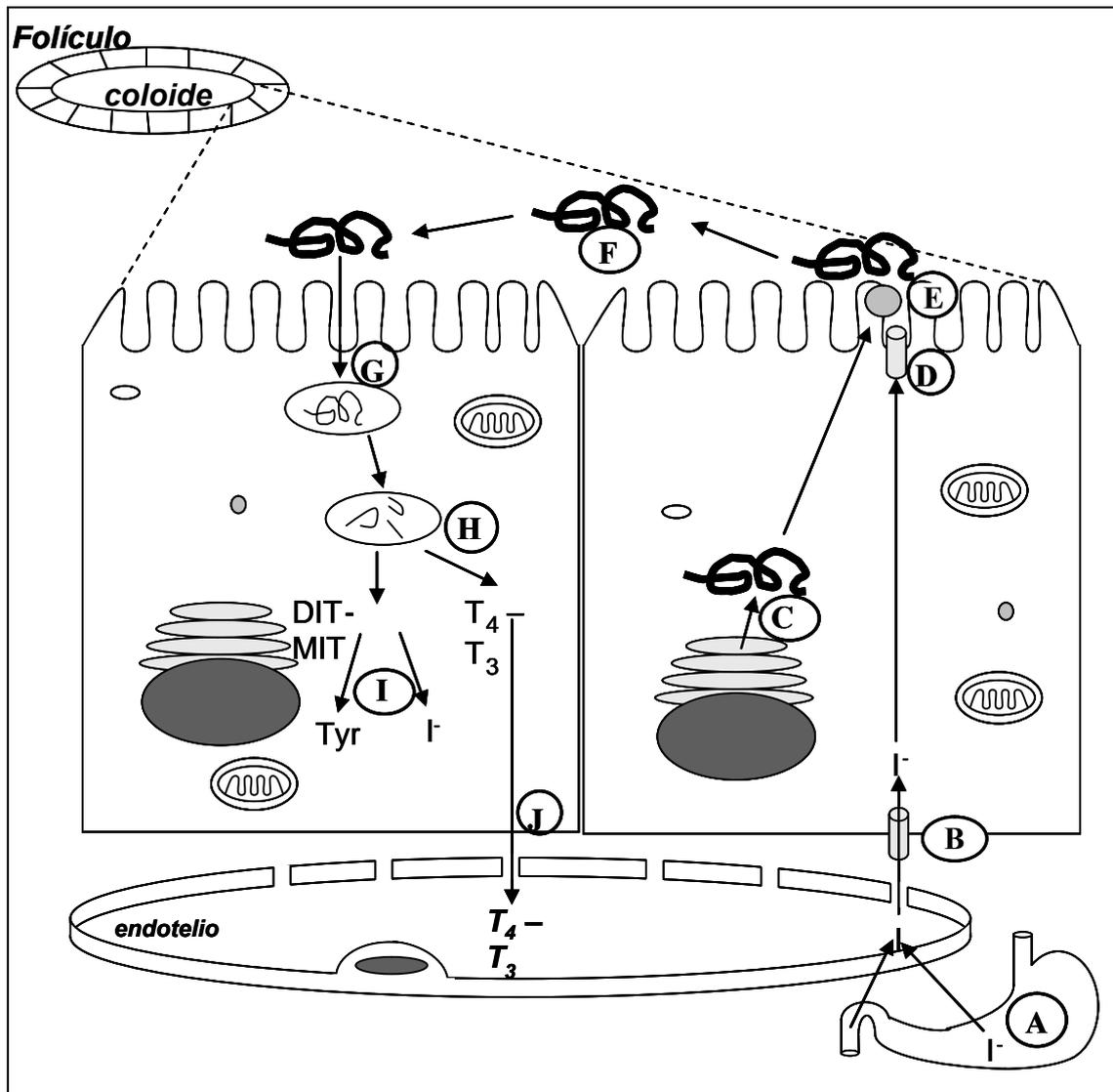


Figura 5. Síntesis, Almacenamiento y Secreción de Hormonas Tiroideas. La figura esquematiza una sección de folículo tiroideo (esquina superior derecha) con dos tirocitos en relación al capilar sanguíneo (región basal) y a la cavidad folicular (región apical). **A, Absorción de yoduro:** el halógeno se absorbe en el tracto digestivo y pasa a la circulación. **B, Captura de yoduro:** en el polo basal y mediante el NIS, el yoduro es internado activamente por los tirocitos. **C, Síntesis de tiroglobulina (Tg).** **D, Translocación del yoduro:** en el polo apical del tirocito y mediante la acción de la Pendrina o PS el halógeno pasa hacia la cavidad folicular. **E. Organificación de yodo y síntesis de TH:** este paso incluye tres etapas estrechamente asociadas: activación, organificación y acoplamiento. Las tres ocurren en la membrana apical del tirocito y son catalizadas por la TPO en presencia de H_2O_2 . **F, Almacenamiento:** la Tg yodada que contiene en su molécula MIT, DIT, T_4 y T_3 pasa al coloide, constituyendo así un reservorio de yodo y TH. **G-H, Endocitosis y Proteólisis de la Tg:** en respuesta a la estimulación por la TSH, el coloide es endocitado, formando vesículas que se fusionan con los lisosomas. En los fagolisosomas resultantes las moléculas de Tg son digeridas, liberando MIT, DIT y TH. **I, Deshalogenación:** las yodotirosinas que no fueron acopladas son desyodadas por la tDh, favoreciendo así la reutilización del halógeno en un nuevo ciclo de síntesis de TH. **J, Secreción:** paso de las TH a la circulación a través de la membrana basolateral del tirocito (modificado de Solis-Sainz y Valverde-R., 2006; Moreno y col., 2008).

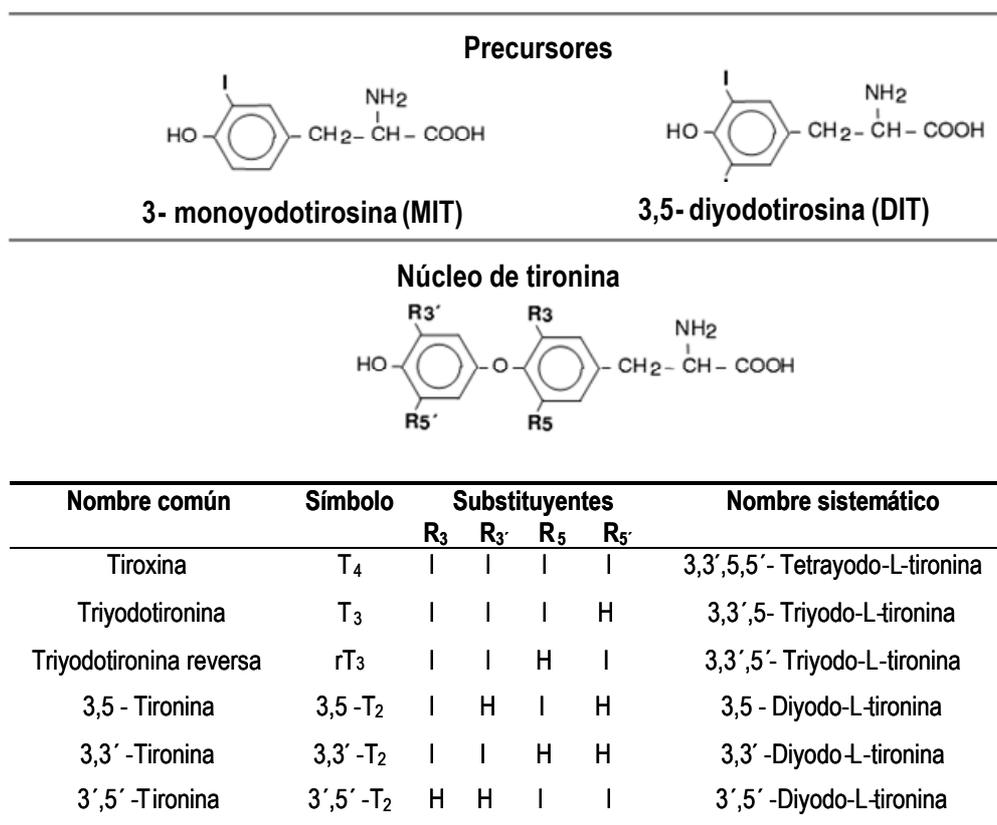


Figura 6. Estructura de las Hormonas Tiroideas. En la parte superior de la figura se muestra la estructura de los precursores MIT y DIT y el núcleo de tironina. En la parte inferior la tabla resume la nomenclatura de las diversas yodotironinas de acuerdo a la posición de los sustituyentes átomos de yodo (Valverde-R y col., 2004)

2.3.2. Transporte

Prácticamente el total de las TH circulantes (99%) se unen de manera reversible a proteínas del plasma, y sólo una pequeña fracción circula en forma libre. Esta unión es importante para su transporte en el torrente sanguíneo ya que dada la naturaleza hidrofóbica de T₃ y T₄, éstas no son solubles en la sangre. Las proteínas de transporte representan un reservorio de hormonas en la circulación que están disponibles para su uso inmediato. Además, se ha sugerido que representan un sistema que amortigua, hasta cierto límite, los cambios en la producción-secreción de TH. Existen tres proteínas principales transportadoras de hormonas tiroideas: la globulina transportadora de tiroxina (TBG, del inglés *thyroxine-binding globuline*), la prealbúmina transportadora de tiroxina (TBPA, del inglés *thyroxine-binding prealbumin*) y la albúmina. A la TBPA también se le conoce con el nombre de

transtiretina (TTR) y, en términos evolutivos, parece ser la más antigua de las tres. En el humano el 75% de las HT se unen a TBG, 15 y 10% se unen a TTR y albúmina, respectivamente. En el fluido cerebroespinal la TTR es la principal proteína de unión a TH; donde al parecer, juega un papel importante en la distribución de T_4 y T_3 en el sistema nervioso central. La TTR se sintetiza en el hígado y plexos coroideos y se secreta a la sangre y el fluido cerebroespinal. Todos los vertebrados tienen una o más de estas proteínas transportadoras, siendo la TBG la más abundante en mamíferos. Por otro lado, la TTR está más ampliamente distribuida entre especies (para revisión vease Schreiber, 2002). Es importante resaltar la total ausencia de la TBG en peces. Algunos mamíferos como la rata y la vaca no expresan TBG, siendo la TTR la principal proteína de transporte (para revisión vease Robbins., 2000).

2.3.3. Ingreso de las TH a sus Células Blanco

Hasta hace unos cuantos años, se aceptaba que siendo moléculas lipofílicas, las TH franqueaban la membrana plasmática de las células del organismo por difusión pasiva. Sin embargo, ahora se sabe que estas hormonas entran y salen de las células mediante la acción de transportadores de membrana específicos y que éstos son un factor limitante en el metabolismo y actividad de las hormonas tiroideas. A la fecha, se han identificado varios de estos transportadores transmembranales incluyendo a algunos miembros de la familia del polipéptido transportador de aniones orgánicos independiente de sodio o OATP, del inglés *organic anion transporting polypeptide*, y de la familia de los transportadores de monocarboxilato (MCT8 y MCT10). Tanto OATPC1 como MCT8 y MCT10 son específicos para transportar TH. OATPC1 se expresa exclusivamente en los vasos capilares del cerebro y parece ser crucial para transportar a la prohormona T_4 a través de la barrera hematoencefálica. El MCT8 exhibe mayor afinidad por T_3 que por T_4 . Se expresa en diferentes tejidos y es particularmente abundantemente en el hígado, el riñón y el cerebro. En el caso del sistema nervioso, se ha postulado que el papel fisiológico del MCT8 consiste en abastecer a las neuronas con la hormona activa, la T_3 , que es producida por los astrocitos circundantes a partir de la desyodación (D2) de la T_4 . Las neuronas expresan D3 que inactiva a la T_3 . Se han asociado algunas enfermedades caracterizadas por daño neural entre otros

síntomas, con mutaciones en los genes que codifican a los transportadores de membrana. Por ejemplo, mutaciones en el gen MCT8 se han asociado con retardo psicomotor severo ligado al cromosoma X y niveles elevados de T_3 en el suero (para revisión vease: Jansen y col., 2005; Friesema y col., 2005).

2.3.4. Mecanismo de Acción

Una vez que ingresan a las células blanco, las TH se unen a receptores nucleares, iniciando o reprimiendo la transcripción de genes y dando como resultado final cambios en síntesis de proteínas. Los receptores nucleares para hormonas tiroideas (TRs, del inglés *thyroid hormone receptors*), tienen mayor afinidad por T_3 que por T_4 , lo cual apoya la hipótesis de que la conversión de T_4 a T_3 es necesaria para la acción de las TH (figura 7a). $TR\alpha$ y $TR\beta$ son miembros de la superfamilia de receptores nucleares y son codificados por dos genes diferentes localizados en los cromosomas 17 y 3 del humano respectivamente. Aunque ambos TRs unen TH con alta afinidad, difieren en sus patrones de expresión durante el desarrollo; así como en su distribución tisular y patrón de *splicing* (corte de intrones y empalme de exones o edición pos-transcripcional) para dar distintas isoformas. El gen $TR\alpha$ puede dar lugar a tres isoformas en mamíferos: $TR\alpha 1$ que une T_3 y DNA, es un receptor funcional; mientras que $TR\alpha 2$ y $TR\alpha 3$ no unen T_3 ; se piensa que son dominantes negativos aunque su papel in vivo no es claro (Harvey y Williams., 2002, Chen y col., 1997). El gen $TR\beta$ codifica dos variantes en todos los vertebrados: $TR\beta 1$ y $TR\beta 2$, ambos son receptores funcionales (Moore y Guy., 2005).

Los TRs se unen a secuencias reguladoras de los genes llamadas elementos responsivos a TH (TREs, del inglés *thyroid hormones responsive elements*), que se localizan generalmente en la región promotora de genes específicos cerca del sitio de inicio de la transcripción, pero ocasionalmente se pueden encontrar en otras regiones del gen. Los TREs son sitios de reconocimiento para la unión de los TR que resulta en la transcripción aumentada o disminuida de un gen (para revisión vease: Harvey y Williams., 2002).

Los TRs contienen diversos dominios funcionales (figura 7b): el dominio de unión al DNA o DBD (del inglés *DNA binding domain*) es un dominio central de 70 aminoácidos que pueden formar dos dedos de zinc; el dominio de unión al ligando o

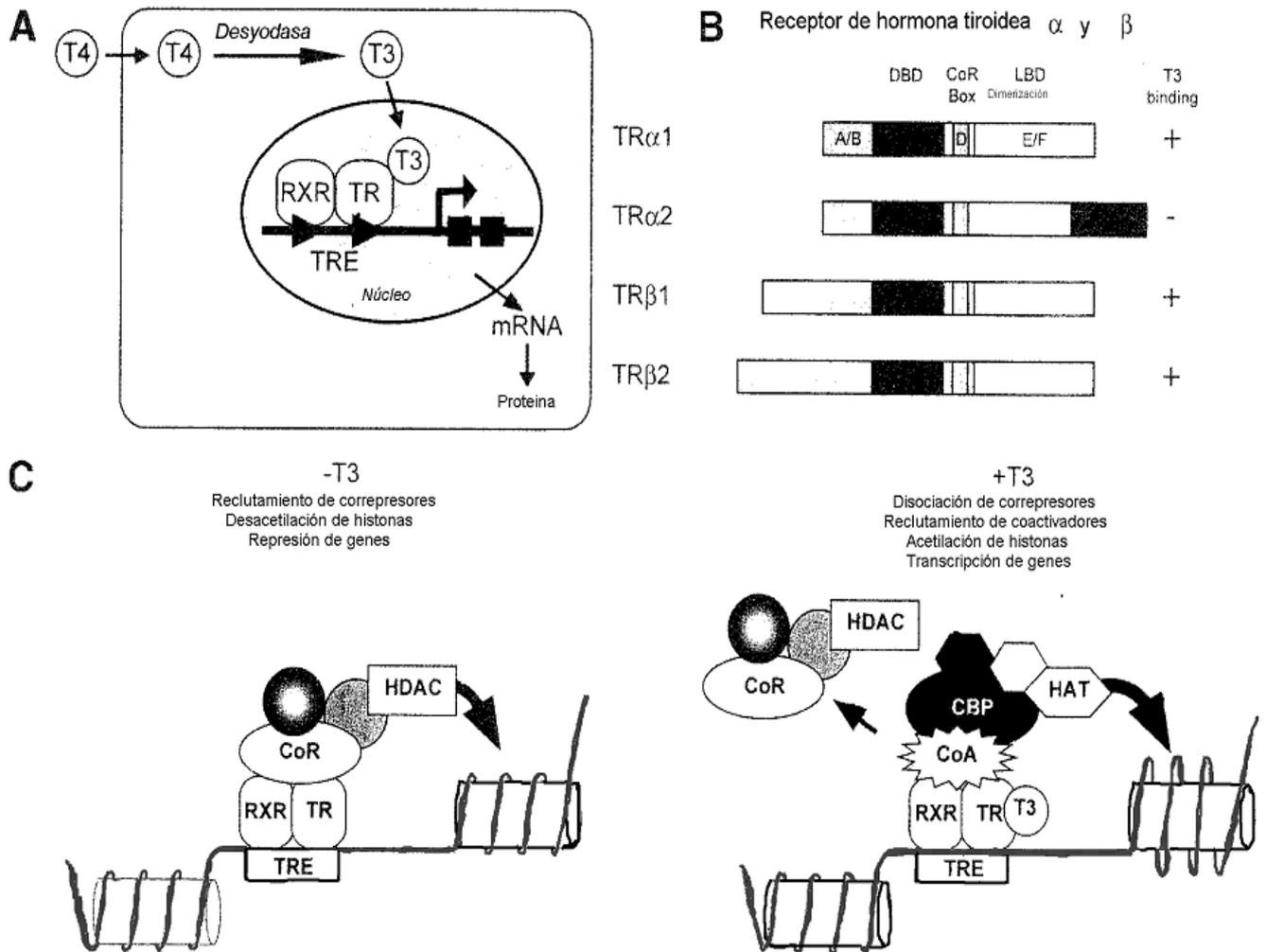


Figura 7. A) Acción Nuclear de las Hormonas Tiroideas. La T_4 entra a la célula donde es convertida a T_3 por las desyodasas. En el núcleo la T_3 interactúa con los receptores a TH (TR). Los TR se unen a secuencias específicas (TRE) en la región promotora de los genes diana interactuando con otros receptores nucleares como el receptor retinoide X (RXR). B) Estructura esquemática de las isoformas más abundantes de los receptores a TH y sus dominios funcionales. C) Modelo de acción de las TH en genes regulados positivamente. En ausencia de TH, los co-represores interactúan con homo o heterodímeros de los receptores de TH y silencian la transcripción. La desacetilación de histonas se asocia con el silenciamiento de la transcripción. Las TH liberan la interacción con los co-represores y la posterior unión de los co-activadores y factores de transcripción, la expresión de genes se inicia, un proceso que involucra la remodelación de la cromatina a través de la acetilación de histonas. RXR, receptor retinoide x; TR, receptor para hormona tiroidea; HDAC, histona desacetilasa; CoR, correpresor; CoA, coactivador; CBP, proteína de unión a CREB; HAT, histona acetiltransferasa.

LBD (del inglés *ligand binding domain*) en el extremo carboxilo terminal del receptor, que también contiene señales de localización nuclear, dominios de dimerización y funciones de transactivación; y el CoR Box que interactúa con los correpresores. La región amino terminal de los TRs se refiere como dominio A/B, es una región que no está conservada entre los diferentes TRs y su función no es clara pero se ha implicado en la regulación de la función de los correpresores (para revisión vease: Anderson y col., 2000; Moore y Guy., 2005). Los TR pueden unirse a los TREs como monómeros, homodímeros o formando heterodímeros, particularmente con el receptor retinoide (RXR). Aunque hay una considerable heterogeneidad en los TREs, la secuencia consenso a la cual se unen los receptores es (A/G)GGT(C/A)A. Esta secuencia puede presentarse como palíndromo, como repetido directo espaciado por cuatro nucleótidos (DR4) o como repetido invertido. Mediante la disrupción de los genes TR α y TR β , se ha revelado que el TR β es importante para el desarrollo del oído interno, la visión a color y la función hepática. El TR β 2 abunda en la hipófisis, mientras que el TR α se expresa de manera abundante en el corazón siendo importante para mantener la función cardíaca, el metabolismo energético basal, además de regular la formación de hueso (para revisión vease: Yen., 2001, Harvey y Williams., 2002).

Un modelo del mecanismo de acción de las TH en genes regulados positivamente se muestra en la figura 7c. Los TRs sin ligando reprimen la transcripción al reclutar correpresores, algunos de los cuales tienen actividad histona desacetilasa y mantienen la estructura de la cromatina reprimida inhibiendo la transcripción. La unión de T₃ altera la conformación del receptor para liberar el complejo co-represor y reclutar un complejo coactivador que incluye acetiltransferasas de histonas. La modificación de las histonas representa un mecanismo que controla la estructura de la cromatina y desencadena eventos transcripcionales. Se sabe que la T₃ puede activar o reprimir la expresión de genes. La regulación negativa de la transcripción dependiente de T₃, involucra en parte la unión de los TRs con TREs “negativos”. Se han caracterizado diversos TREs negativos, incluidos aquellos que inhiben la transcripción de los genes de las subunidades α y β de la TSH y el gen de la TRH. El mecanismo molecular responsable de la represión de la transcripción dependiente de T₃ no es claro, pero puede ser debido a la inactivación de co-activadores que

activan la transcripción génica en ausencia de T_3 (para revisión vease: Anderson y col., 2000; Harvey y Williams., 2002).

Además de sus efectos genómicos, las TH tienen efectos extranucleares principalmente a nivel de la membrana plasmática, las mitocondrias y el citoesqueleto. Recientemente se ha mostrado que además de la T_3 , la principal hormona activa por tener la mayor afinidad a los receptores nucleares, otras yodotironinas como la T_4 , rT_3 y $3,5-T_2$ poseen actividad biológica. Se han descrito diversos efectos para la T_2 ; por ejemplo, incrementar la actividad de enzimas como la citocromo oxidasa y la malato deshidrogenasa, y tener efectos sobre desyodasas y otros genes clásicamente dependientes de TH (para revisión: Goglia F., 2005, García y col, 2004, García. y col., 2007). Por otra parte, la rT_3 y la T_4 regulan la migración neuronal en el cerebelo y el crecimiento de neuritas afectando la polimerización de actina mediante un mecanismo no genómico (Farwell., y col 2005)

2.3.5 Efectos fisiológicos de las TH

Los efectos o acciones fisiológicas de las hormonas tiroideas en los vertebrados pueden dividirse en dos grandes grupos, dependiendo si las hormonas regulan procesos en la vida adulta o durante el desarrollo del organismo. En el caso particular de los efectos en los peces, se tratará más adelante. Así, en mamíferos adultos, las TH controlan la tasa de metabolismo basal y metabolismo energético, mientras que en otros vertebrados regulan procesos metabólicos como el balance de nitrógeno, degradación de lípidos, etc. Generalmente las acciones de las TH se engloban en tres acciones principales (para revisión vease: Bianco y col., 2005, Tata., 2006;).

A) Acciones Metabólicas de las TH. En los mamíferos, los efectos de las TH incluyen una acción termogénica (generación de calor) y efectos relacionados con el metabolismo de lípidos, carbohidratos y proteínas. Estimulan la oxidación de glucosa y aumentan la producción de calor metabólico, lo cual se ve reflejado en un incremento del metabolismo basal como medida del cambio en la velocidad del consumo de oxígeno. Las TH estimulan la síntesis de diversas proteínas mitocondriales, especialmente citocromo c, citocromo oxidasa y succinoxidasa. En general, la actividad tiroidea en mamíferos es mayor durante periodos prolongados

de estrés por frío que durante periodos cálidos. Además de incrementar la oxidación de glucosa, las TH causan hiperglucemia y pueden estimular la lipólisis. La lipogénesis es influenciada por las TH, en particular la enzima málica y otras enzimas lipogénicas en el hígado se relacionan con el estado tiroideo. La participación de las TH en el metabolismo de lípidos y la termogénesis se relaciona con la homeotermia (aves y mamíferos) (Anderson y col., 2000).

B) Crecimiento y Diferenciación. Las TH son esenciales para el crecimiento normal y la diferenciación en mamíferos. La acción de las hormonas tiroideas en el desarrollo ocurre en todos los vertebrados. Las acciones que promueven el crecimiento están relacionadas con el papel de la GH. El desarrollo normal del sistema nervioso es influenciado por las TH. La neurogénesis y todos los procesos que involucran la maduración del SNC son dependientes de las THs maternas o fetales, y se conocen diversos genes regulados por la T_3 como: el de la proteína básica de la mielina, calbindina, receptores a IP3 y proteína Pcp-2 (Bernal y col., 2003).

C) Reproducción. Las TH juegan un papel cooperativo en el desarrollo y función gonadal. Estudios experimentales hacen evidente la influencia de la TH en la liberación de gonadotropina mediante un efecto a nivel del hipotálamo (Norris., 1997). Las TH son importantes para mantener una función reproductiva normal, a través de efectos directos en los ovarios o indirectos por diversas interacciones con hormonas sexuales (Poppe y col., 2004). Un efecto directo de las TH en las gonadas ocurre a través de la modulación por parte de la T_3 de las acciones de la FSH (hormona folículo estimulante) y la LH (hormona luteinizante) en la biosíntesis de esteroides. Por otro lado, se han identificado sitios de unión específicos para T_3 en ovarios de ratón y humano (Cecconi y col., 1999, Poppe y col., 2008)

2.3.6 Metabolismo de las TH

Una vez secretada por la tiroides, la T_4 puede seguir diversas rutas metabólicas. La más importante es la desyodación debido al papel que tiene en regular la biodisponibilidad de la T_3 intracelular en todos los tejidos del organismo. Las vías metabólicas alternas (figura 8) incluyen la: conjugación (del grupo hidroxilo fenólico con sulfato o ácido glucurónico); la desaminación oxidativa y

descarboxilación de la cadena lateral de alanina para formar ácidos yodotiroacéticos, y la ruptura del enlace éter que provee mecanismos adicionales para regular la disponibilidad de hormonas activas (para revisión: Wu y col., 2005; Leonard y Koehrlé, 2000). La sulfatación juega un papel general en la regulación del metabolismo de las TH, la sulfatación de la T_4 y T_3 acelera su desyodación (D1) formando los metabolitos inactivos rT_3 y T_2 . La glucoronización de las TH generalmente precede a la excreción biliar de las hormonas. Las TH sulfatadas y glucoronizadas se pueden hidrolizar a sus precursores en el tracto gastrointestinal. De esta manera, se puede decir que los conjugados pueden servir como un reservorio de yodotironinas. Los derivados de ácido acético de T_4 , tetrac y triac, son productos menores en el metabolismo tiroideo normal. La ruptura del enlace éter, también es una vía menor en sujetos normales; sin embargo, puede ser una vía importante durante algunas infecciones. Recientemente se ha propuesto que los derivados descarboxilados de las tironinas, es decir, la monoyodotironamina (T_{1am}) y tironamina (T_{0am}) pueden tener importancia biológica con acciones selectivas a las de las TH (Scanlan y col., 2004).

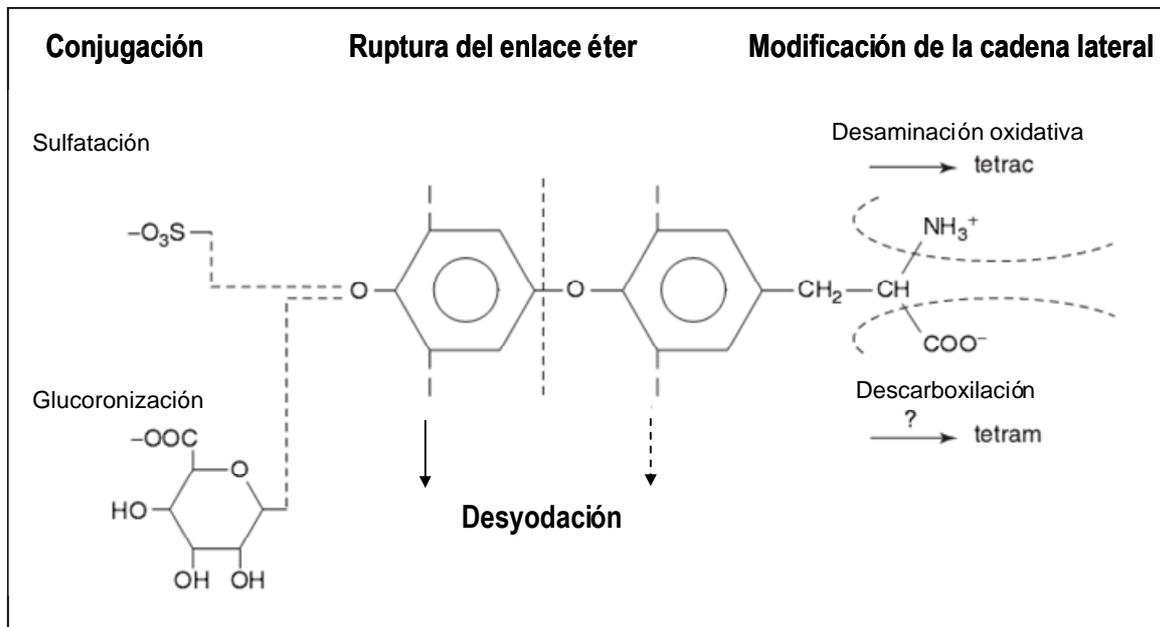


Figura 8. Vías Metabólicas Alternas del Metabolismo de Hormonas Tiroideas. Se muestra la conjugación del grupo hidroxilo de la tironina con el grupo sulfato y glucuronato, para formar conjugados sulfatados y glucoronados. La modificación de la cadena lateral de alanina por descarboxilación y desaminación oxidativa resultando analogos de ácido acético de las TH Tetrac, ácido 3,5,3',5'- tetrayodoacético; tetram, tetrayodotiroamina). La ruptura del enlace eter que da como resultado la generación de una molécula de DIT (diyodotirosina) y la desyodación que puede ocurrir en ambos anillos de la tironina. (Modificada de Wu et al., 2005)

3. DESYODACION

La desyodación de las TH está catalizada por las denominadas desyodasas de yodotironinas (Ds). Estas enzimas son selenoproteínas cuya estructura contiene un pliegue de tiorredoxina (TRX) (es un motivo estructural que se encuentra en distintas clases de proteínas (Martin., 1995)) y regulan la bioactividad de las TH removiendo de manera estéreo-específica los átomos de yodo del anillo externo fenilo (ORD *outer-ring deiodination*), o del anillo interno tirosilo (IRD *inner-ring deiodination*), para generar metabolitos activos o inactivos de la hormona. Se han descrito tres isotipos de Ds: D1, D2 y D3, que difieren en sus propiedades catalíticas, moleculares y funcionales. Se reconocen dos vías desyodativas (figura 9). La vía que produce T₃ por la desyodación del anillo externo de la T₄, se designa vía 5' desyodasa, o desyodación 5' del anillo externo (ORD). Como genera T₃ a partir de la T₄, a esta ruta se le considera la vía de activación.

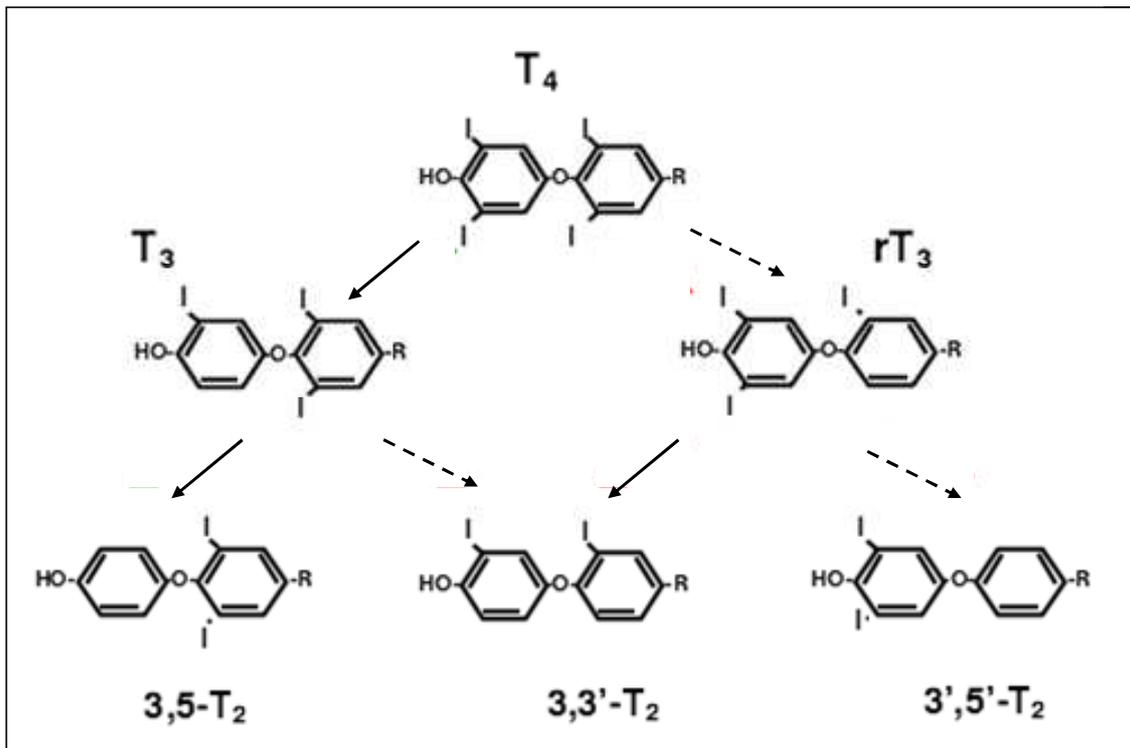


Figura 9. Vías Desyodativas. Se muestran los productos obtenidos por la monodesyodación secuencial de la tiroxina. Las flechas con línea continua representan la vía de activación (vía ORD) catalizada por la D1 y la D2 y las flechas con línea discontinua la vía de inactivación (vía IRD) catalizada por la D1 y la D3.

Por otra parte, si la desyodación de la T_4 ocurre en el anillo interno o tirosilo de la molécula, se genera rT_3 y por esta razón la vía desyodativa se ha llamado desyodación 5 del anillo interno (IRD), o 5 desyodasa. Los metabolitos generados por la vía IRD carecen de actividad calorigénica o tiromimética y por lo tanto a ésta ruta desyodativa se le considera como la vía de bioinactivación (Bianco et al., 2002; Gereben y col., 2008). Además de regular la bioactividad de las TH recientemente se ha descrito que las Ds pueden ser un componente de dos vías de regulación: la vía Sonic Hedgehog (Shh) y la de la cascada TGR-5, un receptor acoplado a proteína G para ácidos biliares. La vía Shh determina los patrones de diferenciación y crecimiento celular en diversos procesos incluido el cáncer, y en órganos que se remodelan continuamente como la piel. Se ha sugerido que la vía Shh puede controlar la acción de TH en la epidermis, afectando el balance entre la D2 y la D3. Esto es muy interesante porque indica que las Ds tienen un papel más amplio de lo que se pensaba (Gereben et al., 2008).

Las Ds son selenoproteínas que contienen al aminoácido selenocisteína (Sec) en el sitio catalítico. Dicho sitio comprende aproximadamente 15 aminoácidos alrededor de la Sec, que están conservados entre los distintos isotipos y constituyen la firma característica o "*signature domain*" de las Ds. La Sec es codificada por el triplete UGA que generalmente es un codón de paro. Para la traducción correcta de este triplete es necesaria la presencia del elemento de inserción para selenocisteína (SECIS) en el extremo 3' no traducido (UTR) del RNAm (Bianco et al., 2002). El elemento SECIS es necesario porque, junto con SBP2(*SECIS-binding protein2*) y EFSec (*elongation factor Sec*), media la inserción co-traducciona de la Sec en el codón UGA (figura 10). La presencia de Sec en el centro activo de las Ds les confiere la acción de oxido-reductasas muy activas. Las Ds no se han podido purificar por técnicas bioquímicas clásicas debido a su baja expresión y naturaleza de proteínas de membrana; sin embargo, la clonación de los tres isotipos ha permitido comprender en gran medida sus características moleculares. Las tres Ds comparten características estructurales, como que se encuentran formando homodímeros, pertenecen a la familia de proteínas que contienen el pliegue TRX y su estructura es semejante a la de la hidrolasa glicosídica (Callebaut y col., 2003). Por otro lado, se han generado diversos modelos de animales transgénicos con pérdida o ganancia de función desyodativa, lo cual ha permitido generar algunos

avances en cuanto a la función fisiológica y significancia de esta familia de enzimas (St. Germain y col., 2005, Schneider y col., 2001, 2006, Hernandez y col., 2006)

3.1. Desyodasas. Visión de Conjunto

3.1.1. Estructura

Las tres desyodasas (D1, D2 y D3) son proteínas integrales de membrana con un peso de 29-33 kDa, que tienen una estructura muy similar y comparten regiones de alta homología en el área cercana al sitio activo. Utilizando el modelado de proteínas *in silico* y el análisis de *clusters* hidrofóbicos (HCA), se ha propuesto que las tres Ds comparten una estructura general de un solo segmento transmembranal en el extremo N-terminal de 30-40 residuos, y diversos *clusters* típicos de α -hélices y hojas β , que forman parte de la estructura secundaria del dominio globular de las enzimas. Una característica notable es la presencia de un pliegue de tiorredoxina (TRX), definido por los motivos $\beta\alpha\beta$ y $\beta\beta\alpha$. Un aspecto estructural único de las Ds es la presencia de un elemento que interfiere dentro de este pliegue de TRX, el cual es similar al de la α -L-iuronidasa (IDUA; 47% idéntica con D1 y D3, 60% con D2), una enzima lisosomal que rompe residuos de ácido irudónico ligados por enlaces α del extremo no reducido de los glicosaminoglicanos (para revisión: Callebaut y col., 2003; Gereben y col., 2007).

El modelo tridimensional (3D) de las Ds predice que el centro activo es una cavidad o *pocket* definido por los motivos β_1 - α_1 - β_2 del pliegue de TRX y la inserción semejante a IDUA. Una de las características más notables del sitio activo de aproximadamente 15 aminoácidos altamente conservados, es la presencia del aminoácido Sec, crítico para la reacción de desyodación en las tres Ds (Gereben y col., 2008).

Los primeros estudios encaminados a purificar a la D1 y a la D2, mostraron actividad desyodativa en proteínas con un peso molecular mayor al que se había deducido a partir de la secuencia de aminoácidos (Safran y Leonard., 1991), y no era claro si las bandas de alto peso molecular representaban asociaciones de Ds con otras proteínas, o se trataba de dimerización de las propias Ds. Curcio-Morelli y

col. en 2003, realizaron estudios para demostrar la existencia de dímeros de D1, D2 y D3, mediante tres aproximaciones independientes en un modelo celular que expresaba Ds transitoriamente. Las evidencias que apoyan la formación de dímeros son: 1) identificación mediante análisis por *Western blot*, de bandas de alto peso molecular correspondiente al tamaño de un posible dímero enzimático, 2) Inmunoprecipitación de actividad desyodativa (D1 o D2) en células coexpresando desyodasa inactiva etiquetada con FLAG (un epítipo constituido por la secuencia DYKDDDDK, de naturaleza hidrofílica que mejora la detección y purificación de proteínas de fusión recombinantes) y la respectiva enzima activa no etiquetada, usando anticuerpos anti-FLAG, y 3) inmunoprecipitación de ⁷⁵Se-desyodasa (D1, D2 o D3) en células que coexpresaban Ds etiquetadas con FLAG no marcadas y la respectiva enzima conteniendo selenocisteína, utilizando anticuerpos anti-FLAG. Por otro lado, se ha propuesto a una región conservada en el C-terminal de la D1 (aminoácidos 148-163) como el dominio de la dimerización y el responsable del ensamble postraduccional de las Ds (Leonard y col., 2005). La dimerización de la D2 es la mejor estudiada. Al parecer son dos los dominios responsables: 1) un dominio transmembrana, que en el caso de la D2 tiene una típica hélice que contiene residuos potencialmente cargados (D,E, R, K, H) que pueden estabilizarse en el ambiente hidrofóbico de la membrana por dimerización; y 2) un dominio globular citosólico (Vivek Sagar y col., 2007). El hecho de que la dimerización sea crítica para la actividad catalítica indica que una conformación apropiada de cada centro activo puede lograrse solamente en el estado dímérico. Se han realizado estudios de dimerización para la D1 y la D3, y al igual que la D2 estos isotipos forman homodímeros a través de superficies de dimerización localizados en los dominios transmembranal y globular (Sagar y col., 2008).

3.1.2. Localización Subcelular

La localización subcelular de las Ds es una característica importante de estas enzimas dado que las TH son proveídas de, y eventualmente equilibradas con, el compartimento plasmático; mientras que la acción de las TH ocurre dentro del núcleo celular. Utilizando modelos celulares y la expresión endógena, se ha mostrado que la D1 y la D3 se localizan en la membrana plasmática, mientras que la D2 es una proteína residente del retículo endoplásmico (ER). Estudios en sistemas

libres de células indican que la D1 es una proteína integral de membrana con su extremo carboxilo terminal incluido el sitio activo inmersos en el citosol (Toyoda y col., 1995, Baqui y col., 2000). La D1 se encontró localizada en la membrana plasmática basolateral en células renales corticales (Leonard y col., 1991) y células tiroideas, así como en células HEK-293 que endogenamente expresan a la D1 marcada (Baqui y col., 2000). La presencia de la D1 en la membrana plasmática explica hallazgos previos de que la T_3 generada en el hígado y el riñón vía D1, se equilibra rápidamente con la T_3 plasmática, y la escasa contribución de la T_3 generada localmente en la ocupación de los receptores nucleares en dichos tejidos (Silva y col., 1978).

La D2 esta sujeta a una retención estática en el ER y no alcanza el compartimento de Golgi durante su tráfico. Así, la D2 genera T_3 en el citosol que fácilmente accede al núcleo, en virtud de la proximidad física entre el ER y el compartimento nuclear. Esto explica el mayor tiempo de residencia (horas) de la T_3 generada por la D2 cuando se compara con la T_3 que entra a la célula directamente del plasma (minutos). Sin embargo, en tejidos como el cerebro parece que hay un mecanismo más complejo que regula la entrada de la T_3 al núcleo, debido a que la D2 se expresa en células gliales y su destino final son las neuronas (Tu y col., 1997, Guadano-Ferraz y col., 1997). El extremo amino terminal de la D2 se localiza en el lumen del ER y el extremo carboxilo, incluido el sitio activo, están orientados hacia el citosol (Baqui y col., 2000).

Al igual que otras proteínas ancladas a la membrana plasmática, la D3 se internaliza y llega a ser parte de las vesículas endosomales. Mediante inmunofluorescencia, la D3 fue co-localizada con la Na,K-ATPasa α en la membrana plasmática e intracelularmente con el marcador endosomal EEA-1 y la clatrina, pero no con dos proteínas residentes del ER. Estos datos también indican que hay una constante internalización de la D3 que es bloqueada por sacarosa o metil- β -ciclodextrina. Por otro lado, células expuestas a una base suave, como es la primaquina, incrementan el *pool* de D3 que se internaliza; sugiriendo que la enzima se recicla entre la membrana plasmática y los endosomas (Baqui y col., 2003). Aunque mediante inmunocitoquímica se ha propuesto que el dominio globular de la D3 se localiza en el espacio extracelular (Baqui y col., 2003), se ha sugerido que la

catálisis es un evento intracelular. Por otro lado se ha encontrado que la coexpresión del transportador MCT8 incrementa la desyodación mediada por D3. Esto sugeriría que el sitio activo de la D3 esta en el citosol y refleja que la catálisis por D3 se da en las vesículas endosomales con MCT8 necesario para que T_3 entre a las vesículas (Gereben y col., 2008).

3.1.3. Síntesis de Selenoproteínas

Las Ds contienen selenocisteína en su sitio activo y forman parte de la familia de las selenoproteínas, en la cual se reconocen actualmente hasta 25 miembros. El triplete UGA codifica para la inserción de la Sec durante la traducción; sin embargo normalmente, este codón es leído como una señal de terminación en la síntesis de proteínas. De tal forma que son necesarios componentes adicionales para que UGA incorpore Sec. La estructura del RNAm de las selenoproteínas presenta algunas características únicas necesarias para su traducción: un codón UGA dentro del marco de lectura abierto y, a una distancia variable del codón de Sec, una estructura de tallo y asa denominada secuencia de inserción para selenocisteína (SECIS) localizada en la región 3' no traducida (3'UTR) (figura 10). En los RNAm de selenoproteínas eucariontes, la localización del elemento SECIS es variable, desde pocos hasta cientos de nucleótidos río abajo del codón UGA y el marco abierto de lectura (ORF) es terminado por el codón de paro UAA o UAG (Hofman y Berry., 2005). Algunas selenoproteínas no cumplen con esta regla, entre estas se encuentra la D2 de mamíferos en la cual un segundo codón UGA se localiza a una distancia de siete codones del triplete de paro (UAA). Este segundo UGA es capaz de dirigir la incorporación de una segunda Sec, pero este residuo o el restante extremo c-terminal de siete aminoácidos no son críticos para la actividad desyodativa (Salvatore y col., 1999).

Para la inserción de la Sec, durante la traducción, el elemento SECIS se une a la proteína SBP-2 (del ingles "SECIS binding proteína-2"). SBP-2 interactúa con el factor de elongación EFsec, promoviendo la inserción de Sec a partir de un RNA de transferencia específico (Sec-tRNA^{Sec}) por el ribosoma en el codón UGA (figura 11). En los últimos cinco años, el modelo sobre la traducción de las selenoproteínas eucariontes incluidas las Ds ha avanzado significativamente por numerosos estudios

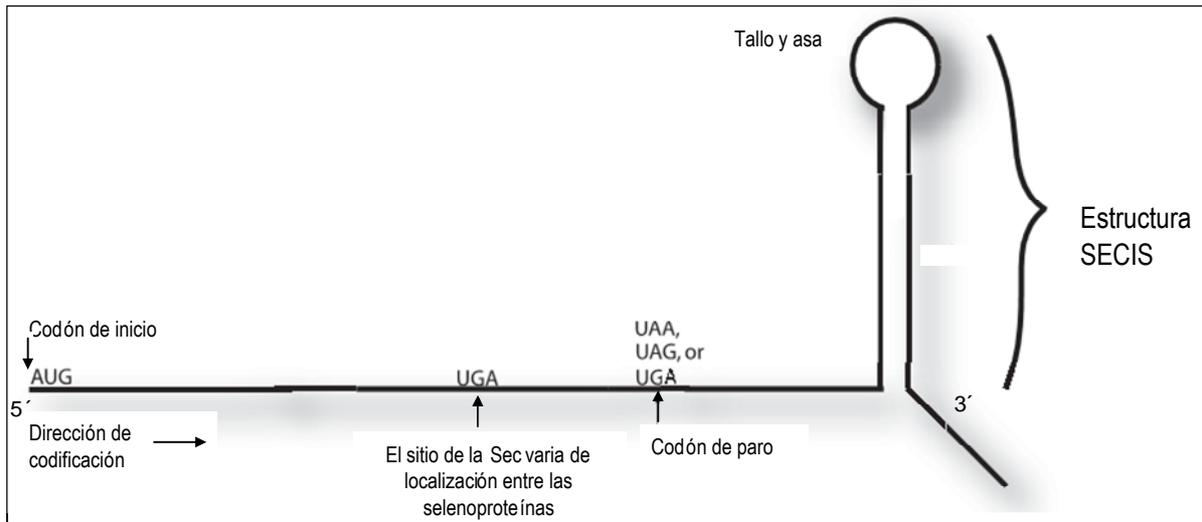


Figura 10. Estructura General del RNAm de Selenoproteínas. El codón UGA codifica para la inserción de Sec en un proceso dirigido en parte por el elemento SECIS localizado en la región 3' no traducida (UTR). La distancia entre el codón UGA, el codón de paro y el la estructura SECIS varía para los distintos RNAm de selenoproteínas (Modificado de Hoffman y Berry., 2005).

moleculares. Entre dichos avances se incluye la identificación de diversos componentes necesarios para la síntesis de Sec-tRNA^{Sec} y la identificación de otros factores proteicos cuya función se menciona más adelante. La Sec se sintetiza universalmente con su propio tRNA usando serina como intermediario. Como consecuencia el tRNA se puede designar Sec-tRNA^{[Ser]Sec}. Para generar el Sec-tRNA^{Sec} intervienen varias proteínas: una cinasa denominada PSTK (del inglés *phosphoseryl-tRNA^{[Ser]Sec} kinase*) fosforila al seryl-tRNA^{Sec} para formar O-fosfoseril-tRNA^{Sec}. Subsecuentemente la proteína SLA (*soluble liver antigen*) desfosforila al O-fosfoseril-tRNA^{Sec} de una manera dependiente de fosfato de piridoxal. Después de la desfosforilación, la forma de selenio activado generado por SPS2 (*selenophosphate synthetase*) puede ser usado para formar Sec en eucariotes (Gereben y col., 2008).

Recientemente se ha identificado la proteína ribosomal L30 como un factor adicional que se une al elemento SECIS y potencia la incorporación de Sec (Chavatte y col., 2005). Entre las nuevas contribuciones al modelo de síntesis de las selenoproteínas se encuentran algunas interacciones intermoleculares. SBP-2 contiene secuencias de localización nuclear y al parecer transita entre el citoplasma y el núcleo con EFsec. Además SBP-2 se asocia con el ribosoma, pero es incapaz

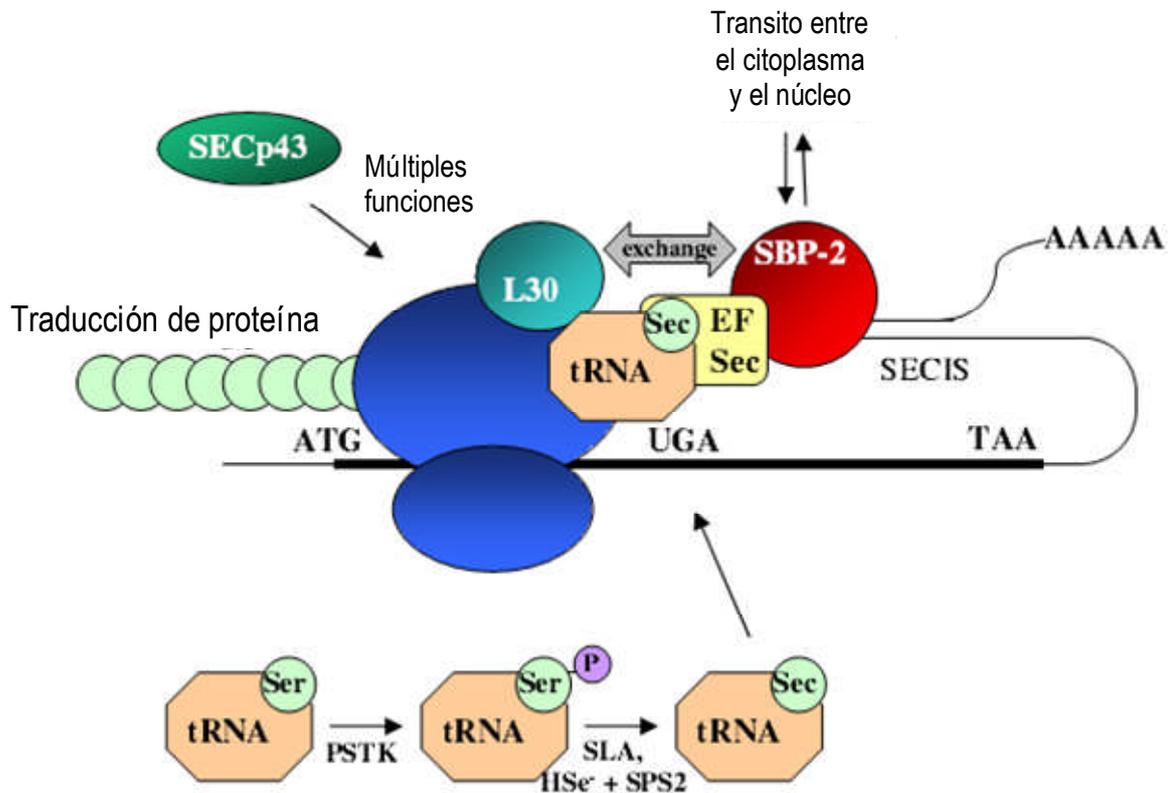


Figura 11. Síntesis de Selenoproteínas. El elemento SECIS se une a SBP-2 (proteína de unión a SECIS-2), el cual interactúa con el factor EFsec (factor de elongación específico de Sec). EFsec se une al Sec-tRNA^{Sec} y promueve la incorporación de Sec en la elongación de proteínas. L30 es una proteína que se une SECIS, que puede desplazar a SBP-2 y anclar el complejo SECIS al ribosoma. El papel de SECp43 aún no está bien definido; sin embargo, se ha mostrado que interactúa directamente con, o facilita la interacción entre, muchos componentes necesarios para la síntesis de selenoproteínas. En la parte inferior de la figura se ilustra una parte recién definida de la síntesis de selenoproteínas en mamíferos. Inicialmente, el tRNA^{Sec} es misacilado con serina, el cual es luego fosforilado por PSTK (fosfoseril-[Ser]Sec tRNA cinasa). SLA (antígeno soluble de hígado) desfosforila la serina, la cual puede aceptar el selenio activado generado por la SPS-2 (selenofosfato sintetasa-2). (Gereben y col., 2008).

de interactuar con el ribosoma y elemento SECIS simultáneamente, esto apoya el modelo donde SBP-2 unido al SECIS es desplazado por L30 (Kinzy y col., 2005). La proteína SECp43 (43 kDa Sec-tRNA^{Sec} interacting protein) coordina diversos pasos en la síntesis de selenoproteínas (Small-Howard y col., 2006), promueve interacciones entre SBP-2 y EFsec e incrementa los niveles de incorporación de Sec y los niveles de RNAm de selenoproteínas (Xu y col., 2005).

3.1.4 Bioquímica de la desyodación

La desyodación enzimática de las yodotironinas es un proceso reductivo. Las tres Ds catalizan la desyodación de yodotironinas sólo en la presencia de compuestos que contienen un grupo tiol, como el ditioneitol (DTT). Sin embargo, a la fecha no se ha identificado el cofactor natural para cada una de las Ds, aunque se ha demostrado estimulación de la actividad D1 con los sistemas glutarredoxina, tiorredoxina y dihidrolipoamina (Goswami y Rosenberg., 1983,1988, Sawada y col., 1985). Al parecer, independientemente de que las Ds se localicen en la membrana plasmática o el retículo endoplásmico, su sitio activo se orienta hacia el citosol. Este último es el único compartimento celular con un ambiente reductor (esencial para la desyodación) que contiene altas concentraciones de glutatión reducido (GSH), el tiol intracelular no proteínico más abundante, lo cual sugiere al GSH como el posible cofactor fisiológico (Kuiper y col., 2005).

En virtud del alto grado de homología entre las Ds, parece lógico asumir que desyodan a sus sustratos por un mecanismo bioquímico similar. Sin embargo, el mecanismo catalítico difiere entre ellas (tabla 1). La D1 muestra una cinética enzimática de tipo ping-pong, caracterizada por la presencia de líneas paralelas en la gráfica de Lineweaver-Burk (velocidad de desyodación contra concentración de sustrato a diversas concentraciones fijas de cofactor). Esto sugiere una reacción del sustrato o el cofactor con diferentes formas enzimáticas: la enzima nativa y un intermediario enzimático generado durante el ciclo catalítico. En contraste la D2 y la D3 muestran una cinética de reacción tipo secuencial, caracterizada por líneas convergentes en la gráfica de Lineweaver-Burk al variar concentraciones de DTT. Esto sugiere la formación de un complejo ternario enzima-sustrato-cofactor. Una de las diferencias mejor conocidas entre las tres Ds es la potente inhibición de la D1 por PTU en contraste a la escasa o nula sensibilidad de la D2 y la D3 a la inhibición por dicho agente. La importancia del residuo de Sec en la desyodación se ha hecho evidente mediante estudios de mutagénesis dirigida. El reemplazo de la Sec por Cys disminuye la actividad enzimática y si se sustituye Sec por Ser o Ala, la enzima es completamente inactivada (Kuiper y col., 2005).

Tabla 1. Características de las desyodasas de yodotironinas (Modificada de Leonard y Visser., 1986, Kuiper y col., 2005).

	D1	D2	D3
Desyodación	ORD + IRD	ORD	IRD
Sustrato preferencial	$rT_3 > T_4, T_3$	$T_4 > rT_3$	$T_3 > T_4$
Sulfatación de sustratos	Estimulación	Inhibición	Inhibición
K_m sustrato (preferencial)	μM	nM	nM
K_m cofactor (DTT, mM)	5	25	100
Mecanismo cinético	Ping-pong	Secuencial	Secuencial
Inhibidores (IC_{50} , μM)			
Propiltiouracilo (PTU)	10	>1000	>1000
Yodoacetato (IAC)	1	>1000	>1000
Tioglucoasa aurica (GTG)	0.02	1	1

3.2 Desyodasa tipo 1

La desyodasa tipo 1 fue la primera de las Ds en ser estudiada. Hasta hace poco tiempo se consideraba que la función de la D1 era producir T_3 extratiroidea para exportación a la circulación. Sin embargo, este concepto ha cambiado en los últimos años. Diversos estudios en humanos han demostrado que la D2 es la principal fuente de T_3 circulante (Maia y col., 2005) y solo en pacientes hipertiroideos la D1 juega un papel importante en la depuración de T_3 . En roedores, la D1 parece jugar un papel más importante, y los estudios con ratones *knockout* sugirieron que la D1 puede actuar balanceando las consecuencias de una función tiroidea alterada, como son la tirotoxicosis, la deficiencia de yodo y en la depuración de rT_3 (Schneider y col., 2006).

El patrón de expresión de la D1 varía entre especies. La enzima es particularmente abundante en el hígado y riñón de los vertebrados. En los mamíferos, también se expresa en la glándula tiroidea, hipófisis, glándula mamaria lactante y el intestino (Bianco y col., 2002). Se ha observado menor actividad en el músculo esquelético, el corazón, el intestino, el bazo, el pulmón, la glándula mamaria, la grasa blanca, los linfocitos, la placenta y la glándula salival (Leonard y Koehle., 2000). Notablemente, la D1 se expresa en el sistema nervioso central de la rata, pero no en humano. En el caso de otros vertebrados como los peces, la expresión de la D1 es baja (Orozco y col., 1997, 2000), se ha encontrado en el páncreas de reptiles y el intestino de aves

y mamíferos. Se pensaba que en anfibios la D1 estaba ausente, sin embargo, recientemente se identificó la expresión de la D1 durante la embriogénesis de *Xenopus* (Morvan y col., 2006).

3.2.1. Características Cinéticas/Bioquímicas

La actividad ORD de la D1 se reportó en los años 70 como una conversión de T_4 a T_3 sensible al PTU (6-n-propyl-2-thiouracil) dependiente de cofactores conteniendo un grupo tiol (Oppenheimer y col., 1972, Visser y col., 1975). La D1 es capaz de desyodar el anillo interno y externo de las HT, es decir posee actividad IRD y ORD, puede metabolizar T_4 a T_3 o rT_3 y generar $3,3'$ T_2 a partir de T_3 o rT_3 . En base al valor de la relación V_{max}/K_m como medida de la eficiencia de la reacción, la rT_3 es el sustrato preferencial de la D1, con excepción de la enzima de gato y perro (Kuiper et al., 2003, Toyoda et al., 1994). En comparación a la desyodación de la rT_3 , la eficiencia de la desyodación de la T_4 es 700 veces menor en el hígado (Visser y col., 1979) y 27 veces menor en el riñón (Leonard y Roseberg, 1980). Se desconoce cual es la causa de esta preferencia hepática y renal de la rata. La constante de Michaelis Menten (K_m) para los sustratos de la D1 se encuentra en el rango micromolar. En el hígado de rata y humano los valores reportados de K_m son de 2-4 μM para la T_4 y desde 0.06 – 0.35 μM para la rT_3 (Visser y col., 1979, 1988). Estos estudios han mostrado que el sustrato preferencial de la actividad de la D1 es: $rT_3 > T_4 > 3',5'-T_2 > 3,3'-T_2$, con K_m aparente en el rango μM . La vía IRD para T_4 y T_3 se facilita por sulfatación de dichos sustratos. La sulfatación del grupo hidroxilo fenólico bloquea la vía ORD y favorece la vía IRD de T_4 , dando como resultado una inactivación de TH por parte de la D1 (Visser, 1994). La actividad D1 presenta una cinética ping-pong; este mecanismo es característico de enzimas que existen en dos formas interconvertibles y cada forma muestra diferente afinidad por cada uno de los sustratos. En la figura 12 se muestra el mecanismo de reacción propuesto para la D1. Se sabe que sustratos análogos inhiben de manera competitiva la actividad D1. El yodoacetato (IAc) y sales de oro como la tioglucosa aúrica (ATG), ambos agentes bloqueadores de grupos sulfhidrilo, son inhibidores de la D1. Fármacos como el PTU inhiben la actividad D1 mediante la unión covalente de su grupo sulfhidrilo con la enzima. La inhibición por PTU es acompetitiva con el sustrato y competitiva con el cofactor (DTT), lo cual sugiere que el PTU y el DTT reaccionan con el mismo

intermediario enzimático generado durante la desyodación de D1, probablemente el grupo selenil-yoduro (Figura 12). Aunque la D1 es sensible al PTU, en algunos peces como el *fundulus* (Orozco y col., 2003) y la tilapia (Sanders y col., 1997) la enzima es menos sensible y en el caso de *Xenopus* no es inhibida por PTU (Kuiper y col., 2006). Esto se ha relacionado con la serina localizada en la posición 128 en todas las variantes de D1 sensibles a PTU y la prolina en las enzimas insensibles al PTU (D1 de peces), la D2 y la D3. Sin embargo, la mutagénesis sitio-dirigida en esta posición ha mostrado que este cambio de aminoácido no puede por si misma explicar la insensibilidad de la D1 de peces al PTU (Sanders y col., 1997, Orozco y col., 2003). Al parecer otros aminoácidos, que no forman parte del sitio activo, son claves para la actividad D1, la sustitución de His-158 en la D1 de rata provocó una inactivación total de la enzima, sugiriendo que este residuo es clave para la catálisis o la conformación enzimática (Berry., 1992). Otro aminoácido importante es Phe-65, el cual está conservado en varias de las D1 descritas, entre las excepciones se tienen a la D1 de perro que presenta Leu-65 y tiene una K_m para rT_3 30 veces mayor que el humano y la rata (Toyoda y col., 1994, 1997) y la D1 de *fundulus* que contiene Tyr-65 y tiene una K_m para rT_3 5 veces más baja que la enzima de rata (Orozco y col., 2003).

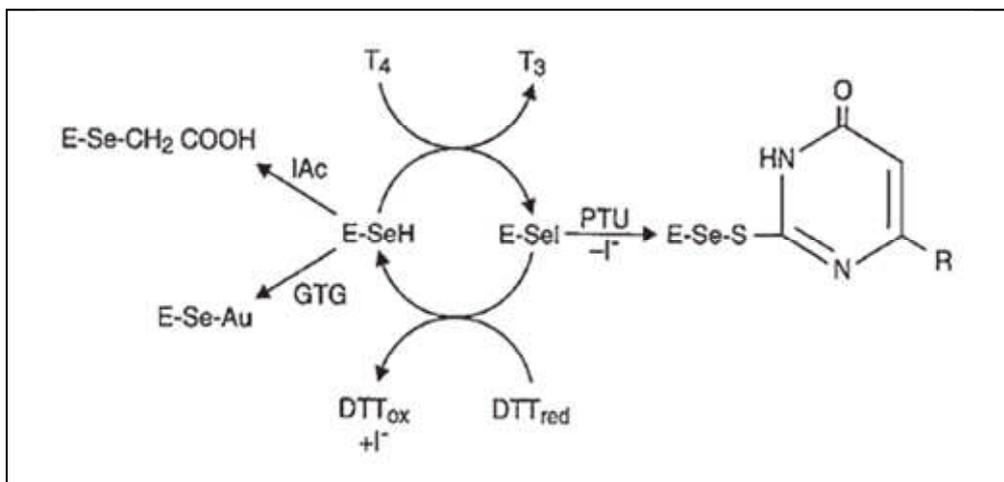


Figura 12. Mecanismo catalítico propuesto para la D1 y su inhibición por PTU, IAC y GTG. La generación de un intermediario selenilyoduro (Sel) implica que la desyodación represente una sustitución electrofílica de yodo por hidrógeno. De esta manera el yodo deja el sustrato como un ion yodinio (I^+), lo cual es asistido por el anión selenoato (Se^-), bajo la formación del intermediario enzimático Sel (Kuiper y col., 2005).

La D1 tiene un PM de ~27 kDa y contiene Sec en su sitio activo, dentro de un centro o *core* catalítico de aproximadamente 15 aminoácidos. Las modificaciones en este centro catalítico han revelado importantes características de las tres desyodasas. En el caso de la D1, la modificación Ser128Pro, hace a la enzima resistente a PTU y cambia la cinética por secuencial (Callebaut y col., 2003). La mutante Pro135Ser de la D2 tiene un incremento de dos órdenes de magnitud en la K_m para T_4 hasta 250 nM que es 10 veces menor que el que presenta la D1 para T_4 . Además comparado con la cinética secuencial de la D2 silvestre, esta mutante tiene una cinética ping-pong y se vuelve sensible a la inhibición por PTU, como la D1. En la D3, la substitución de serina por prolina en la posición equivalente, hace la cinética de la enzima similar a la D1; es decir, la K_m (T_3) aumenta 5 veces y la enzima se hace sensible a la inhibición por PTU (Callebaut y col., 2003).

3.2.2. Características Moleculares

Se conoce la estructura del gen de la D1 en el ratón (Maia y col., 1995) y el humano (Toyoda y col., 1994). El gen *dio1* humano se localiza en el cromosoma 1p32-33, es de 17.5 kb, con tres intrones de 10.1, 1.3 y 3.9 kb y 4 exónes. El codón UGA para Sec se localiza en el exón 2 y el codón UGA de paro y el elemento SECIS en el exón 4 (Jakobs y col., 1997). En la región 5' el gen presenta 2 elementos responsivos a hormonas tiroideas (TREs) responsables de su regulación transcripcional. El gen *dio1* esta bajo el control de un promotor rico en GC al que se une el factor SP1, no presenta la caja TATA o la caja CAAT. El TRE-2 es un repetido directo DR+4 separado 4 pb de los sitios de unión a RXR-T3-TR, lo cual hace a la D1 responsiva a T_3 y al ácido retinoico. Por otro lado, el TRE-1 es un elemento cis-actuante inusual en el cual dos sitios octaméricos de unión a TR están separados por 10 pb; a este tipo de TRE se une TR pero no RXR (Zhang y col., 1998).

El RNAm (2 kb) de la D1 fue el primero de las 3 desyodasas en ser clonado (Berry y col., 1991). A la fecha se han clonado los de *Fundulus*, tilapia, *Xenopus*, pollo, perro, ratón, ardilla, rata y humano presentando una identidad del 74% a nivel de nucleótidos. El tamaño promedio de estos RNAm es de 2 a 2.1 kb (Berry y col., 1991, Maia y col., 1995, Mandel y col., 1992, Sanders y col., 1997, Toyoda y col.,

1994, van der Geyten., 1997), siendo el de *Fundulus* el de menor tamaño (1.3 kb) (Orozco y col., 2003). Recientemente se han reportado las secuencias para cerdo (Wassen y col., 2004), pez cebra (Walpita y col., 2007), la secuencia parcial de los teleósteos, *Gabiocypris rarus* (Li y col., 2009), *Gillichthys seta* y *Gillichthys mirabilis* (Bucciarelli y col., 2009). La D1 de rata es codificada por al menos dos transcritos que varían en la longitud del 3'UTR; sin embargo no es claro su papel (Aceves y col., 1999a, 1999b). La secuencia de nucleótidos en el RNAm del elemento SECIS, tiene una identidad del 51% y la estructura secundaria predicha es de forma 1, excepto el de *Fundulus*, que presenta una forma 2. En la región 3'UTR de la D1 de humano se han identificado dos SNPs (*single nucleotide polymorphisms*): D1a-C/T en posición 785 y D1b-A/G en posición 1814. El RNAm maduro es de 2.2 kb con una secuencia codificante de 750 pb. Estos polimorfismos se han asociado con algunos efectos en la expresión y actividad de la D1 (Peeters y col., 2003).

3.2.3 Regulación

La síntesis y actividad de la D1 varía dependiendo de las demandas fisiológicas así como del órgano, la especie y el ambiente hormonal del individuo (Valverde-R y col., 2004). El gen *dio1* es estimulado por T₃ debido a la presencia de dos TREs en su promotor. El hipertiroidismo incrementa la actividad y transcripción de la D1, mientras que el hipotiroidismo tiene el efecto opuesto. En la regulación de *dio1* participan otras vías de señalización. Por ejemplo, en la rata, el AMPc estimula la transcripción del gen de manera sensible a T₃, pero el mecanismo de esta estimulación no se ha resuelto. Aunque los datos aún no son muy claros, se sabe que la D1 también se regula por glucocorticoides. Estudios in vitro en hepatocitos de rata han mostrado que los glucocorticoides inducen la expresión del RNAm y la actividad D1 (Davies y col., 1996); por otro lado, en fetos de ovejas tratadas con dexametasona la actividad D1 hepática aumenta (Forhead y col., 2007). Sin embargo, en embriones de pollo, el tratamiento con dexametasona, no alteró la actividad D1 hepática o el nivel del RNAm (Van der Geyten y col., 2001). Varias citocinas exhiben un efecto inhibitorio en la expresión de la D1 en células hepáticas y tiroideas (Gereben y col., 2007). Sin embargo, en células pituitarias al parecer tienen un efecto opuesto y estimulan a la enzima (Baur y col., 2000).

3.3 Desyodasa tipo 2

Las células que contienen D2, producen localmente T_3 que accesa más rápido a los receptores nucleares, que la T_3 proveniente del plasma. La D2 juega un papel crucial al regular los niveles de T_3 intracelular, lo cual es especialmente significativo en el cerebro, donde la producción de T_3 mediada por D2 es responsable de la producción de más del 50% de la T_3 nuclear en la corteza de la rata (Crantz y col, 1982). Por otro lado, en humanos eutiroideos la T_3 generada por la D2 es la mayor fuente de T_3 plasmática (Maia y col., 2005). La generación de un ratón knockout para el gene *dio2* (Schneider y col, 2001) abrió el camino para realizar estudios sobre el papel fisiológico de la enzima. El ratón exhibe un fenotipo con capacidad reproductiva inalterada, el crecimiento se retrasa ligeramente en ratones machos entre 4 y 7 semanas observándose diferencias en el peso corporal respecto al ratón normal (9%), pero el retraso es transitorio. También presenta un retardo en el desarrollo posnatal de la coclea, resultando una función auditiva alterada en el adulto. El daño auditivo puede disminuir tratando a las crías con T_3 . El modelo tiene elevados niveles circulantes de T_4 y TSH y resistencia hipofisiaria a T_4 . Así se mostró la relevancia de la D2 en la regulación por retroalimentación de la secreción de TSH, el contenido de T_3 en el cerebro (Galton y col., 2007) y la termogénesis adaptativa (de Jesus y col., 2001).

La actividad D2 está ampliamente distribuida en los tejidos de los vertebrados. En mamíferos, la enzima se expresa en la hipófisis, cerebro y tejido adiposo pardo, gónadas, glándula pineal, timo y glándula mamaria (Bates y col., 1999, Song y col., 2000, Galton y col., 2001, Bianco y col., 2002). La expresión de la D2 tiene características especie-específicas. A diferencia de la rata, la D2 es la única enzima de la vía ORD en el SNC humano y su RNAm se expresa en el corazón y el músculo esquelético (Campos-Barros y col., 1996). La expresión de D2 en tiroides es más abundante en el humano que en la rata (Gereben y col., 2001). Por otro lado, resulta muy interesante que la D2 no se expresa en el hígado de humano o rata (Salvatore y col., 1996), pero está presente en el hígado de pollo (Gereben y col., 1999) y peces teleosteos (Valverde y col., 1997). Una diferencia funcional entre la D1 y la D2, es que la D2 exhibe un ritmo circadiano, lo cual se ha reportado en diversas estructuras neuroendócrinas (Kamiya y col., 1999, Luna y col., 1995, Valverde y col., 2004).

3.3.1 Características cinéticas/bioquímicas

Originalmente, la existencia de la D2 fue sugerida por la presencia de actividad T_4 ORD insensible al PTU en la hipófisis de la rata. La enzima cataliza el primer paso en la acción de las TH al convertir T_4 a T_3 , también cataliza la conversión de T_3 a $3,5-T_2$ y rT_3 a $3,3'-T_2$. Bajo condiciones *in vitro* similares, la K_m para T_4 esta en el intervalo nanomolar, casi 1000 veces menor que el de la D1 (Visser y col., 1982); la rT_3 también es un buen sustrato pero menos favorecido que T_4 . La enzima requiere un cofactor endógeno reducido y aunque la identidad de dicho cofactor *in vivo* es desconocida, el DTT funciona eficientemente *in vitro*. La D2 es mucho menos sensible a la inhibición por ATG y IAc que la D1. En relación al mecanismo catalítico, hay diferencia entre la D1 y la D2. Mientras que la vía ORD para la T_4 por parte de la D1 muestra una cinética bisustrato ping-pong, la D2 exhibe una cinética de reacción secuencial, sugiriendo que la T_4 y el cofactor que contiene un grupo tiol deben interactuar con la enzima simultáneamente antes de que la reacción tenga lugar (Visser y col., 1982, Goswami y Rosenberg., 1986). La D2 es una proteína de 31 kDa con un residuo de Sec altamente conservado en el sitio activo. La sustitución de cisteína por Sec, incrementa la K_m para T_4 aproximadamente tres ordenes de magnitud e incrementa la traducción de la enzima hasta 100 veces (Buettner y col., 2000).

3.3.2 Características moleculares

La estructura del gen de la D2 se ha elucidado en humano (Celi y col., 1998), ratón (Davey y col, 1999) y *Fundulus* (Orozco y col., 2002). En el humano, el *dio2* de copia única contiene múltiples sitios de inicio de la transcripción y se localiza en el brazo largo del cromosoma 14 en la posición 14q24.3. En todos los casos el gen esta constituido por dos exones separados por un intrón. El segundo exón contiene el codón TGA que codifica para Sec, el elemento SECIS y la señal de poliadenilación. Hay algunas diferencias en la región 5' del gen que pueden ser de relevancia filogenética. Por ejemplo, en *dio2* humano se encuentran las cajas TATA o CCAAT, las cuales no están presentes en el gen homólogo de *Fundulus*. Además, los genes de humano, rata y ratón contienen un elemento responsivo a cAMP (CRE) localizado 70 pb rio arriba de la caja TATA, mientras que el gen de *Fundulus* no

contiene secuencia CRE. Solamente el *dio2* humano es estimulado por el factor de transcripción tiroideo 1 (TTF-1) (Gereben y col., 2001); se han descrito sitios de unión a otros factores como Nkx-2.5, Ap-1 y NF- κ B (Dentice y col., 2003, Zeold y col., 2003). Todas estas observaciones pudieran explicar la expresión diferencial del *dio2* en las diferentes especies de vertebrados (Valverde y col., 2004).

A la fecha se conoce la secuencia de cDNA que codifican para la D2 en diferentes especies: humano (Buettner y col., 1998), rata (Gereben y col., 2001), ratón (Davey y col., 1999), pollo (Gereben y col., 1999), rana (Davey y col., 1995), trucha (Sambroni y col., 2001), *Fundulus* (Orozco y col., 2002), pez pulmonado (Sutija y col., 2003), cerdo (Wassen y col., 2004), vaca (Connor y col., 2005), *Fugu rubripes* (NCBI referencia NM_001136145.1). Se han reportado secuencias parciales para la D2 en el pez cebra (Walpita y col., 2007), en el pez de agua dulce *Gobiocypris rarus* (Li y col., 2009); así como secuencias putativas para D2 en *Solea senegalensis* (GenBank: AM902723.1). El RNAm de la D2 es de los más grandes descritos en vertebrados, con 7.5 kb en humano y rata, 8 kb en ratón, 6 kb en pollo, el más pequeño descrito es el de *Fundulus* con 4.7 kb. Entre las Ds, los RNAm de la D2 son los más conservados con un 77% de identidad en la secuencia de nucleótidos del marco de lectura abierto (ORF de ingles "open reading frame"). La estructura de los RNAm de la D2 comprende un ORF de 1 kb, una región 5' no traducida entre 600-700 pb y una región 3' no traducida (-3'UTR) muy larga de aproximadamente 5 kb, donde se localiza el elemento SECIS a una distancia de aproximadamente 250 pb antes de la señal de poliadenilación. En todos los casos la estructura secundaria predicha para el elemento SECIS es de forma 2. Al parecer la larga y estructurada región 5' UTR de la D2, que contiene diversos ORF cortos, disminuye la eficiencia de su traducción (Gereben y col. 2002). Por otro lado, el RNAm de la D2 tiene una vida media corta (hr) y probablemente la región 3'UTR contribuye a esto, a través de los numerosos repetidos AUUUA que lo hacen inestable (Gereben y col, 2002).

El RNAm de la D2 esta sujeto a splicing alternativo, lo cual puede afectar la región 5'UTR o la región codificante en la tiroides humana. En diversas líneas y tejidos celulares como cerebro humano, pulmón, riñón, corazón y traquea, se ha reportado *splicing* limitado en la región codificante en los que se presenta una

inserción de 108 o 242 pb de fragmentos genómicos del intron de la D2 (Bartha y col., 2000, Gereben y col., 2002, Ohba y col., 2001). En el hígado y cerebro de pollo se ha identificado una variante que presenta una delección de 77 pb en la región codificante (Gereben y col., 2002). En la coclea del ratón se encontró una variante con la región codificante truncada seguida por la región 3' UTR (Campos-Barros y col., 2000). Las variantes que presentan *splicing* en la región codificante no expresan una enzima activa y su papel en la regulación de la D2 aún es desconocida. Se han descrito numerosos polimorfismos para el gen de la enzima y algunos se han asociado con diversos cuadros clínicos (Gereben y col., 2007).

3.3.3 Regulación

El homodímero de la D2 es una oxidorreductasa muy activa, que está bajo un complejo control transcripcional y postranscripcional. Al igual que la D1, diversos factores neuroendocrinos y otras condiciones fisiológicas pueden influir sobre la actividad y expresión de la D2. Al parecer el principal factor que controla la actividad D2 a nivel pre- y postranscripcional es el estado tiroideo. El hipertiroidismo suprime la actividad y expresión del RNAm de la D2, mientras que el hipotiroidismo los incrementa (St. Germain., 1988, Burmeister y col., 1997). El efecto de la T₃ en el promotor del gen *dio2* es transcripcional. El mecanismo molecular que explique esta regulación pretranscripcional de la D2 por sustrato no se conoce aún. En este contexto la presencia de un TRE negativo en el gen se ha inferido, aunque no se ha identificado (Bianco y col., 2002).

Diversos factores son capaces de modular *in vitro* y/o *in vivo* la velocidad de transcripción del *dio2* (Gereben y Salvatore., 2005). Se ha sugerido que el gen se regula a través de una vía mediada por cAMP, lo cual es apoyado por la presencia de un CRE en la región 5' (Bartha y col., 2000). Los glucocorticoides afectan la expresión de la D2 a nivel transcripcional. Así, en células tumorales hipofisarias, la dexametasona aumenta el RNAm (Kim y col., 1998); y en astrocitos de rata el cortisol aumenta la actividad D2 (Courtin y col., 1989). En contraste, en células de neuroblastoma de ratón la dexametasona disminuye la actividad (St. Germain, 1986), sugiriendo que el efecto de los glucocorticoides en la expresión de la D2 es célula-específico. El factor de transcripción tiroideo, *TTF-1* induce la transcripción del

gen, a través de dos sitios de unión al DNA que están presentes en el *dio2* humano pero no en la rata (Gereben y col., 2001). Se ha observado regulación de la expresión D2 mediada por proteína cinasa-c, que es específica del tipo celular, debido a que el ester de forbol disminuye el RNAm de la D2 en células tiroideas humanas en cultivo, pero lo aumenta en células gliales (Imai y col., 2001). Por otro lado, en la rata, la administración sistémica de lipopolisacaridos bacterianos, induce el RNAm y expresión de la D2 en el hipotálamo (Boelen y col., 2004). En el humano, la expresión cardiaca del gen *dio2* al parecer esta controlada por dos factores de transcripción: *Nkx-2.5* y *GATA-4* (Dentice y col., 2003).

El mecanismo postranscripcional por el que las hormonas tiroideas regulan a la D2 se ha elucidado parcialmente. La vida media de la proteína D2 es corta (~40 min) y se desestabiliza pos sustrato, disminuyendo aún más en células expuestas a T_4 , rT_3 y T_3 (St.Germain, 1988). Se ha sugerido que la interacción enzima-sustrato induce proteólisis del complejo y que el proceso es mediado por ubiquitina (Steinsapir y col., 1998, Gereben y col., 2000). Recientemente se ha mostrado que en células que expresan a la D2, el dímero se asocia con diversas proteínas como WSB-1 (proteína inducible Sinic hedgehog (Ssh)), UBC-7 (ubiquitin conjugasa) y USP-33 (desubiquitinasa), y que la ubiquitinación mediada por sustrato desestabiliza al dímero, funcionando como un “switch” que regula la actividad enzimática (Vivek Sagar y col., 2007).

3.4 Desyodasa tipo 3

La D3 es la principal enzima que inactiva a las TH, convirtiendo a la T_4 y a la T_3 en sus derivados sin actividad biológica, rT_3 y $3,3'$ - T_2 , respectivamente. El principal papel fisiológico de la D3 es contribuir a la homeostasis de TH protegiendo a los tejidos de la exposición a un exceso de TH activa. Lo cual es importante particularmente durante el desarrollo temprano, un periodo en el que la D3 se expresa predominantemente y su actividad es mucho mayor que en tejidos adultos. Empleando modelos animales fetales y neonatales, así como en la metamorfosis de los anfibios, se ha mostrado que la expresión de la D3 se regula de manera tejido específica. Los patrones de expresión, sugieren que la D3 juega un papel muy importante durante el desarrollo, al prevenir a los tejidos fetales de una exposición

prematura de niveles inadecuados de T_3 . Además, en mamíferos gestantes el útero y la placenta expresan altos niveles de D3, lo cual limita la transferencia de TH circulantes maternas al embrión (Santini y col., 1999, Galton y col., 1999, Huang y col., 2003). Poco se sabe en relación al papel fisiológico de la D3 en mamíferos adultos.

La D3 se expresa en el SNC de todas las especies de vertebrados estudiadas hasta la fecha (Kaplan y col., 1980, Valverde-R y col., 1993, Mol y col., 1998, Tu y col., 1999). Durante la etapa embrionaria de diversas especies (rata, pollo, humano), el RNAm o la proteína se ha detectado en tejidos como gónadas, pulmón, corazón, intestino y piel (van der Geyten y col., 1997, van der Geyten y col., 2001, Bates y col., 1999, van der Geyten y col., 2002, Huang y col., 2003). Una alta expresión se ha encontrado en hígado embrionario de humano (Richard y col., 1998), pollo (Valverde y col., 1993) y reptiles (Shepherdley y col., 2002). La expresión en piel también se ha reportado en rata, ratón (adulto y embrión), y en peces (Schroder-van der Elst y col., 1998, Dentice y col., 2007, Fenton y col., 1997). En el cerebro de la rata adulta se ha identificado RNAm de la D3 (Tu y col., 1999). La expresión de la D3 se ha encontrado en tejido adiposo donde se ha asociado con la diferenciación de preadipocitos (Hernandez y col., 2007).

Un modelo de ratón knockout generado mediante inactivación de la proteína D3 (D3KO) por mutación crítica, exhibe letalidad parcial que ocurre antes o en el nacimiento, esto es sugerido debido a que de 344 nacimientos producidos de padres heterocigotos solo 61 (17.5%) fueron knockout. Ratones D3KO machos y hembras presentaron un marcado retraso en el crecimiento, dicha reducción en el tamaño persiste en la edad adulta. La longitud del cuerpo es casi proporcional al peso (Hernandez y col., 2006). El modelo D3KO también permitió identificar el papel crítico de la D3 en la maduración y función del eje tiroideo (Hernandez y col., 2002, Hernandez y col., 2006)

3.4.1 Características cinéticas/bioquímicas

La actividad D3 fue identificada inicialmente en la línea celular NCLP-6E de hepatocarcinoma (Sorimachi y Robbins, 1977). La enzima cataliza la remoción de yodo en el anillo interno de T_4 y T_3 con un valor de K_m en el intervalo nanomolar,

sigue una cinética de reacción secuencial y es insensible a la inhibición por PTU. La D3 es una selenoproteína de 33 kDa con un residuo de Sec en el sitio activo. Los estudios para investigar el papel de la Sec en la D3, han mostrado que el reemplazo de Sec por alanina inactiva la enzima y la sustitución por cisteína no elimina la actividad D3, pero incrementa la K_m , 5 veces para T_3 y 100 veces para T_4 , comparado con la enzima nativa (Kuiper y col., 2003).

3.4.2 Características moleculares

La secuencia de los *genes* que codifican para la D3 se conoce en ratón y humano y ambos muestran, como característica singular, la ausencia de intrones (Hernández y col., 1998, 1999). La región promotora del gen contiene una caja TATA, dos cajas CAAT y diversas cajas GC. Se identificó un potenciador o *enhancer* conservado de 180 pb de longitud a una distancia de ~6 kb del sitio de inicio de la transcripción. Esta región contiene un sitio consenso denominado AP-1 y un elemento responsivo al suero (Hernández y col., 2003). En el humano, el gen *dio3* se localiza en el cromosoma 14q32 y el ratón en el cromosoma 12F1 (Hernández y col., 1998). Los genes de humano y ratón se han mapeado en regiones cromosómicas que se sabe incluyen genes que presentan “imprinting”; el *dio3* se expresa preferencialmente del alelo paterno (Hernandez., 2005). El análisis de la región genómica de *dio3* condujo a la identificación de un gen adicional designado *dio3* de hebra opuesta (*dio3os*), el cual se transcribe en la orientación antisentido (Hernandez y col., 2002). La secuencia de los múltiples transcritos de *dio3os* que se han descrito de al menos seis exones y dos sitios de poliadenilación alterna y muestra un patrón de expresión tejido específico (Hernández y col., 2004). La expresión del gen *dio3* genera un transcrito de 2.1 kb; sin embargo, se han detectado transcritos más largos en el cerebro de la rata hipertiroidea adulta (Salvatore y col., 1995, Gereben y col., 2007).

En cuanto al cDNA que codifica para la enzima, se han clonado en humano (Salvatore y col., 1995), rata (Croteau y col., 1995), pollo (van der Geyten y col., 1997), rana (Becker y col., 1995), *Xenopus* (St. Germain y col., 1994), tilapia (Sanders y col., 1999), pez pulmonado (Sutija y col., 2004), trucha (Bres y col., 2006, cerdo (Wassen y col., 2004), vaca (Connor y col., 2005), pez globo *Carassius*

auratus (Nelson y Habibi., 2008), wallaby (*Macropus eugenii*) y ornitorrinco (*Ornithorhynchus anatinus*) (Edwards y col., 2008). Existen también secuencias putativas para *Solea senegalensis* (GenBank: AM902722.1). Todos los cDNA clonados a la fecha incluyen un codon TGA para Sec y el elemento SECIS en la región 3'UTR. La conservación de la D3 es la más baja de las tres Ds, con un 43% de identidad entre las secuencias de D3 de diversos organismos a nivel de nucleótidos en el ORF (Valverde y col., 2004).

3.4.3 Regulación

La expresión del gen *dio3* se regula *in vivo e in vitro* por diversos agentes. Los cambios en el nivel del RNAm y la actividad D3 se correlacionan, lo cual sugiere que los cambios en la expresión de *dio3* son el resultado de cambios en la transcripción génica. El estado tiroideo modula la actividad de la enzima en diversos tejidos, especialmente en le SNC; la actividad D3 incrementa durante el hipertiroidismo y disminuye durante el hipotiroidismo (Kaplan y Yaskoski, 1980). El tratamiento con T₃ de corto tiempo (8 días) aumenta el RNAm de la enzima; sin embargo no es claro si este efecto es consecuencia de transcripción génica, estabilización del RNAm o una combinación de ambos factores (Tu y col., 1999). Se sabe que la T₃ estimula la expresión de la enzima antes de climax metamórfico en renacuajos de *X.leavis* (Marsh-Armstrong y col., 1999). En diferentes modelos de cultivo celular, la expresión de la enzima se regula por la acción de suero, esteroides de forbol y factores de crecimiento epidérmico y de fibroblastos (EGF, FGF) (Hernández y Obregón; 1995, Hernandez y St Germain; 2002b). En el promotor del *dio3* no se han encontrado elementos de respuesta específicos responsables de los efectos estimulantes. Sin embargo, se ha propuesto que la respuesta a estos estímulos es mediada por una o ambas cajas CAAT presentes en el promotor basal (Gereben y col., 2007). Los glucocorticoides y la hormona de crecimiento (GH) afectan la expresión de D3. En el hígado del embrión de pollo, la dexametasona y la GH disminuyen la expresión de D3, seguido por un incremento en los niveles séricos de T₄ y T₃, sugiriendo que la enzima hepática regula los niveles de TH en el suero (Van der Geyten y col., 1999). En la línea celular BVS-1 de rata (grasa parda vasculo-estromal), la dexametasona suprime la expresión basal de la D3 y previene su inducción por suero y factores de crecimiento (Hernández y St Germain, 2002b). En

diversos tipos celulares humanos, incluidos fibroblastos fetales y adultos de diversos tejidos, células de hemangiomas y epitelio fetal, TGF- β induce la D3 endógena (Gereben y col., 2007). Por otro lado, en células humanas no transformadas, se ha mostrado que TGF- β estimula la transcripción del *dio3* a través de la vía Smad-dependent (Huang y col., 2005). Estos datos revelan la interacción entre TGF- β y TH, los cuales tienen funciones importantes en la regulación del crecimiento y diferenciación celular. La expresión de D3 en la piel se regula de manera positiva por Gli2, un miembro de la familia de factores de transcripción Gli (son los encargados de modular la señalización de la vía Shh). En este sentido se ha identificado un sitio de unión a Gli-2 en el promotor del gen *dio3* de humano y ratón, que es crítico para la respuesta de *dio3* a Gli-2 en queratocitos transfectados (Dentice y col., 2007).

3.5 Filogenia de las desyodasas

Aunque pueden diferir con respecto a su distribución tisular, perfil ontogenético y otros aspectos operacionales (preferencia por sustrato y perfil de inhibición), las tres isoenzimas se han caracterizado en las cinco clases de vertebrados. Por otra parte y no obstante que algunas clases están aun sub-representadas, las secuencias de los cDNAs y de sus proteínas deducidas; así como las de algunas desyodasas putativas encontradas en los genomas de organismos invertebrados, han permitido realizar análisis filogenéticos y proponer la posible trayectoria evolutiva de esta familia enzimática. Así, utilizando las secuencias de vertebrados (figura 13), se ha sugerido que la D2 es la desyodasa de más reciente aparición y que la D3 es la más antigua (Valverde-R y col., 2004). Mas aún, algunos invertebrados urocordados como la ascidia *Halocynthia roretzi*, expresan una desyodasa (hrDx) que comparte características cinéticas con la D1 y la D2 de vertebrados (Shepherdley y col., 2004). La disponibilidad de los genomas de otras especies de ascidias como *Ciona intestinalis* y *Ciona savignyi* ha permitido identificar dos secuencias homólogas a hrDx. Estos hallazgos sugieren que las ascidias poseen una desyodasa semejante a D3, además de D1 y D2. El análisis filogenético con las secuencias de vertebrados e invertebrados se resuelve en cuatro clusters o ramas principales, uno para cada isotipo de las Ds de vertebrados y el

restante en una rama separada, cercana al origen, que agrupa a las desyodasas putativas de invertebrados (Kuiper y col., 2005).

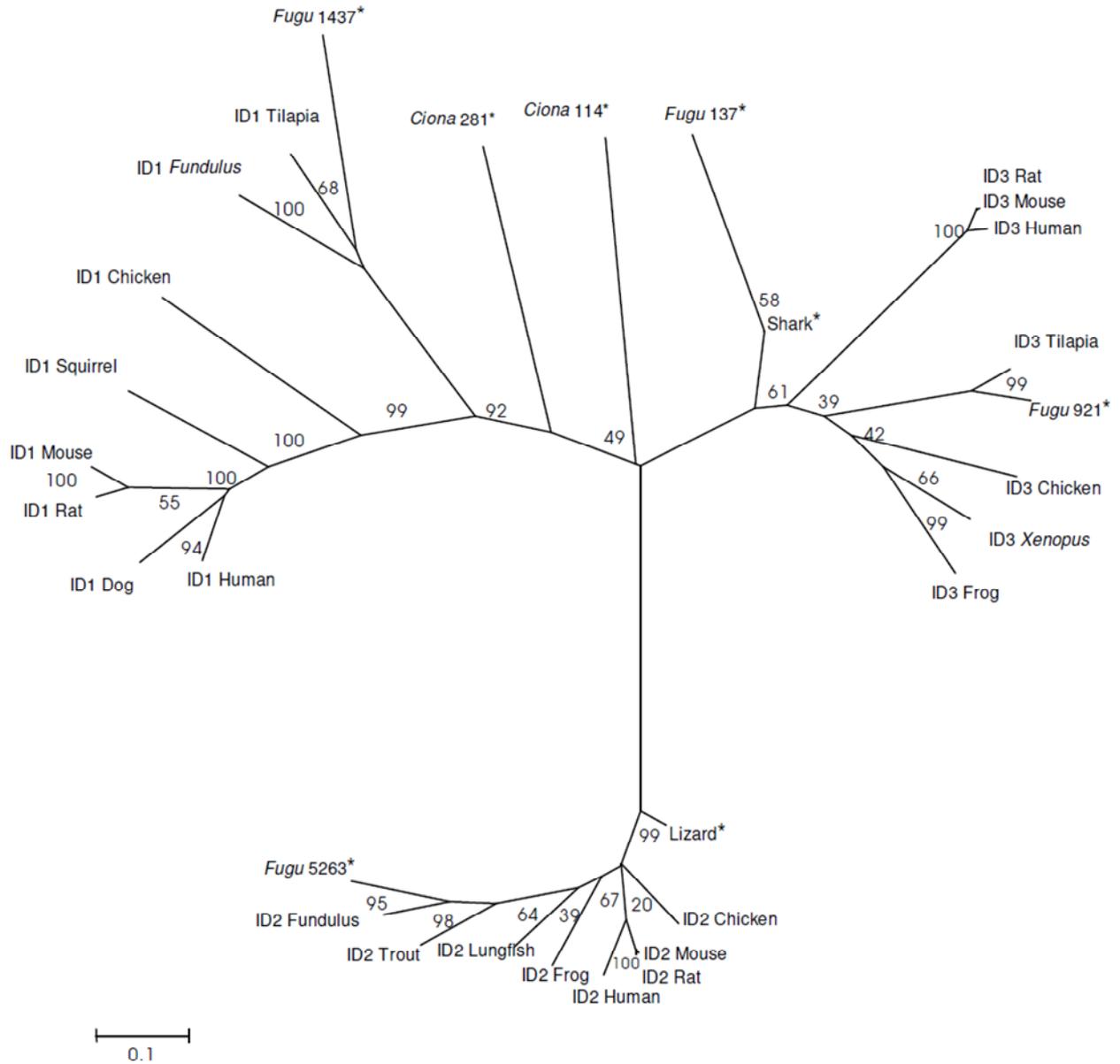


Figura 13. Filogenia de las desyodasas de yodotironinas de vertebrados (Tomada de Valverde-R y col., 2004).

4. LA DESYODACIÓN EN PECES

Antes de abordar la desyodación en peces, aquí se revisaran algunos aspectos relevantes acerca de la fisiología tiroidea en esta clase de vertebrados.

En contraste a lo reportado para el resto de vertebrados, varios estudios han mostrado que la glándula tiroidea de los peces secreta primordialmente T_4 . Las evidencias experimentales son: 1) los extractos de tiroides de trucha y otros teleósteos contienen niveles muy bajos de T_3 (Kühn y col., 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 y Eales.,1975, Inui y col.,1989) y 3) en tejido tiroideo perfundido *in vivo* no hay liberación de T_3 en presencia o ausencia de TSH (Grau y col., 1986). La secreción primordial de T_4 y los elevados niveles de T_3 circulante en peces que resultan en una proporción T_3/T_4 alta, hacen de la desyodación periférica el principal mecanismo responsable de la producción de hormona tiroidea activa.

La existencia de la desyodación en peces fue reportada por Osborn y Simpson desde 1969. Estos investigadores encontraron los diferentes productos derivados de la monodesyodación secuencial de T_4 en el plasma del lenguado. Posteriormente se demostró la desyodación *in vivo* en varios peces de agua dulce (Eales, 1972).

Las Ds de peces comparten propiedades moleculares y operacionales con sus contrapartes vertebrados; sin embargo, presentan algunas características distintivas, como los altos niveles de actividad D2 en el hígado de teleósteos y la baja sensibilidad de la D1 a la inhibición por el inhibidor propiltiouracilo (PTU) (Orozco y Valverde-R, 2005; Orozco *et al.*,1997). A continuación se describen algunos datos sobre la desyodación en las tres subclases de peces: agnatos, óseos y cartilagosos. Cabe señalar que aunque los peces cartilagosos son más antiguos que los óseos se abordan al final para facilitar la la lectura del trabajo.

4.1 Agnatos

Los agnatos o peces sin mandíbulas, son los vertebrados más primitivos. Se separan en dos grupos: los *hagfishes* o Myxinooids y las lampreas o

Petromyzontiforms. Los *hagfishes* se consideran los craneados más ancestrales cuya historia evolutiva se remonta al periodo Ordovícico (~470 Ma) y actualmente se reconocen cerca de 60 especies. En cuanto a las lampreas se sabe de cerca de 40 especies distintas. Todas las especies de *hagfishes* son estenohalinas y viven en el océano, generalmente en regiones cálidas por abajo de los 2000 metros de profundidad. Son los únicos vertebrados acuáticos en los que los fluidos del cuerpo son isosmóticos con el agua de mar, considerándose como osmoconformadores. No tienen estados larvarios y su desarrollo es directo. Por otro lado, todas las especies de lampreas son osmorreguladoras, frecuentemente eurihalinas. Pueden vivir en agua dulce o en el mar, aunque las especies marinas son animales anádromos, esto es, viven en el mar pero remontan ríos o corrientes de agua dulce para reproducirse (Randall y col., 1997). Las lampreas son parásitas de peces, aunque algunas especies son no parásitas.

La desyodación periférica en agnatos se ha estudiado muy poco y aún no se cuenta con la caracterización bioquímica completa de las Ds. Uno de los primeros informes sobre la conversión *in vivo* de T_4 a T_3 en la lamprea marina adulta *Petromyzon marinus* apareció en la década de los 80 (Brown y col., 1982). Posteriormente, en homogenados hepáticos, se reportó actividad T_4 -ORD con una K_m en el rango nanomolar (Leatherland., 1994). Otras vías desyodativas (T_4 -IRD, T_3 -IRD) se han estudiado en *P. marinus* en estado larvario y adulto (Eales y col., 1997) y en *hagfishes* (McLeese y col., 2000). En general la desyodación periférica ocurre en diversos tejidos como el intestino, hígado, cerebro, músculo y riñón de lampreas y hagfish adultos, y en las lampreas esto varía de acuerdo al estado ontogenético. En contraste a otros vertebrados, donde el hígado es el principal sitio de desyodación, en lampreas la mayor actividad desyodativa se detectó en el intestino (Eales y col., 1997). En estos estudios se observaron diferencias operacionales en relación a la sensibilidad al PTU en la actividad T_4 -ORD intestinal entre lampreas y *hagfishes*. Por otro lado, las propiedades operacionales de la vía T_4 -ORD y T_3 -IRD intestinal de lampreas, caracterizadas parcialmente, muestran valores de K_m y V_{max} aparentes de 1.25 nM y 0.32 pmol/mg/h y 1.3 nM y 0.35 pmol/mg/h, valores que corresponderían a la actividad D2 y D3 respectivamente. De esta manera, los agnatos presentan las vías desyodativas ORD e IRD al igual que el resto de vertebrados (Orozco y Valverde., 2005).

4.2 Óseos

Las TH en peces participan en el control del metabolismo, desarrollo, crecimiento y osmorregulación. Por ejemplo en huevos no fecundados de peces se han encontrado TH de origen materno, las cuales posteriormente juegan un papel importante en el desarrollo temprano del embrión (Evans, 1993). Se sabe que las TH en peces son las responsables de disparar la conducta migratoria y el control de la respuesta adaptativa al agua salada y dulce en salmónidos. Los niveles de T_4 circulante aumentan durante la esmoltificación (conjunto de cambios morfológicos, fisiológicos y conductuales preparatorios para la migración anadromica o río abajo), seguido de un aumento en la actividad Na^+/K^+ -ATPasa branquial (Grau y col., 1981, Dickhoff y col., 1978). Durante la migración catadromica o río arriba (asociada con la reproducción), se observa un aumento significativo de T_3 y T_4 en ambos sexos (Biddiscombe y Idler, 1984, Sower y Schreck, 1982).

La desyodación en peces óseos ha sido ampliamente estudiada en salmonidos desde la década de los setenta por los grupos de Eales y Leatherland, trabajos a partir de los cuales solo se aceptaba la existencia de la vía ORD para la T_4 (Higgs y Eales., 1977, Eales y col., 1991, Eales., 1979, Shiel y Eales., 1986, Pimlott y Eales., 1983). Estudios *in vitro* en más de treinta especies de teleósteos confirmaron la presencia de la vía ORD hepática de la T_4 con valores de K_m en un intervalo de 1-170 nM (Leatherland y col., 1990). A partir de ese momento surgieron una serie de controversias en relación a las características bioquímicas de las desyodasas en teleósteos, haciendo confusa la identificación del isotipo enzimático participante en la vía ORD. La presencia de la actividad D1 y D2 se reportó en el hígado de salmónidos por MacLatchy y Eales en 1992; sin embargo, las características bioquímicas de estos tipos enzimáticos no coincidían con las reportadas en mamíferos. Estudios posteriores en el hígado de tilapia apoyaron la noción de que esta especie expresaba una enzima con características cinéticas similares a la D2 de mamíferos (Mol y col., 1993). Actualmente se sabe, que a diferencia del resto de vertebrados el hígado de trucha y *F. heteroclitus* co- expresan a la D1 y D2 que catalizan la vía ORD (Orozco y col., 1997, Orozco y col., 2000). Además cada una de ellas presenta características propias: la K_m y la V_{max} de la D1

son menores a las de su contraparte mamífera y la enzima es relativamente insensible a la inhibición por PTU; la V_{max} y la tasa V_{max}/K_m de la D2 es 60 veces mayor que la reportada en el cerebro de rata, sugiriendo que la D2 hepática de pez es una enzima muy abundante y/o muy eficiente.

La vía de inactivación de TH, ha sido menos estudiada en peces óseos. Sin embargo, se ha encontrado una alta expresión de la D3 en piel de trucha (Fenton y col., 1997) y cerebro de tilapia (Mol y col., 1997). Se ha documentado actividad T_4 y T_3 IRD en el cerebro e hígado de trucha (Johnston y Eales., 1995, Frith y Eales., 1996, Mol y col., 1998, Plate y col., 2002), tilapia, pez gato y turbot (Mol y col., 1998); American plaice (Adams y col., 2000); salmón del atlántico (Specker y col., 2002) y esturión (Plohman y col., 2002).

4.3 Cartilagosos

Los peces cartilagosos pertenecen a la clase Chondrichthyan que incluye dos grupos: los elasmobranquios (tiburones y rayas) y los holocefalos (quimeras). Los miembros de este grupo poseen esqueletos compuestos principalmente de cartílago impregnado de calcio (Kardog, 1998). La mayoría son marinos, son raros los migrantes al agua dulce y solo hay una familia de peces estenohalinos (rayas de agua dulce). Los peces cartilagosos muestran una serie de estrategias fisiológicas particulares, incluidos mecanismos de osmoregulación, reproducción y metabolismo (Randall y col., 1997). Los elasmobranquios marinos son ureotélicos y la urea es el principal osmolito que mantiene la homeostasis en el medio marino; retienen urea por reabsorción en el riñón y mantienen una baja permeabilidad de dicho soluto en las branquias. Las concentraciones de la urea pueden alcanzar los 500 mmol L^{-1} y aún así, las proteínas estructurales y la actividad enzimática no son afectadas debido a la presencia de algunos osmolitos orgánicos como el óxido de trimetilamina (TMAO), que contrarresta los efectos desnaturizantes de la urea. Las concentraciones intracelulares de TMAO:urea mantienen una relación 1:2 y debido a la acumulación plasmática e intracelular de estos osmolitos orgánicos los condictios son ligeramente hiperosmóticos respecto al agua de mar (Evans y col., 1997). Información más amplia sobre la fisiología, diversidad, habitat, filogenia y reproducción se presenta en la sección de anexos.

Comparado con otros vertebrados, el estudio de la endocrinología de elasmobranquios ha recibido poca atención. En particular la función tiroidea en peces cartilaginosos se ha abordado marginalmente. En el caso de la desyodación, solo existe un trabajo en el cual la actividad hepática T₄-ORD se caracterizó parcialmente (Leary y col., 1999). El estudio se realizó con un *pool* de homogenizados de tres tiburones hembras adultas (*Squalus acanthias*). Las cinéticas para T₄ se realizaron por cuantificación radioinmunitaria de T₃, usando concentraciones de sustrato en el intervalo de 0 a 125 nM, además se examinó el efecto de los osmolitos (urea, TMAO, sarcosina y betaina). Los valores de K_m aparente se encontraron en un intervalos de 382 a 225 nM, y el valor de la V_{max} incrementó de 0.29 a 0.36 pmol/mg/hr cuando se incluyó la mezcla de osmolitos.

El papel que juega la desyodación en la fisiología de los peces va de la mano con las diferentes acciones que las TH ejercen en esta clase de vertebrados. Entre estas se encuentran efectos en la ontogenia (desarrollo embrionario, metamorfosis y esmoltificación); balance energético, balance hidrosmótico y reproducción. El papel que tiene la desyodación de yodotironinas en estas funciones, no es del todo claro. Sin embargo, se ha propuesto que las Ds son importantes en el mantenimiento compartimentalizado de las vías metabólicas que proveen la energía necesaria para éstas. Por otro lado, el hecho de que la expresión de las Ds se module por otros mensajeros neuroendocrinos, además de las TH, apoya la idea de que las TH tienen efectos permisivos o sinergistas en diversos procesos, donde las Ds pueden coordinar y facilitar de manera tejida específica, la acción de otras hormonas (Orozco y Valverde, 2005).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Independientemente de sus semejanzas estructurales y operacionales con el resto de vertebrados, las desyodasas en los peces teleósteos exhiben características funcionales distintivas (para revisión: Orozco y Valverde-R, 2005). En el caso particular de los peces cartilaginosos solamente se han cuantificado los niveles circulantes de TH y en algunas especies se ha evaluado su participación durante el ciclo reproductivo (Volkoff y co., 1999; Crow y col., 1999). En este contexto, el estudio y caracterización bioquímica y molecular de las Ds en esta clase de vertebrados es incipiente; solamente existe un estudio que reporta el análisis parcial de la actividad T₄-ORD hepática en el tiburón *Squalus acanthias*, y sus resultados están lejos de ser concluyentes respecto al isotipo de desyodasa involucrada (Leary y col., 1999). Por esta razón así como por sus peculiaridades fisiológicas y su ubicación en la base de la trayectoria evolutiva de los vertebrados, resulta importante estudiar de manera sistematizada la función tiroidea en los peces condriictios. Este conocimiento complementará y permitirá profundizar con mayor detalle en la probable evolución de los sistemas tiroideos y del metabolismo del yodo en los cordados.

HIPÓTESIS

Al igual que en los teleosteos adultos, el hígado de los peces condriictios expresa el isotipo D1 que cataliza la vía desyodativa ORD e IRD así como el isotipo D2 que cataliza a la vía ORD y el isotipo D3 que cataliza la vía IRD.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL.

Caracterizar cinética y molecularmente a la(s) desyodasa(s) de yodotironinas en el hígado del tiburón *Chiloscyllium punctatum*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- 1♦ Caracterizar la cinética de las vías ORD e IRD de yodotironinas y establecer los tipos enzimáticos presentes.
- 2♦ Clonar y caracterizar el (los) cDNA(s) que codifica(n) para desyodasa(s) hepática.

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales

Se obtuvieron, con un proveedor comercial, tiburones de la especie *Chiloscyllium punctatum* (Anexo 2), de 25-50 cm de longitud (edad juvenil). Los animales se mantuvieron en el laboratorio en un acuario de agua salada, a una temperatura ambiente de $25 \pm 1^\circ \text{C}$ y bajo un fotoperíodo 12h:12h luz-oscuridad. Se alimentaron *ad-libitum* con camarón, dos veces a la semana y se aclimataron 20 días antes del sacrificio. El día del sacrificio, los animales se anestesiaron con MS-222 (tricaine methane sulfonate) (0.5 g L^{-1}), los hígados se disectaron y congelaron inmediatamente, almacenándose a -70°C hasta su análisis posterior.

Reactivos

Las yodotironinas no radiactivas (rT₃, T₃ y T₄), PTU (6-n-propil-2-tiouracilo), urea, TMAO (N-oxido de trimetilamina), MS-222 y los oligonucleótidos sintéticos, se obtuvieron de Sigma Chemical Co (St. Louis MO). Las yodotironinas radiactivas ¹²⁵I-T₃, ¹²⁵I-rT₃ y ¹²⁵I-T₄ (actividades específicas: 1200 μCi/μg) se adquirieron de Perkin-Elmer Life Sciences, Inc (Boston MA); las tironinas radiomarcadas se purificaron antes de su uso por medio de una columna SEP-PACK C18 de Millipore (Waters Chromatography, Boston MA). El reactivo de Bradford se compró a Bio-Rad (Richmond, CA). El ditioneitol (DTT) se obtuvo de Calbiochem (La Jolla, CA).

La Taq DNA polimerasa se obtuvo de MBI Fermentas. El reactivo de Trizol, los dNTP's (deoxi-nucleótidos trifosfato), la RNase H, el inhibidor de RNAsas (RNasin), la transcriptasa reversa SuperScript™ II RNase H y la deoxinucleotidil transferasa terminal (rtdT) se adquirieron de Invitrogen (Carisbad, CA). Las endonucleasas de restricción Hind III, NcoI y NotI se compraron a New England Biolabs (Ipswich, MA), el vector pGEM-T se obtuvo de Promega (Madison, WI).

Preparación de microsomas

La preparación de las fracciones microsomales, para la determinación de la actividad enzimática, se basa en un método previamente descrito (Mol y col., 1997) y modificado para estos experimentos. En breve, los hígados se homogenizaron en amortiguador (sacarosa 0.25 M, Hepes 10 mM, DTT 1 mM a pH 7.0) en una proporción 1:10 peso/volumen y se centrifugaron 10 min a 3000g. El sobrenadante se centrifugó por 30 min a 10,000 g, y el sobrenadante resultante se centrifugó por 90 min a 40,000g. El pellet final se resuspendió en 5 volúmenes de amortiguador, se dividió en alícuotas y se almacenó a -70 °C.

Determinación de la actividad desyodativa ORD (D1 y D2)

La actividad de la vía ORD se cuantificó mediante una modificación de la técnica de liberación de radioyodo (Leonard y Rosenberg, 1980), en el cual se utiliza como sustrato una tironina marcada con ^{125}I . En todos los casos, la actividad enzimática fue medida por duplicado. La mezcla de reacción (volumen total de 100 μL) contiene la enzima (homogenado de tejido a la concentración óptima de proteína), DTT y la tironina marcada y no marcada. Luego de incubar la mezcla, la reacción se detiene con 50 μL de una solución de paro que contiene (suero normal de bovino al 50 % y 10 mM PTU) y 350 μL de ácido tricloroacético (TCA) al 10%. La mezcla se centrifuga en frío (4°C) por 15 min a 2500 rpm. El ^{125}I liberado soluble en ácido es separado por cromatografía en una columna de intercambio catiónico (Dowex W-SOX2), eluido con ácido acético al 10% y la radioactividad se cuantifica en un espectrómetro de emisiones gamma (Cobra II, Auto-Gamma). La actividad específica de las enzimas se expresa como la cantidad (fmolas o pmolas) de yodo radioactivo liberado/mg de proteína/hora. La cuantificación de proteínas de la muestra se realizó por el método de Bradford empleando albumina serica bovina (BSA) como estándar (Bradford, 1976).

Determinación de la actividad desyodativa IRD

La actividad de la vía IRD se determinó usando un sistema de cromatografía descendente descrito previamente (Fenton y col., 1997). La mezcla de reacción

contiene 2 nM de $^{125}\text{I-T}_3$, T_3 no marcada, concentraciones variantes de DTT y una concentración saturante (1 μM) de rT_3 no marcada para minimizar la actividad IRD de la D1. La conversión de la T_3 marcada en ^{125}I 3,3'- T_2 fue corregida eliminando la desyodación no enzimática observada en los blancos incubados en ausencia de proteína. Los compuestos marcados presentes en la mezcla de reacción se separaron por cromatografía descendente en papel (Bellabarba y col., 1968) y cuantificado en un contador gamma. En todos los casos, se consumió menos del 30% del sustrato durante la reacción. Los resultados se expresan como el porcentaje de desyodación o como la actividad específica de la enzima expresada como pmol de 3,3'- T_2 liberada/mg de proteína/hora. La concentración de proteína se determinó por el método de Bradford.

Caracterización cinética

Para establecer las mejores condiciones del ensayo y determinar la actividad ORD e IRD se evaluaron los siguientes parámetros operacionales: concentración de proteína (1 a 200 mg/mL) y DTT (1 a 100 mM), pH (5.0 a 8 a intervalos de 0.5), tiempo (1 a 3 h) y temperatura (15 a 45° C) de incubación. Se usaron como sustrato: $^{125}\text{I-rT}_3$, $^{125}\text{I-T}_4$ y $^{125}\text{I-T}_3$ para la actividad D1, D2 y D3 respectivamente.

Una vez establecidas las condiciones óptimas del ensayo para cada una de las vías de desyodación, se realizaron cinéticas de sustrato, empleando DTT como cofactor para determinar los valores de K_m y V_{max} aparentes. Estos valores se calcularon por la relación no lineal de los datos (concentración de sustrato vs velocidad de reacción (actividad específica)) con la ecuación de Michaelis Menten usando el programa GraphPad Prism 4.02. Las concentraciones de sustrato utilizadas fueron distintas para cada hormona. Posteriormente para determinar las características operacionales de la enzima como son la K_m , V_{max} verdaderas y el mecanismo de la reacción, los datos experimentales se analizaron mediante gráficos de dobles recíprocos. Se realizó un análisis de Eadie Hofstee (V/S vs V) para revelar la presencia de más de un componente enzimático.

El efecto del inhibidor PTU sobre la actividad desyodativa, se analizó a concentraciones de hasta 1 mM. Por otro lado, la determinación del sustrato

preferencial de cada vía desyodativa se realizó utilizando diversas concentraciones de la hormona no radiactiva y una concentración fija de hormona radiactiva.

Clonación del cDNA y análisis de la secuencia.

Extracción de RNA total

Se aisló RNA total de hígado usando el reactivo de TRIzol. El método es una variación del original de Chomczynski y Sachi (1987) que contiene fenol e isotiocianato de guanidina, este último es un agente desnaturante que permite la separación del RNA a partir de tejidos con un alto contenido de ribonucleasas endógenas.

Síntesis de cDNA (RT) y PCR

La síntesis del DNA complementario, se realizó por transcripción reversa, la cual se llevo a cabo usando 10 µg de RNA total, un oligo(dT)-adaptor primer (GACTTCAGGCTAGCATCGATCCATGGGTCGAC[T₁₉]) y la enzima transcriptasa reversa SuperScript™ II. La mezcla de reacción contiene además dNTPs, DTT 0.1 M, RNAsin (Inhibidor de ribonucleasas) y solución amortiguadora. Luego de incubar a 42° C por 2h se inactivó la enzima (65° C, 20 min), seguido por un tratamiento con ribonucleasa H (RNasa H) a 55° C por 20 min.

Para obtener un fragmento inicial de cDNA que codifique para desyodasa, se emplearon un par de oligonucleótidos degenerados que reconocen el sitio activo de las Ds: 5' TTYGGNWSCTGYACNTGACC 3' (sentido) y 5' TTYTTRAANGCCCANCCRTC 3' (antisentido) en donde N=A G C T , Y=CT, W=TA, S=CG, R=AG, en un PCR bajo un esquema de descenso en la temperatura de alineación del oligonucleótido (touchdown), que abarca desde la combinación de nucleótidos con la temperatura de alineación más alta, hasta la más baja. De esta manera, se obtuvo un fragmento inicial de 150 bp, el cual fue purificado a partir del gel de agarosa usado para la electroforesis. (Para la clonación de la D2 se diseñaron un par de oligonucleótidos degenerados a partir de regiones conservadas en las desyodasas tipo 2: 5' TTYTTYTCNAAAYTGCTNTT 3' (sentido) y 5' TGNGCYTCYTCDATRTA 3' (antisentido), se generó un fragmento inicial de 400 pb y se realizó el mismo procedimiento que se describe a continuación). El fragmento

se ligó por complementariedad de los extremos adhesivos (3' A) del fragmento y (3' T) del vector pGEM-T, se transformaron células competentes de *E.coli* mediante choque térmico y se incubaron las células (37 °C, 16 h) en agar LB-ampicilina, Xgal e IPTG. Se tamizaron colonias blancas recombinantes positivas, mediante amplificación por PCR del fragmento clonado para corroborar que las colonias tengan el fragmento esperado. Las colonias seleccionadas se crecieron durante toda la noche a 37° C. A partir de dicho cultivo se purificó el plásmido mediante miniprep y posteriormente fue secuenciado. *(El procedimiento descrito para la clonación y secuenciación de este fragmento inicial, fue usado para los diversos fragmentos de cDNA generados en el presente trabajo).*

Amplificación de los extremos 3' y 5' del cDNA (5' y 3' RACE)

En base a la secuencia obtenida, se diseñaron oligonucleótidos específicos para realizar amplificaciones de los extremos 3' y 5' del cDNA (3' y 5' RACEs, por sus siglas en inglés *Rapid Amplificación of cDNA Ends*) en una serie de PCRs anidados. En dicho esquema de PCR, se realizan dos amplificaciones por PCR consecutivas. 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.

Para el 3'RACE se utilizaron un par de oligonucleótidos específicos (S1 y S2) de la secuencia a extender y un par de oligonucleótidos que alinean con la secuencia adaptadora del oligo(dT) (oligo 3'race-2, oligo 3'race-3) (figura 14). Para extender la secuencia hacia el extremo 5', primero se realizaron una serie de RT, utilizando como templado RNA total y como iniciador un oligonucleótido antisentido específicamente diseñado a partir de la secuencia a extender (As1). Al cDNA obtenido de esta reacción se le adicionó en el extremo 3' una cola de citocinas (dCTPs), mediante la enzima transferasa terminal (rTdT). El producto de la reacción fue purificado y usado como templado para realizar un primer PCR, con el oligonucleótido específico con el que se obtuvo el RT (As1) y un oligo(dG) más una secuencia adaptadora (oligo 5'race-1). El producto del primer PCR se uso como templado para el segundo PCR y como iniciadores un oligonucleótido específico de la secuencia (As2) y uno complementario a la secuencia adaptadora del oligo(dG)

(oligo 5´race-2)(Figura 14). Los fragmentos generados a partir de los 3´ y 5´ RACEs, se clonaron en el vector pGEM-T y fueron secuenciados.

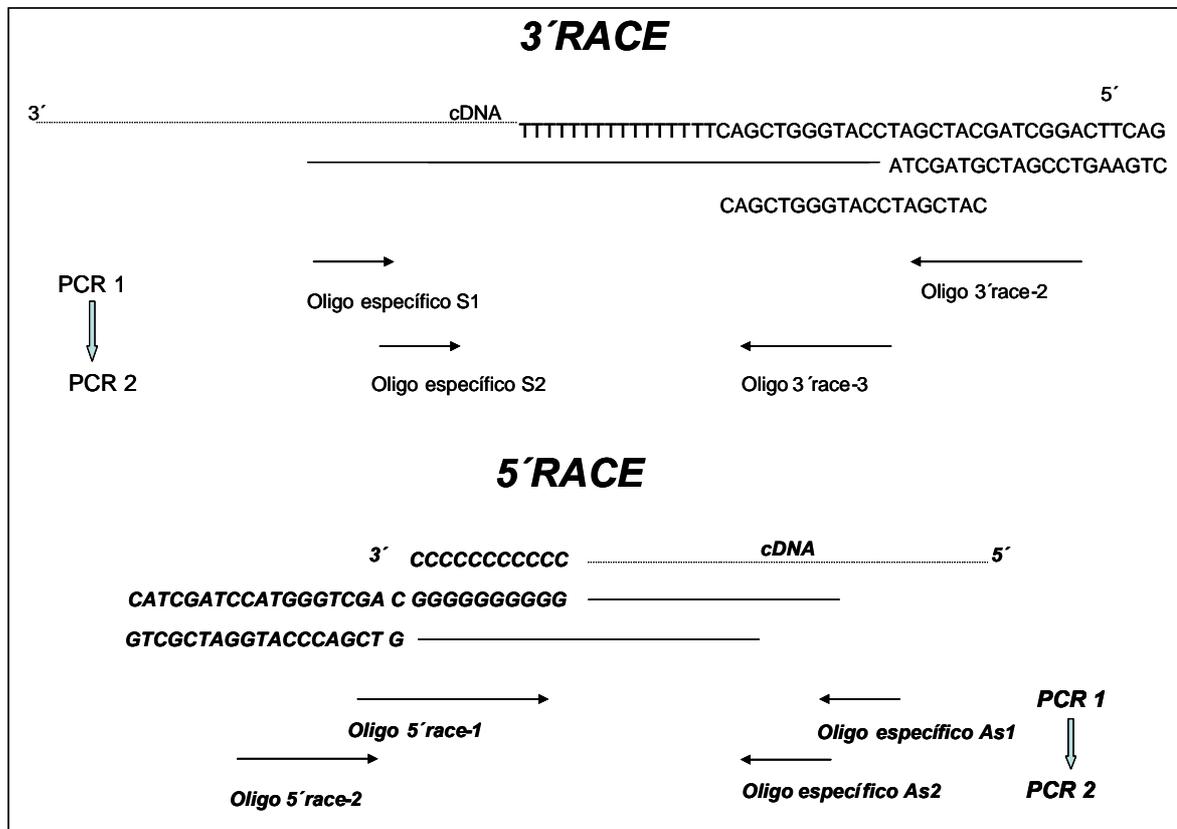


Figura 14. Amplificación de los extremos del DNA complementario mediante 3´ y 5´RACE

Amplificación de la secuencia de cDNA completa

Las secuencias obtenidas a partir del RACE se “empalmaron” o sobrelaparon hasta tener la secuencia del cDNA completa, a partir de la cual se diseñó un par de oligonucleótidos (sentido: 5D3T y antisentido: 3D3T). El oligonucleótido sentido fue diseñado de tal manera que contiene el sitio de inicio de la traducción y el sitio de corte para la enzima NcoI, y el oligonucleótido antisentido, corresponde a la región 3´ no traducida vecina a la región poli(A) contiene el sitio NotI. De esta manera el cDNA fue amplificado (usando un RT preparado a partir de un pool de hígados), clonado en pGEM-T y secuenciado (al menos tres veces) para corroborar la secuencia de nucleótidos.

Análisis de las Secuencias

Las secuencias deducidas de aminoácidos se alinearon usando el programa DNAMAN. La estructura secundaria del RNA fue predicha usando el programa MFOLD (<http://bioinfo.math.rpi.edu/~zukerm>). El árbol filogenético se construyó con el método de distancia neighbor-joining de MEGA.

Expresión de la proteína recombinante (D3)

El cDNA completo, se digirió con las enzimas *NcoI* and *NotI*, y se ligó con los sitios *NcoI/NotI* del vector pXENEX1 (Jeziorski y col., 1998). El cDNA se linearizó con *Hind III*, se purificó y se usó para la transcripción *in vitro* usando T7 RNA polimerasa. Por otro lado, *Xenopus laevis* hembras fueron anestesiadas por hipotermia, se realizó una incisión abdominal y se removieron de 2 a 3 lóbulos ováricos y colocaron en solución de Barths. Los ovocitos en estadio V-VI (n=30) se microinyectaron con 50 nL (300 ng/ovocito) de RNA y se incubaron por 4 días a 18°C en solución de Barths. Se realizó cambio del medio diariamente. Con los ovocitos cultivados, se prepararon homogenados y se determinó la actividad desyodativa. Además se evaluó el efecto de los osmolitos orgánicos urea, TMAO y una mezcla de ambos en la actividad desyodativa.

Construcción de una quimera de D2 con SECIS de *F.heteroclitus*

Se construyó una quimera, uniendo un fragmento de cDNA de la D2 con un fragmento de la D2 del pez óseo *F. heteroclitus* de aproximadamente 400 pb que incluye el elemento SECIS y que previamente fue clonado en el laboratorio (Orozco y col., 2002). Se realizó PCR utilizando dos oligonucleótidos híbridos (Sh y Ash) que incluyen en su secuencia nucleótidos tanto de la D2 de tiburón y la D2 de *Fundulus* y dos oligonucleótidos específicos de los extremos de la químera, que incluyen además sitios de corte para *NcoI* y *NotI* (figura 15). El cDNA quimérico se clonó en pGMET y verificó su secuencia. Una vez en pGEMT, la quimera se cortó con las enzimas *NcoI* y *NotI* y se ligó al vector pXENEX, secuenciándose nuevamente. Lo anterior se realizó para la posterior expresión y caracterización de la enzima recombinante quimérica.

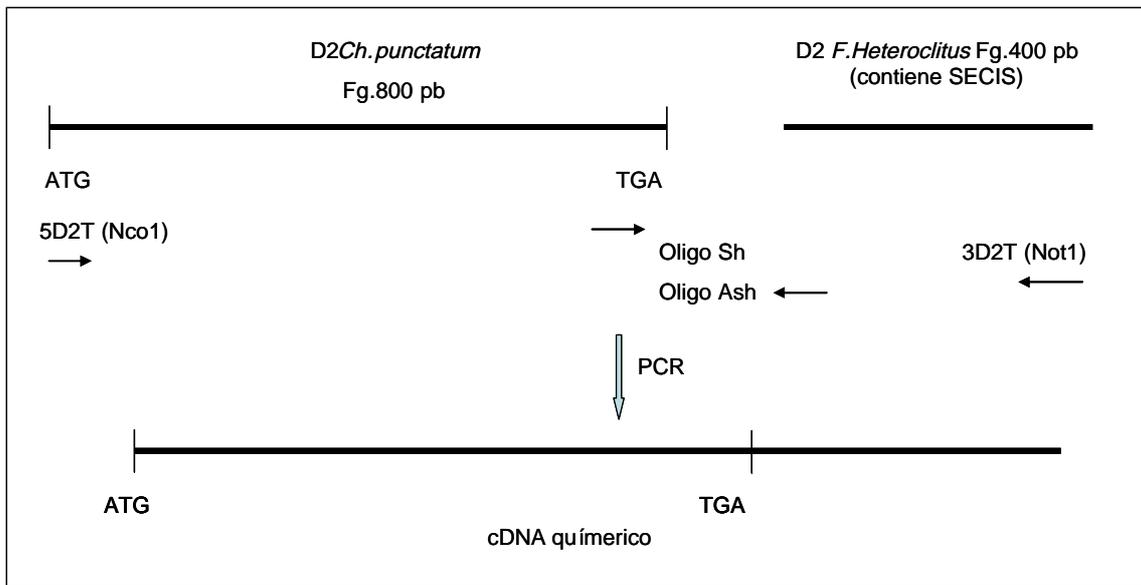


Figura 15. Construcción de una químera entre el cDNA de un fragmento que incluye el marco de lectura abierto de la D2 de tiburón y un fragmento que contiene el elemento SECIS indispensable para la incorporación de Sec, de *Fundulus heteroclitus*.

RESULTADOS

1. Caracterización cinética

En una serie de experimentos preliminares se determinaron las condiciones de ensayo inicial para determinar la actividad desyodativa ORD (D1 y D2) e IRD (D3). Se usaron las siguientes concentraciones de sustrato preferencial *in vitro* marcado: 2 nM de $^{125}\text{I-rT}_3$, 0.5 nM de $^{125}\text{I-T}_4$ y 2 nM de $^{125}\text{I-T}_3$ para medir la actividad D1, D2 y D3 respectivamente. Para cada isoenzima, la actividad desyodativa fue lineal y una función dependiente de la concentración de proteína en un intervalo específico (figura 16), hasta 40 $\mu\text{g/mL}$ para la D1, 5 $\mu\text{g/mL}$ para la D2 y hasta 100 $\mu\text{g/mL}$ para la D3. Con estos resultados y para realizar los ensayos posteriores, se eligieron las siguientes concentraciones de proteína: 15, 4 y 40 $\mu\text{g/mL}$ para la D1, D2 y D3 respectivamente. La actividad desyodativa fue dependiente de DTT (ver tabla 2). Las velocidades de desyodación óptimas se obtuvieron a 37°C durante 1 h y dichas condiciones se fijaron para los siguientes ensayos (resultados no mostrados). En los tres casos la máxima actividad desyodativa se obtuvo a un pH de 6.5 (datos no mostrados). En la tabla 2 se muestran las condiciones óptimas de ensayo (concentración de proteína y DTT, pH, tiempo y temperatura de incubación) establecidas para cada tipo enzimático y bajo las cuales se realizó la caracterización subsiguiente.

1.1 VIA ORD

Se sabe que la vía ORD está catalizada por dos isoenzimas: la D1 que desyoda preferencialmente $rT_3 > T_4$ con una K_m en el rango micromolar, y la D2 cuyo sustrato preferencial *in vitro* es la T_4 con una K_m en el rango nanomolar. Para analizar si el hígado de *Ch. punctatum* expresaba las dos isoenzimas (D1 y D2), se utilizó primeramente como sustrato $^{125}\text{I-rT}_3$, debido a que es el sustrato preferencial *in vitro* para la D1, y la D2 también desyoda dicho sustrato. Se realizó una cinética de sustrato en un amplio intervalo de concentraciones (1-1000 nM de rT_3) y una alta concentración de cofactor. Un análisis de Eadie Hofste del ensayo de desyodación de rT_3 reveló la presencia de dos componentes enzimáticos, uno de alta y otro de baja afinidad con valores de K_m de 111 nM y 1.6 nM, respectivamente (figura 17).

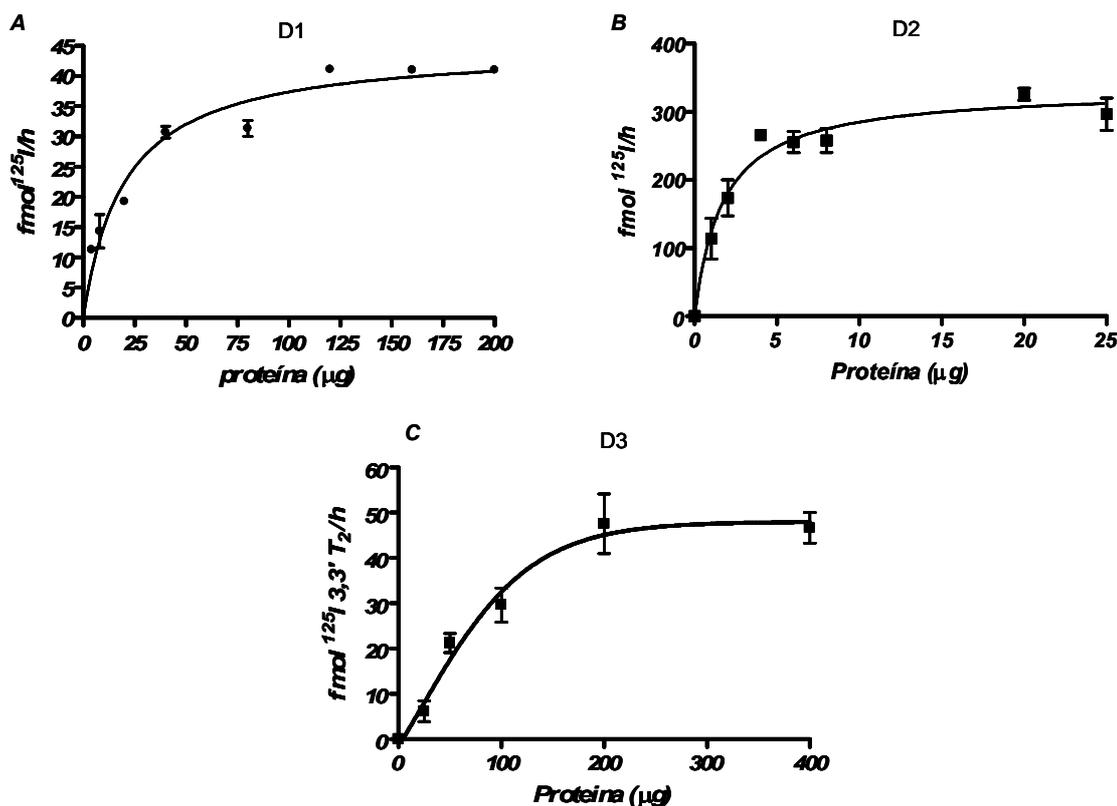


Figura 16. Efecto de la Concentración de Proteína en la Actividad D1, D2 y D3. En (A) se muestra la vía ORD de ^{125}I -rT₃ (D1); en (B) la vía ORD de ^{125}I -T₄ (D2), y en (C) la vía IRD de ^{125}I -T₃ (D3). En A y B, los resultados corresponden a la liberación de ^{125}I a partir de ^{125}I -rT₃ y ^{125}I -T₄, y en C a la conversión de ^{125}I -T₃ a ^{125}I 3,3'-T₂. En los tres casos, los resultados se expresan como una función de la concentración de proteína microsomal.

Tabla 2. Condiciones óptimas de ensayo para la actividad D1, D2 y D3.

Parámetro	D1	D2	D3
Concentración de proteína (µg/mL)	15	4	40
Concentración de cofactor, DTT (mM)	5	10	50
pH de incubación	6.5	6.5	6.5
Temperatura de incubación (°C)	37	37	37
Tiempo de incubación (h)	1	1	1

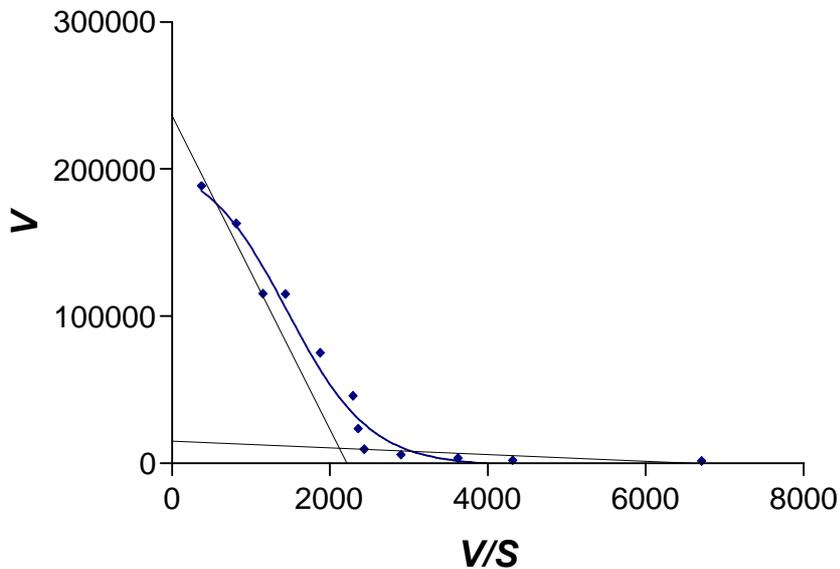


Figura 17. Actividad ORD de ^{125}I rT₃. Análisis de Eadie-Hofstee. Se obtuvieron dos componentes con valores de K_m de 111 y 1.6 nM. Condiciones del ensayo: 0.5 nM de ^{125}I rT₃, 1-1000 nM rT₃, DTT 25 mM, 37°C, 1 h.

Estos resultados sugirieron la presencia, en el hígado de *Ch. punctatum*, de 2 enzimas que catalizan la vía ORD: una que desyoda rT₃ (y T₄ aunque aquí no se muestra) a bajas concentraciones y otra que trabaja a mayores concentraciones y se hace evidente sólo cuando se usa rT₃ a altas concentraciones. Además, esta primera aproximación reveló que una y otra desyodasa tienen valores de K_m semejantes a los reportados para las isoenzimas D1 y D2 en otros vertebrados. Por esta razón, se realizó la caracterización cinética del componente de alta K_m , midiendo la actividad desyodativa como una función directa de la concentración de sustrato (rT₃). Los resultados (figura 18) muestran que la enzima se saturó por rT₃ a concentraciones de ~300 nM. El recuadro de la figura 18 muestra un gráfico de dobles recíprocos a partir del cual se obtuvieron valores aparentes de k_m y V_{\max} de 102 nM y 350.8 pmol/mg/h, respectivamente.

El mecanismo de reacción se determinó mediante un gráfico de dobles recíprocos de la formación de producto como una función de la concentración del sustrato rT₃ a diversas concentraciones fijas de cofactor (figura 19-A). El patrón de líneas paralelas obtenido, es característico de las reacciones bisustrato tipo ping-pong.

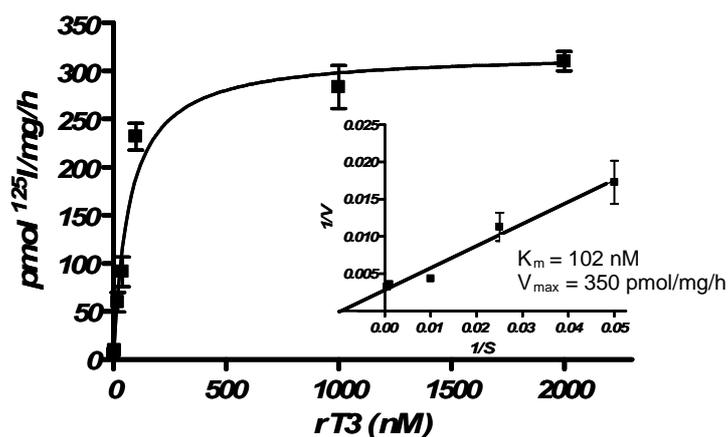


Figura 18. Cinética de la Actividad ORD de ¹²⁵I rT₃ en Función de la Concentración de Sustrato. Condiciones del ensayo: 2 nM de ¹²⁵I-rT₃, 1-2000 nM de rT₃, DTT 5mM, 15 µg de proteína por tubo, pH 6.5, 1 h a 37°C. Cada punto representa el promedio de dos experimentos independientes realizados por duplicado.

Un gráfico de los interceptos del eje vertical contra el recíproco de la concentración de cofactor (figura 19-A) permitió calcular un valor de K_m verdadero para DTT de 9 mM. Mediante un análisis semejante, midiendo la velocidad de reacción en función de la concentración de DTT a diferentes concentraciones fijas de rT₃, se obtuvieron los parámetros cinéticos verdaderos para rT₃: K_m 122 nM y V_{max} 534 pmol/mg/h (figura 19-B). Por otro lado, se evaluó el efecto del PTU sobre la actividad rT₃-ORD, encontrando que aún a concentraciones de 1 mM la actividad no se veía afectada (datos no mostrados). Los datos anteriores sugirieron la presencia de una desyodasa con propiedades semejantes a las D1 reportadas en otros vertebrados.

La caracterización cinética de la D2 se realizó bajo las condiciones de ensayo que se muestran en la tabla 2. La cinética de sustrato (T₄, 0.5 a 200 nM), empleando como cofactor DTT permitió calcular los siguientes valores de K_m y V_{max} aparentes: 0.9 nM y 33 pmol ¹²⁵I/mg/h, respectivamente (figura 20). Al utilizar T₄ como sustrato, el sistema se saturó a concentraciones muy bajas ~ 5 nM. Posteriormente se realizaron cinéticas de sustrato con diferentes concentraciones del cofactor y viceversa para obtener los valores de K_m y V_{max} verdaderos. A partir del análisis de dobles recíprocos (figura 21), se encontró que estos parámetros cinéticos para T₄ fueron: K_m 1.1 nM con una V_{max} de 55 pmol ¹²⁵I/mg/h. Para DTT se obtuvo un valor

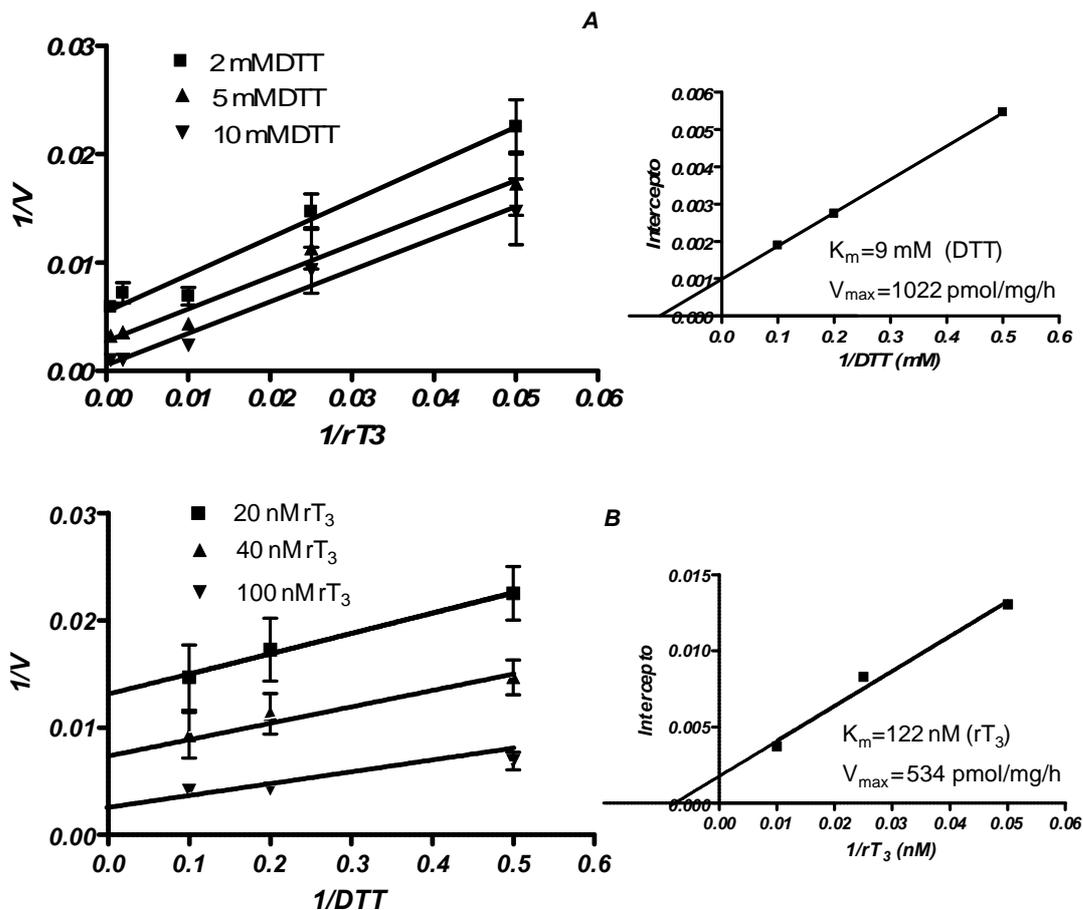


Figura 19. Actividad ORD de ¹²⁵I rT₃ Mecanismo de Reacción. A) Grafico de Lineweaver-Burk de la velocidad de desyodación contra la concentración de sustrato rT₃ a diferentes concentraciones fijas del cofactor DTT. El recuadro muestra un grafico de los interceptos del eje vertical contra el inverso de la concentración de cofactor de los datos del grafico de Lineweaver Burk, que permite calcular los valores de K_m verdadero. B) La velocidad de desyodación contra la concentración de cosustrato DTT a diferentes concentraciones fijas del sustrato rT₃.

de K_m de 11 mM. El patrón obtenido con la gráfica de dobles recíprocos de la cinética de cofactor es característico de las reacciones bisustrato tipo secuencial, es decir, líneas que intersectan en un punto.

Se evaluó el efecto de 6-n-propil-tiouracilo (PTU) en la actividad T₄-ORD, y se observó que aún con 1 mM de PTU la actividad desyodativa se inhibe menos del 30%, siendo una enzima insensible a la inhibición por PTU (datos no mostrados). Por otro lado se determinó que el sustrato preferencial para esta isoenzima es T₄ > rT₃ > T₃ (figura 22).

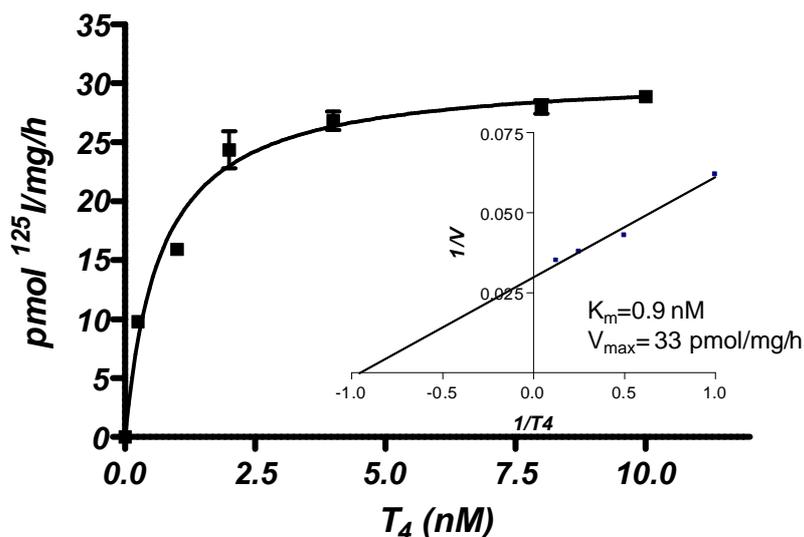


Figura 20. Cinética de la Actividad ORD de ^{125}I - T_4 en Función de la Concentración de Sustrato. Condiciones del ensayo: 0.5 nM de ^{125}I - T_4 , 1-200 nM de T_4 , DTT 25mM, 4 μ g de proteína por tubo, pH 6.5, 1 h a 37°C. Cada punto representa el promedio de dos experimentos independientes realizados por duplicado.

Los resultados anteriores sugirieron que en el hígado de *Ch. punctatum* se expresa una desyodasa con características de una D2 que participa en la vía ORD; es decir, con una K_m para T_4 en el rango nanomolar, resistente a la inhibición por PTU, y un mecanismo de reacción bisustrato tipo secuencial.

1.2 VIA IRD

Las condiciones de ensayo con las que se caracterizó a la D3 (vía de inactivación) se muestran en la tabla 2. El gráfico de Michaelis Menten de la cinética de sustrato (T_3 , 1 a 50 nM) permitió calcular valores aparentes de K_m y V_{max} 5.3 nM y 0.045 pmol 3,3'- T_2 /mg/min (2.7 pmol 3,3'- T_2 /mg/h), respectivamente (figura 23-A). Los valores verdaderos fueron de 2.7 nM y 0.017 pmol 3,3'- T_2 /mg/min(1.02 pmol 3,3'- T_2 /mg/h), respectivamente. El gráfico de Lineweaver-Burk (figura 23-B) de la velocidad de desyodación en función de la concentración de sustrato a diferentes concentraciones de DTT, muestra un patrón de líneas intersectantes. Lo anterior sugirió que la cinética de la D3 de tiburón corresponde a un mecanismo de reacción bisustrato tipo secuencial, lo cual involucra la formación de un complejo ternario enzima-sustrato-cofactor durante la catálisis.

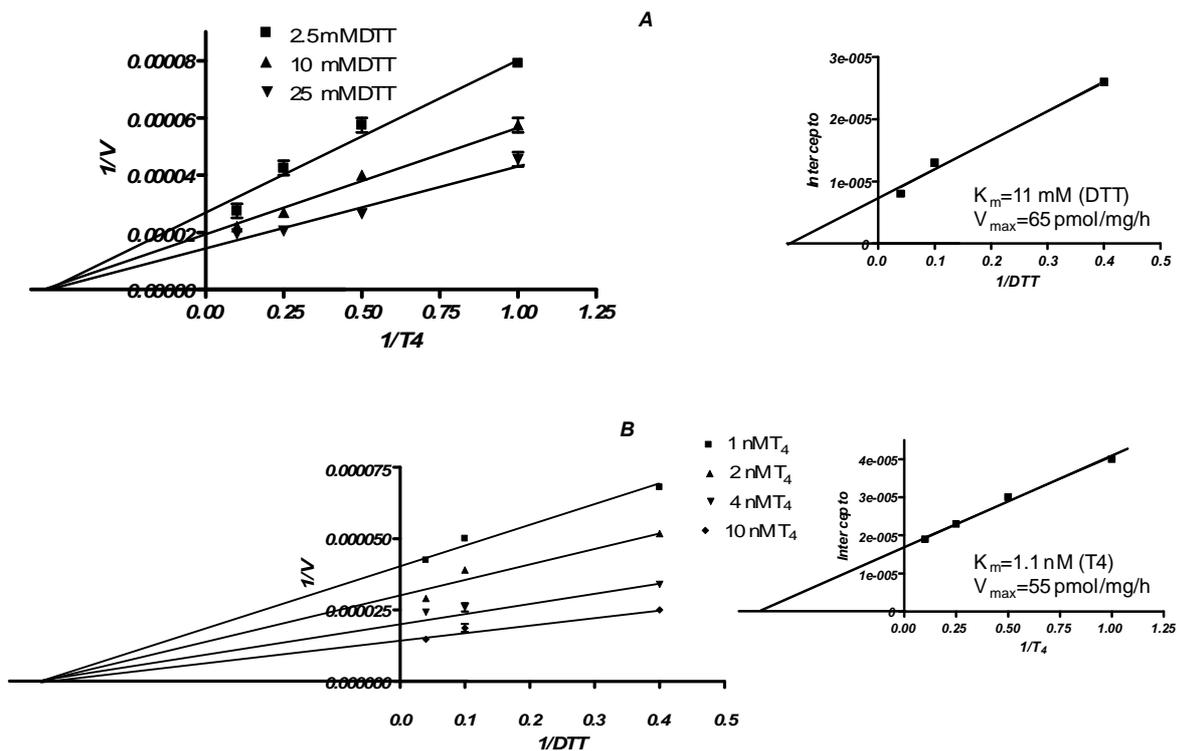


Figura 21. Actividad ORD de ¹²⁵I T₄ Mecanismo de Reacción Grafico de Lineweaver-Burk de (A) la velocidad de desyodación contra la concentración de sustrato T₄ a diferentes concentraciones fijas del cofactor DTT. El recuadro muestra un grafico de los interceptos del eje vertical contra el inverso de la concentración de cofactor de los datos, que permite calcular los valores de k_m verdadero. B) la velocidad de desyodación contra la concentración de cosustrato DTT a diferentes concentraciones fijas del sustrato T₄.

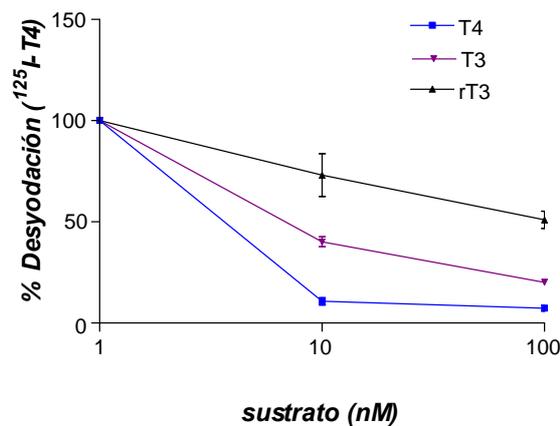


Figura 22. Efecto de las hormonas T₄, rT₃ y T₃ en la actividad desyodativa T₄-ORD.

Por otro lado, se evaluó la especificidad por el sustrato mediante una inhibición competitiva de la desyodación de $^{125}\text{I-T}_3$ (1nM) con los sustratos no marcados T_3 , T_4 y rT_3 a concentraciones crecientes (figura 24-B). A partir de estos resultados se encontró que la preferencia por el sustrato de la D3 es: $\text{T}_3 > \text{T}_4 > \text{rT}_3$. Finalmente la D3 no se inhibió por PTU aun a concentraciones de 1 mM (figura 24-A). Todos estos resultados muestran que la D3 de *Ch. punctatum* tiene propiedades catalíticas semejantes a las reportadas para otras D3 de vertebrados.

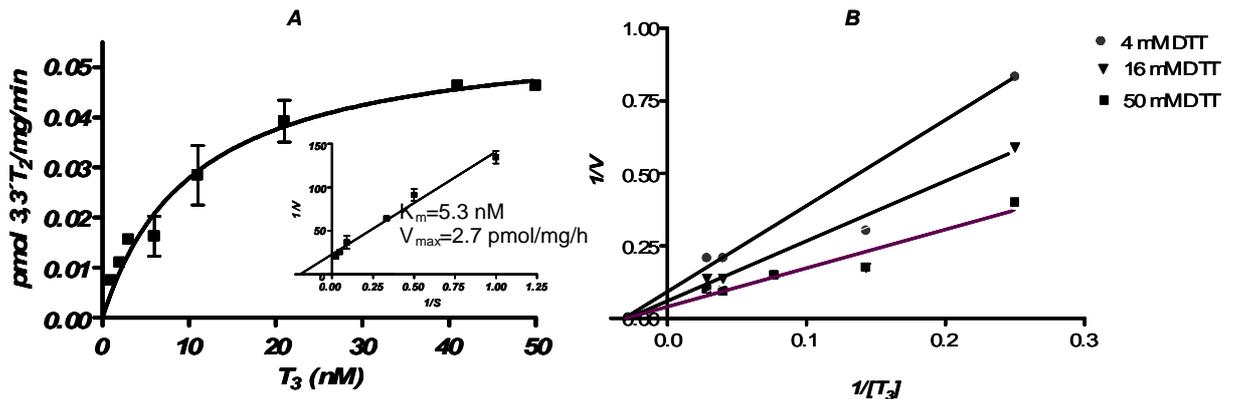


Figura 23. Cinética de actividad T_3 -IRD y mecanismo de reacción. A) Cinética de la actividad desyodativa en función de la concentración de sustrato (T_3). Condiciones del ensayo: 1 nM de $^{125}\text{I-T}_3$, 1-50 nM de T_3 , DTT 50 mM, 15 μg de proteína por tubo, pH 6.5, 1 h a 37°C . Cada punto representa el promedio de dos experimentos independientes realizados por duplicado. B) Grafico de Lineweaver-Burk de la velocidad de desyodación contra la concentración de sustrato T_3 a diferentes concentraciones fijas del cofactor DTT

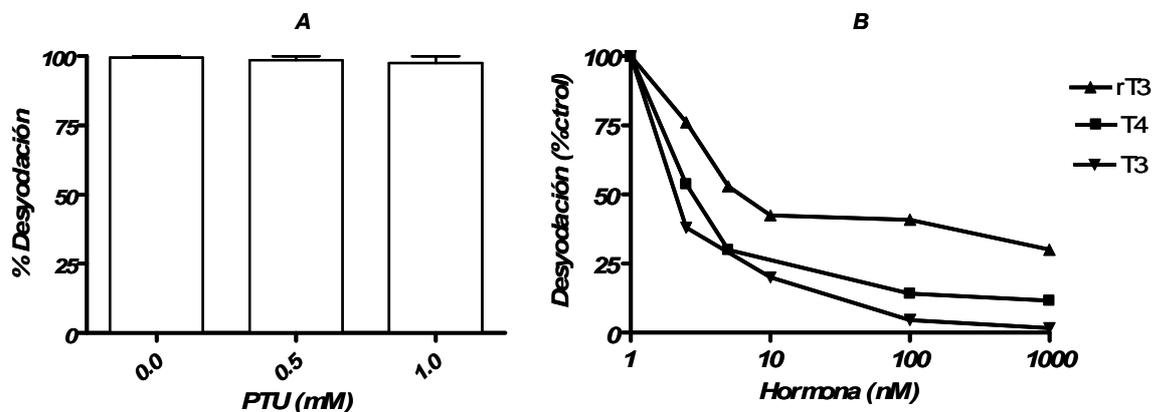


Figura 24. A) Efecto de PTU en la actividad desyodativa T_3 -IRD. B) Efecto de las hormonas T_4 , rT_3 y T_3 en la actividad desyodativa T_3 -IRD.

2. Caracterización molecular

2.1 Clonación y caracterización de la(s) Ds de la vía ORD

Estrategia General. La caracterización bioquímica y operacional de la actividad desyodativa en el hígado de *Ch. punctatum* reveló la presencia de las vías ORD e IRD y que estas estaban catalizadas por los isotipos D1, D2 y D3 con características cinéticas semejantes a las de sus contrapartes en otros vertebrados. Tomando en cuenta esto último, se diseñó una estrategia para clonar y caracterizar los cDNAs correspondientes. Inicialmente, la estrategia consistió en alinear las secuencias de aminoácidos reportadas para las Ds en diferentes especies; seleccionar secuencias consenso y diseñar oligonucleótidos degenerados. De esta manera, mediante RT-PCR *Touchdown* a partir de RNA total de hígado, se amplificó un fragmento inicial de ~150 pb que fue clonado y secuenciado. La alineación de este fragmento mostró el mayor porcentaje de identidad (70%) con las D3 de vertebrados y su clonación, secuenciación, expresión y caracterización cinética se presenta en una sección posterior.

Clonación y Caracterización de la D2. Puesto que con la estrategia inicial no fue posible obtener un fragmento correspondiente a la D1 o a la D2, y tomando en cuenta la abundancia relativa de la actividad D2 en el hígado de *Ch. punctatum*, se diseñó otro par de oligonucleótidos degenerados (D2 deg S/ D2 deg As) específicos de la región conservada para las D2 de diversas especies (tabla 3). Se aisló RNA total de hígado de tiburón mediante el método de TRIzol y por transcripción reversa se obtuvo cDNA. Utilizando el par de oligonucleótidos degenerados se realizó un PCR y se obtuvo un fragmento inicial de aproximadamente 400 pb. El fragmento se ligó en el vector pGEM-T y se transformaron células competentes de *E. coli*. Se eligieron varias colonias blancas transformadas y se verificó la presencia del fragmento mediante PCR con oligonucleótidos específicos del vector. Las colonias positivas fueron cultivadas y los plasmidos purificados mediante *miniprep* para su posterior secuenciación con los oligonucleótidos "sense" (M13rev) y "antisense" (pD13fw). La figura 25 muestra la secuencia de nucleótidos y de aminoácidos deducida del fragmento clonado.

Tabla 3. Secuencia de los oligonucleótidos empleados para la clonación de los cDNA's que codifican para la D2 y la D3 del tiburón *Ch. punctatum*.

Clave	Secuencia
oligo(dT)-adaptor primer	5' GACTTCAGGCTAGCATCGATCCATGGGTTCGAC[T ₁₉] 3'
oligo 3' race-2	5' GACTTCAGGCTAGCATCGAT 3'
oligo 3' race-3	5' CATCGATCCATGGGTTCGAC 3'
oligo 5' race-1	5' CATCGATCCATGGGTTCGACGGG [G ₁₃] 3'
oligo 5' race-2	5' CATCGATCCATGGGTTCGAAT 3'
M13rev (S)	5' CAGGAAACAGCTATGACCATG 3'
pD13fw (As)	5' GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTAA 3'
D2 deg (S) ^a	5' TTYTTYTCNAAAYTGYCTNTT 3'
D2 deg (As) ^a	5' TGNGCYTCYTCDATRTA 3'
D2-3 (S)	5' GAGTGCCGCCTGCTGGATTTT 3'
D2-4 (S)	5' CTTGGTGGTCAACTTCGGCT 3'
D2-5 (As)	5' GGCACCTCCATCTCCAGCTG 3'
D2-6 (As)	5' GAATCGTACACCGCCAGGAA 3'
D2-7 (S)	5' TCCGGCACTTCCCGGTG 3'
Sh (hibrido D2S) ^b	5' ttgagcaacaccggtgaaacagg tgcaagcgtccaggtcagaa 3'
Ash (hibrido D2As) ^b	5' ttctgacctggacgcttgca cctgtttcaacggtgttgctcaa 3'
5D2T (<i>Nco</i> I) ^c	5' TTTT CCATGGG TTTGCAGTGTGACCTGCT 3'
3D2T (<i>Not</i> I) ^c	5' TTT GCGGCCG CAAAGTCAAACATTACCTT 3'
D3 deg (S) ^a	5' TTYGGNWSCTGYACNTGACC 3'
D3 deg (As) ^a	5' TTYTTRAANGCCCANCCRTC 3'
D3-1 (S)	ATGGCGCGCCTCAAGTCC
D3-2 (S)	GTCGCTACCCAATACGCG
D3-3 (As)	GCAATGTCCGCGTATTGGGT
D3-4 (AS)	GTTGGAAGGACTTGAGGCG
5D3T (<i>Nco</i> I) ^c	5' TTTT CCATGGAT CTCCTGAAAGAGATAGTGGCTATT 3'
3D3T (<i>Not</i> I) ^c	5' TTTT GCGGCCG CCCTGGAATATTTATTATAAAAATATAAT 3'

- a) Para los oligonucleótidos degenerados
N=A G C T , Y=CT, W=TA, S=CG, R=AG
- b) Para los oligonucleótidos híbridos D2S y D2As, las letras en negritas corresponden a la secuencia del elemento SECIS de *Fundulus*.
- c) Se muestran en negritas los sitios de corte para las enzimas *Nco*I y *Not*I.

Se realizó una alineación de este fragmento con la secuencia de aminoácidos deducida a partir de los cDNAs reportados para la D2, identificándose secuencias consenso en todas las especies. De esta manera se confirmó que el fragmento de cDNA codifica para la D2 en el hígado de *Ch. punctatum*. A partir de este fragmento se diseñaron oligonucleótidos específicos para continuar con la secuenciación hacia los extremos 5' y 3' del cDNA.

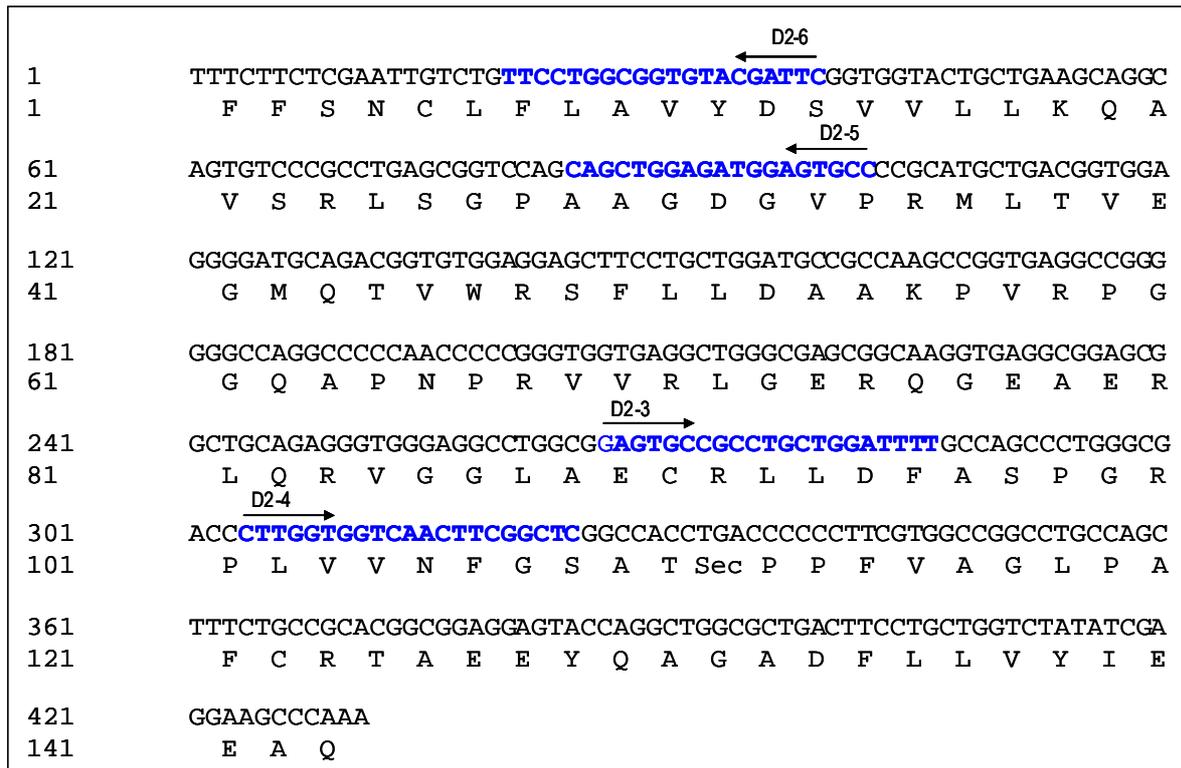


Figura 25. D2 de *Ch. Punctatum*. .Fragmento Inicial (secuencia de nucleotidos y aminoácidos deducida). Se muestra la secuencia así como los oligonucleótidos específicos diseñados para realizar el 3' y 5' RACE. El triplete TGA codifica para Sec.

Para extender el fragmento inicial hacia el extremo 3' se utilizaron los oligonucleótidos específicos D2-3 y D2-4. Se realizó un RT seguido de un esquema de PCRs anidados. En el primer PCR se utilizó como templado el cDNA obtenido con el oligonucleótido dT-adaptor y como cebadores el oligonucleótido específico D2-3 (S) y el oligonucleótido 3'race-2 (As). En el segundo PCR se empleó como templado el producto del primer PCR y como cebadores el par de oligonucleótidos específicos, D2-4 (S) y 3'race-3 (As). De esta manera, en el segundo PCR se amplificó un fragmento de aproximadamente 250 pb, se clonó en pGEM-T y fue

secuenciado. A partir del análisis de dicha secuencia se logró avanzar hacia el extremo 3' del cDNA de la D2; sin embargo no se había identificado hasta este momento un triplete de paro. Por esta razón se diseñó otro oligonucleótido específico denominado D2-7 para realizar otro 3' RACE. Así, mediante RT-PCR anidado, se realizó un primer PCR usando los oligonucleótidos específicos D2-3 (S) y 3'race-2 (As) y en el segundo PCR los oligonucleótidos D2-7 (S) y 3'race-3 (As). Se obtuvo un fragmento de ~ 450 pb, el cual se clonó en pGEM-t, y fue secuenciado. Se logró identificar un triplete de paro dentro de la secuencia clonada (figura 26). Cabe mencionar que se realizaron varios intentos para obtener la secuencia completa de la región 3'UTR de la D2; sin embargo, no fue posible amplificar fragmentos con una clara secuencia de cDNA. Lo último puede deberse al hecho de que la región 3'UTR de las D2 es muy larga, hasta de 5 kb en el caso del humano (Buettner y col., 1998) donde se localiza el elemento SECIS a una distancia de aproximadamente 250 pb antes de la señal de poliadenilación. Además, la región 3'UTR presenta numerosos repetidos AUUUA que lo hacen inestable y complican la amplificación por PCR (Gereben y col, 2002).

El extremo 5' del mensajero se obtuvo por RT utilizando el oligonucleótido específico D2-5 y RNA total. Al RT obtenido se le adicionó una cola de dCTP en el extremo 3'. Este transcrito se utilizó como templado del primer PCR con los oligonucleótidos específicos 5' race-1 (S) y D2-5 (As). El producto de esta reacción se utilizó como templado del segundo PCR con los oligonucleótidos 5' race-2 (S) y D2-6 (As). Se obtuvo un fragmento de ~ 500 pb, el cual fue clonado en pGEM-T y secuenciado con oligonucleótidos específicos del vector (pD13 y M13). La secuencia del fragmento se analizó y se confirmó la secuencia correspondiente a una D2; se identificó el codón de inicio ATG que codifica para metionina y se obtuvo una secuencia 5'UTR de ~250 pb (figura 26).

De esta manera se logró clonar un fragmento de cDNA de aprox. 1100 pb que codifica para una desyodasa tipo 2 (figura 27). Dicho fragmento incluye el marco de lectura abierta con los codones de inicio y término de la traducción; el triplete TGA que codifica para selenocisteína, y una región 5'UTR de 250 pb. La alineación de la secuencia de proteína deducida mostró un porcentaje de identidad del 68% con el resto de las D2 de vertebrados, mientras que para D1 y D3 la identidad fue de 46 y

61% respectivamente. Estos resultados y los descritos para la caracterización cinética de la vía ORD, apoyaron que la actividad T₄-ORD hepática en *Ch. punctatum* es catalizada por una D2.

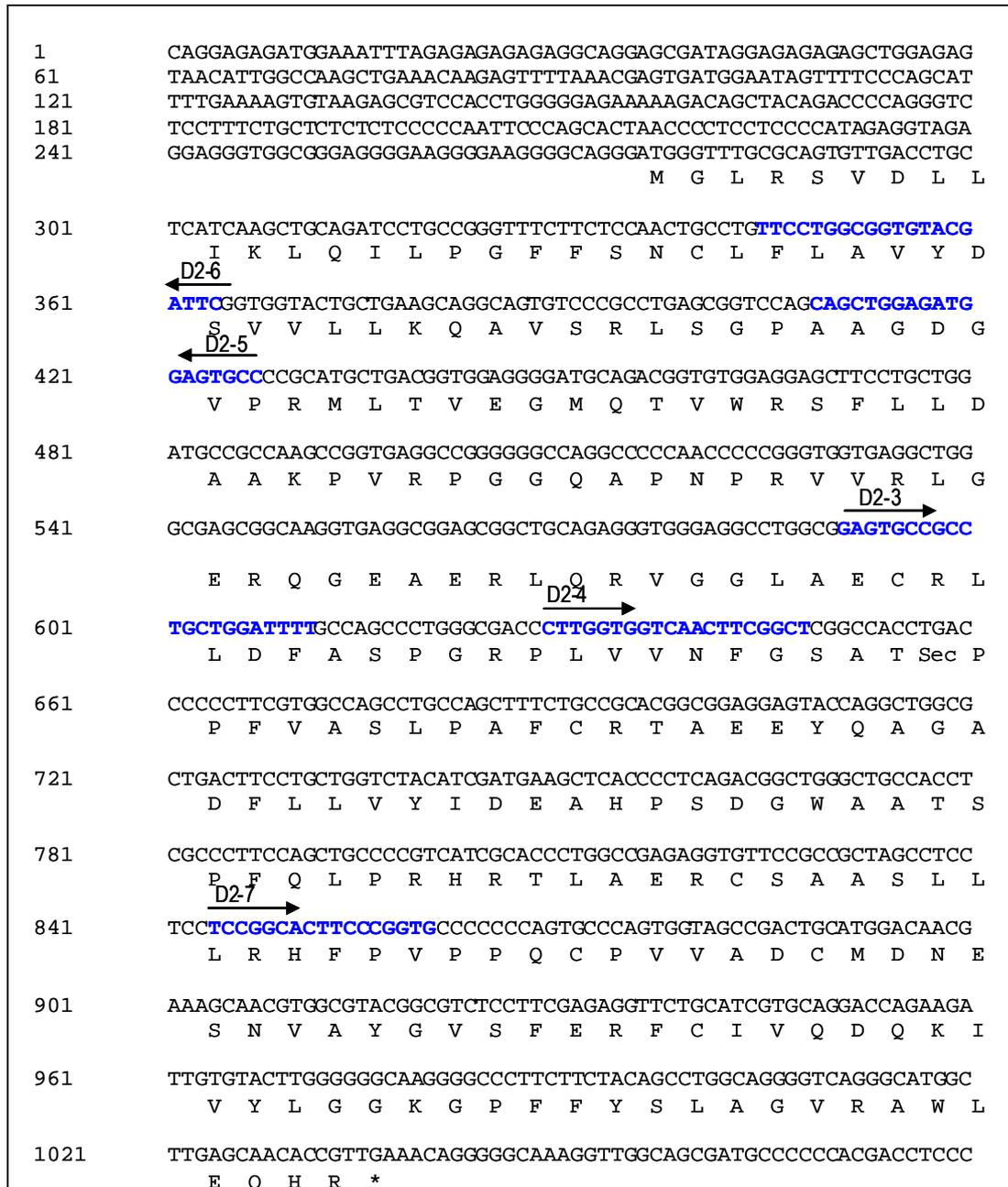


Figura 26. Secuencia de nucleótidos completa del fragmento de cDNA de la D2 de *Ch. punctatum* obtenido después de analizar el conjunto de los resultados de los 3' y 5' rince. Se muestra la posición y orientación de los oligonucleótidos diseñados.

1	CAGGAGAGATGGAAATTTAGAGAGAGAGAGGCAGGAGCGATAGGAGAGAGAGCTGGAGAG
61	TAACATTGGCCAAGCTGAAACAAGAGTTTTAAACGAGTGATGGAATAGTTTTCCAGCAT
121	TTTGAAAAGTGTAAGAGCGTCCACCTGGGGGAGAAAAAGACAGCTACAGACCCCAGGGTC
181	TCCTTTCTGCTCTCTCTCCCCCAATCCCAGCACTAACCCCTCCTCCCATAGAGGTAGA
241	GGAGGGTGGCGGGAGGGGAAGGGGAAGGGCAGGGATGGGTTTGGCGCAGTGTTGACCTGC M G L R S V D L L
301	TCATCAAGCTGCAGATCCTGCCGGGTTTCTTCTCCAACCTGCCTGTTCTGGCGGTGTACG I K L Q I L P G F F S N C L F L A V Y D
361	ATTGGGTGGTACTGCTGAAGCAGGCAGTGTCCTCCGCTGAGCGGTCCAGCAGCTGGAGATG S V V L L K Q A V S R L S G P A A G D G
421	GAGTGGCCCGCATGCTGACGGTGGAGGGGATGCAGACGGTGTGGAGGAGCTTCTGCTGG V P R M L T V E G M Q T V W R S F L L D
481	ATGCCGCCAAGCCGGTGAGGCCGGGGGGCCAGGCCCCCAACCCCGGGTGGTGAGGCTGG A A K P V R P G G Q A P N P R V V R L G
541	GCGAGCGGCAAGGTGAGGCGGAGCGGCTGCAGAGGGTGGGAGGCCTGGCG GAGTGCCCGC E R Q G E A E R L Q R V G G L A E C R L
601	TGCTGGATTTTGCCAGCCCTGGGCGACCCTTGGTGGTCAACTTCGGCTCGGCCACCTGAC L D F A S P G R P L V V N F G S A T Sec P
661	CCCCCTTCGTGGCCAGCCTGCCAGCTTTCTGCCGCACGGCGGAGGAGTACCAGGCTGGCG P F V A S L P A F C R T A E E Y Q A G A
721	CTGACTTCTGCTGGTCTACATCGATGAAGCTCACCCCTCAGACGGCTGGGCTGCCACCT D F L L V Y I D E A H P S D G W A A T S
781	CGCCCTTCCAGCTGCCCCGTATCGCACCCCTGGCCGAGAGGTGTTCCGCCCTAGCCTCC P F Q L P R H R T L A E R C S A A S L L
841	TCCTCCGGCACTTCCCGGTGCCCCCAGTGCCCAGTGGTAGCCGACTGCATGGACAACG L R H F P V P P Q C P V V A D C M D N E
901	AAAGCAACGTGGCGTACGGCGTCTCCTTCGAGAGGTTCTGCATCGTGCAGGACCAGAAGA S N V A Y G V S F E R F C I V Q D Q K I
961	TTGTGTAAGTGGGGGGCAAGGGGCCCTTCTTCTACAGCCTGGCAGGGGTGAGGGCATGGC V Y L G G K G P F F Y S L A G V R A W L
1021	TTGAGCAACACCGTTGA E Q H R *

Figura 27. Secuencia de nucleótidos y de aminoácidos deducida del fragmento de cDNA que codifica para la D2 en el hígado de *Ch.punctatum*. El codón que codifica para selenocisteína se muestra en color morado. Los codones de de inicio y de paro se muestran en color rojo

Ante la dificultad de obtener la secuencia completa de la región 3'UTR de la D2 en *Ch.punctatum*, se construyó una quimera uniendo el fragmento de cDNA de 1100 pb con un fragmento de aproximadamente 400 pb que incluye el elemento SECIS del pez óseo *F. heteroclitus*, con la finalidad de expresar *in vitro* y

caracterizar la enzima recombinante. El RNAm que codifica para D2 es el más grande de las 3 desyodasas, con un tamaño de hasta 5 kb. Cabe mencionar que la construcción está lista para su expresión, lo cual no se realizó en el presente trabajo.

2.2 Clonación y caracterización de la D3 de la vía IRD

Como se mencionó previamente, mediante RT-PCR *Touchdown* a partir de RNA total de hígado y utilizando un par de oligonucleótidos degenerados, se amplificó un fragmento inicial de ~150 pb que fue clonado en pGEM-T y secuenciado (figura 28). Dicho fragmento presentó un porcentaje de identidad del 75% con las D3 de vertebrados reportadas, el cual fue mayor que para las D1 y D2. A partir de la secuencia de este fragmento inicial, se diseñaron oligonucleótidos específicos (D3-1 y D3-2 / D3-3 y D3-4) para extender el cDNA hacia los extremos 3, y 5' mediante RACE. Para el 3'RACE se realizó un RT-PCR anidado. En el primer PCR se utilizó como templado el cDNA obtenido con el oligonucleótido dT-adaptor y como cebadores el oligonucleótido específico D3-1 (S) y el oligonucleótido 3'race-2 (As). En el segundo PCR se empleó como templado el producto del primer PCR y como cebadores el par de oligonucleótidos específicos, D3-2 (S) y 3'race-3 (As). En el segundo PCR se obtuvo un fragmento de ~ 800 pb, el cual se clonó en pGEM-T y fue secuenciado. Dicha secuencia incluye la región 3'UTR.



Figura 28. D3 de *Ch. Punctatum*. Secuencia (nucleótidos y aminoácidos deducidos) del Fragmento Inicial. Se muestra la localización y secuencia de los oligonucleótidos diseñados para realizar los 3' y 5'RACEs

Para el 5' RACE, se realizó un RT con RNA total, utilizando el oligo específico D3-3. Al RT obtenido se le adicionó una cola de dCTP en el extremo 3'. Este transcrito se utilizó como templado del primer PCR con los oligonucleótidos específicos 5'race-1 (S) y D3-3 (As). El producto de esta reacción se utilizó como templado del segundo PCR con los oligonucleótidos 5'race-2 (S) y D3-4 (As). Se obtuvo un fragmento de ~ 500 pb, el cual fue clonado en pGEM-T y secuenciado con oligonucleótidos específicos del vector (pD13 y M13).

Con los fragmentos generados mediante 3' y 5' RACE, se logró obtener la secuencia completa del cDNA que codifica para la D3 de tiburón (número de acceso en GenBank: EU275162). La secuencia de cDNA y de proteína deducida se muestra en la figura 29. La clona completa de la D3 de *Ch. punctatum* fue de 1298 pb e incluye los codones de inicio y de paro, el triplete TGA que codifica para el aminoácido selenocisteína se localiza en la posición 123 de la secuencia de aminoácidos. La señal de poliadenilación consenso (AATAAAA) se localizó en los nucleótidos 1283-1288. En la región 3'UTR se identificó la secuencia de inserción para selenocisteína (SECIS) en la posición 1067-1168. La estructura secundaria del elemento SECIS corresponde a la forma 2 (figura 30-A) y su secuencia de nucleótidos mostró una identidad del 70% con la de tilapia y pez pulmonado (figura 30-B). La proteína deducida a partir de la secuencia de nucleótidos fue de 259 aminoácidos, con un PM predicho de 29.4 kDa y un punto isoeléctrico de 7.8.

1	GAGTAGCAGGGAGATACTGCTGGGTTTTAGGCTTGTACCAAACCTCCAACCCCAAGCATGGA
1	M D
61	TCTCCTGAAAAGAGATAGTGGCTATTCTCATCCTGCTGCCCCGGTTCTTCATCACGGCGTT
3	L L K E I V A I L I L L P R F F I T A F
121	CATGCTATGGCTACTCGATATCCTATGCATTGCGAAAACGGCTCTTGCCCAAGAGGAGGGA
23	M L W L L D I L C I R K R L L P K R R E
181	ACAGACAGAAGGGAGTGCTGATGATCCTCCTCTGTGTGTCTCGGACACAAACCGAATGTT
43	Q T E G S A D D P P L C V S D T N R M F
241	TACTCTCGAGTCTGTCAAAGCGATTTGGTATGGCCAAAAACTGGACTTCTTCAAGTCTGC
63	T L E S V K A I W Y G Q K L D F F K S A
301	ACACGTGGGCTCGCCGGCTCCAAACACCGAAGTAGTGCAGCTACAGGATCAGAGGAAGGT
83	H V G S P A P N T E V V Q L Q D Q R K V
361	CCGGCTGCTCGACTATAGTCGAGGGGCGAGGCCACTGGTTCCTTAACCTCGGGAGCTGCAC
103	R L L D Y S R G A R P L V L N F G S C T
421	<u>CTGAC</u> CCCCATTCATGGCGCGCCTCAAGTCCTTCCAACGGGTGCTACCCAATACGCGGA
123	Sec P P F M A R L K S F Q R V A T Q Y A D
481	CATTGCGGACTTTCTCCTGATCTACATTGAGGAAGCACACCCCTCTGACGGCTGGGTGAG
143	I A D F L L I Y I E E A H P S D G W V S
541	CACCGATGCCCCCTATAATATCCCAAGGCACCGCTCTCTGGAAGACCGACTGAAAGCAGC
163	T D A P Y N I P R H R S L E D R L K A A
601	TAGTCTGATAGACAAGGAGAGCCCCGGCTGCCTTGTGGTCGCCGACACTATGGACAACCTC
183	S L I D K E S P G C L V V A D T M D N S
661	TTCCAACCTCTGCCTACGGTGCTTACTTCGAAAGGCTGTATGTCCTGCGGGATCAAAAAAGT
203	S N S A Y G A Y F E R L Y V L R D Q K V
721	GGTGTACCAAGGAGGGAGGGGGCCAGAGGGATACAAGATCTCGAACTCAGACTGTGGCT
223	V Y Q G G R G P E G Y K I S E L R L W L
781	TGAACAGTATAAATCACAGAGCCACAATTCCAGCACTGTCTGATTGAAGTGTGAATGAA
243	E Q Y K S Q S H N S S T V L I E V *
841	CTAAATGCACTGAACTTGTAGAAAGGTTAATATATTTTTGAACACAGCTCTTGCTCGGTTC
901	TGTTTTACCGCAATGTTTATGTTTTGAACGAACCTCGTGAAAGACGTAGTGACTCGTAACTTA
961	CGGTTAATGTGACCTTATTTCTCCATGTATATTTGTACATACACTTGAAATTCACTTGTGG
1021	TTATTTTTTATTCTGCTTGACTTGAAGTGAGTCTAAAAATAAAAGTTGGAATTCGCAGGT
1081	<u>ATTCTTGACACTTTTTTTATGAAAGCCGGTTTTTAAATGGCCTCAGTGCCAGGAAACCAC</u>
1141	<u>GCCTGATGTGACAAAGTGTGTTGGGATATAGTGAACCTTGTGAGGTGAGCACTGTATTGG</u>
1201	<u>GTGTGATTAGAAAACAAATGCTTTGAGGATAGATTGTATCTTCACTTTTAGTGTGAAAT</u>
1261	<u>CAAGCCCTTATTATATTTAATAATAAATATTCCAGGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA</u>
1321	AAAA

Figura 29. Secuencia (nucleótidos y aminoácidos) de la D3 del Tiburón *Ch. punctatum*. La clona completa comprende 1298 pb (excluida la cola de poli(A)). El marco de lectura abierto es de 777 pb (nucleótidos 58-832), que incluye al triplete TGA que codifica para Sec en la posición 422-424 (subrayado). El codón de paro TGA en la posición 260 se indica con un asterisco. La secuencia del elemento SECIS se localiza en la posición 1067-1168 (subrayada). La secuencia que forma la estructura secundaria propuesta para SECIS aparece resaltada. Finalmente la señal de poliadenilación AATAAA aparece resaltada.

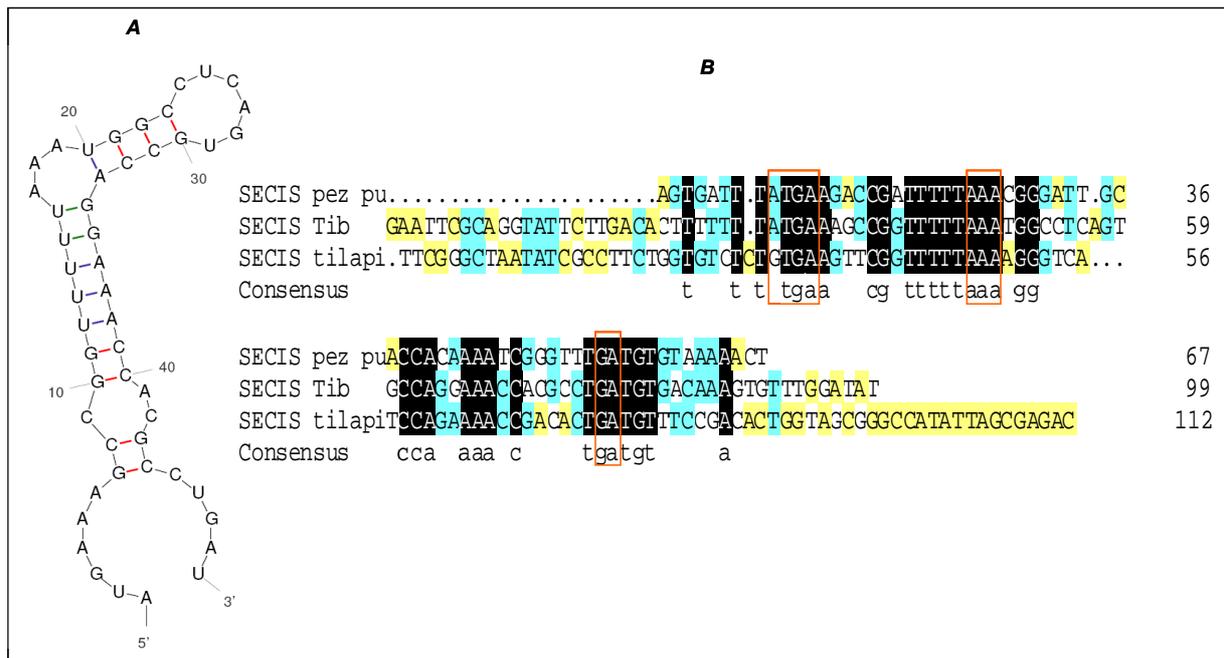


Figura 30. Elemento SECIS de la D3 de *Ch. punctatum*. En **A** se ilustra la estructura secundaria que corresponde a una forma 2. En **B** se muestra la alineación de las secuencias SECIS de pez pulmonado, tiburón y tilapia, en donde los recuadros en rojo corresponden a las regiones consenso del SECIS en diversas especies. En la alineación los colores indican % de identidad, negro: 100%, azul: 75%, amarillo: 33%.

Como en el caso de otras Ds, la sD3 presentó una región hidrofóbica entre los aminoácidos 3 a 31, la cual corresponde a un dominio transmembranal (figura 31). El alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la sD3 con las diversas secuencias de D3 de vertebrados reveló una identidad del 72%, mostrando regiones muy conservadas en el parte carboxilo terminal de la proteína (figura 32). Estas regiones incluyen el denominado “signature domain” FGSCTXP que caracteriza a esta familia de selenoenzimas.

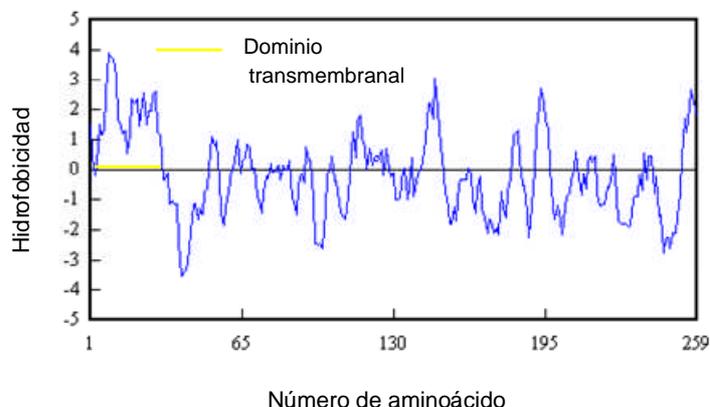


Figura 31. Patrón de hidrofobicidad de la D3 de *Ch. punctatum*

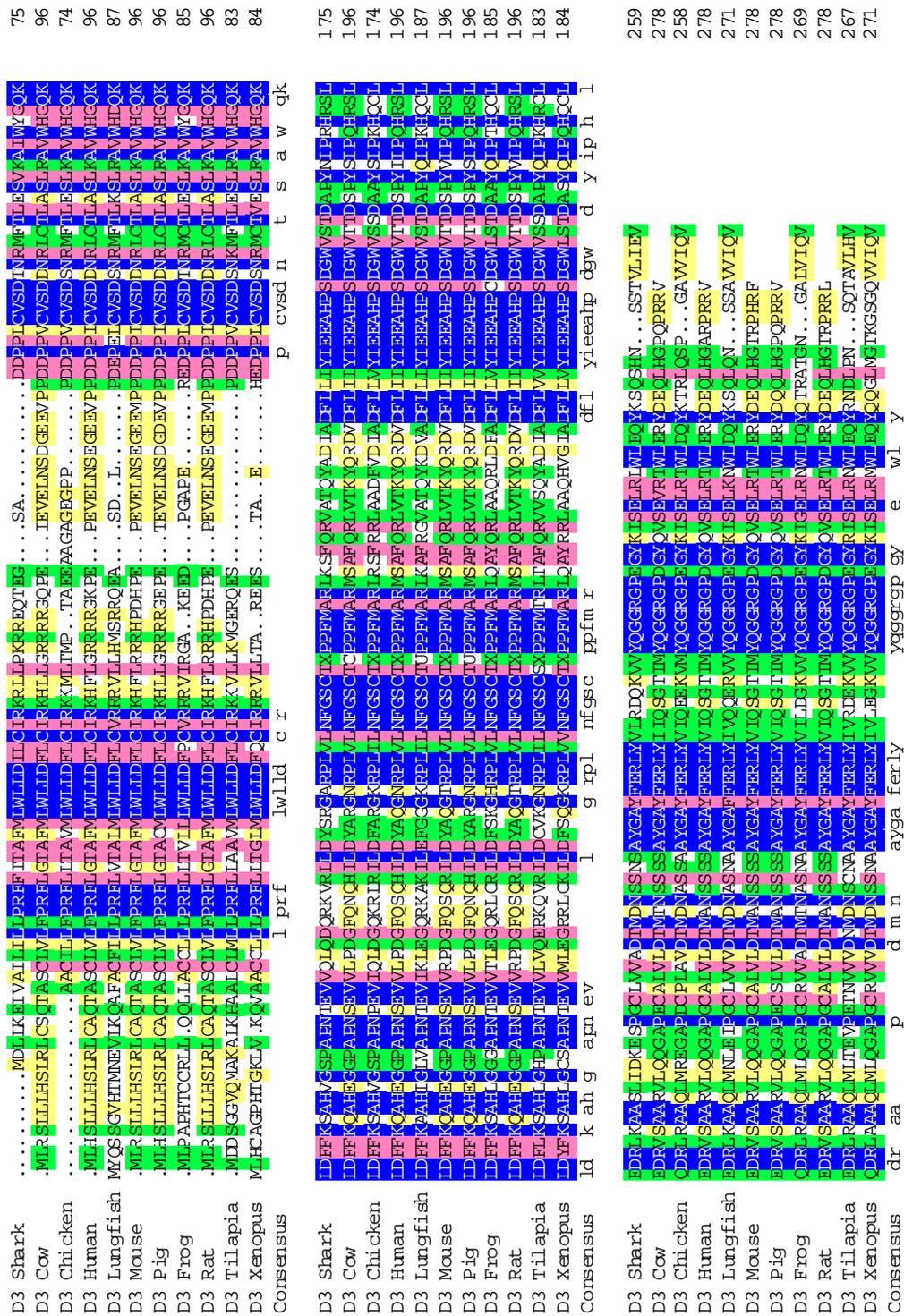


Figura 32 Comparación de la secuencia de aminoácidos de la D3 de *Ch. punctatum* con las reportadas para otras especies de vertebrados. Los colores indican % de identidad, azul: 100%, rosa:75 %, verde 50%, amarillo: 33%.

2.3. Caracterización de la sD3 recombinante

Se realizó la transcripción *in vitro* y la expresión del RNAm de sD3 en ovocitos de *Xenopus leavis*. El cDNA completo fue ligado al vector pXENEX1 diseñado para la expresión de RNA en ovocitos de *X. leavis* (Jeziorski et al., 1998). El cDNA fue linearizado con HindIII, purificado y se usó para transcribir el RNA usando T7 polimerasa. Se inyectaron 30 ovocitos con 50 nL de RNA y fueron incubados por 4 días a 18°C. Posteriormente se preparó un homogenado para caracterizar la enzima recombinante. La expresión del cDNA de la sD3 resultó en una proteína con características cinéticas similares a la enzima nativa. La proteína recombinante presento una K_m para T_3 de 5.5 nM (figura 33 A). Un mecanismo de reacción secuencial a juzgar por el gráfico de dobles recíprocas de la cinética de sustrato (T_3) a distintas concentraciones fijas de cofactor (figura 33 B). El valor de K_m verdadero para T_3 fue de 2 nM. La preferencia por el sustrato fue $T_3 > T_4 > rT_3$ (figura 33 C). Se evaluó el efecto de PTU (1 mM) y el resultado mostró insensibilidad a dicho agente (figura 33 D).

La presencia de los osmolitos orgánicos urea y TMAO en el medio de incubación mostró diferentes efectos sobre la afinidad de la proteína recombinante sD3 por el sustrato. Cuando se realizó el ensayo de desyodación en solución amortiguadora de fosfatos, pH 6.5, la enzima presenta una K_m aparente para T_3 de 10 nM, mientras que en la presencia de urea o TMAO este valor fue 50 o 9.7 nM respectivamente. En la presencia de urea más TMAO, el valor de K_m de la enzima permanece en el mismo rango que cuando se incubó con buffer de fosfatos. En términos de la afinidad por el sustrato de la enzima, estos cambios representan una disminución de 5 veces en el caso de la urea, mientras que el valor de K_m no se modificó cuando en la mezcla de reacción se incluyó TMAO solo o combinado.

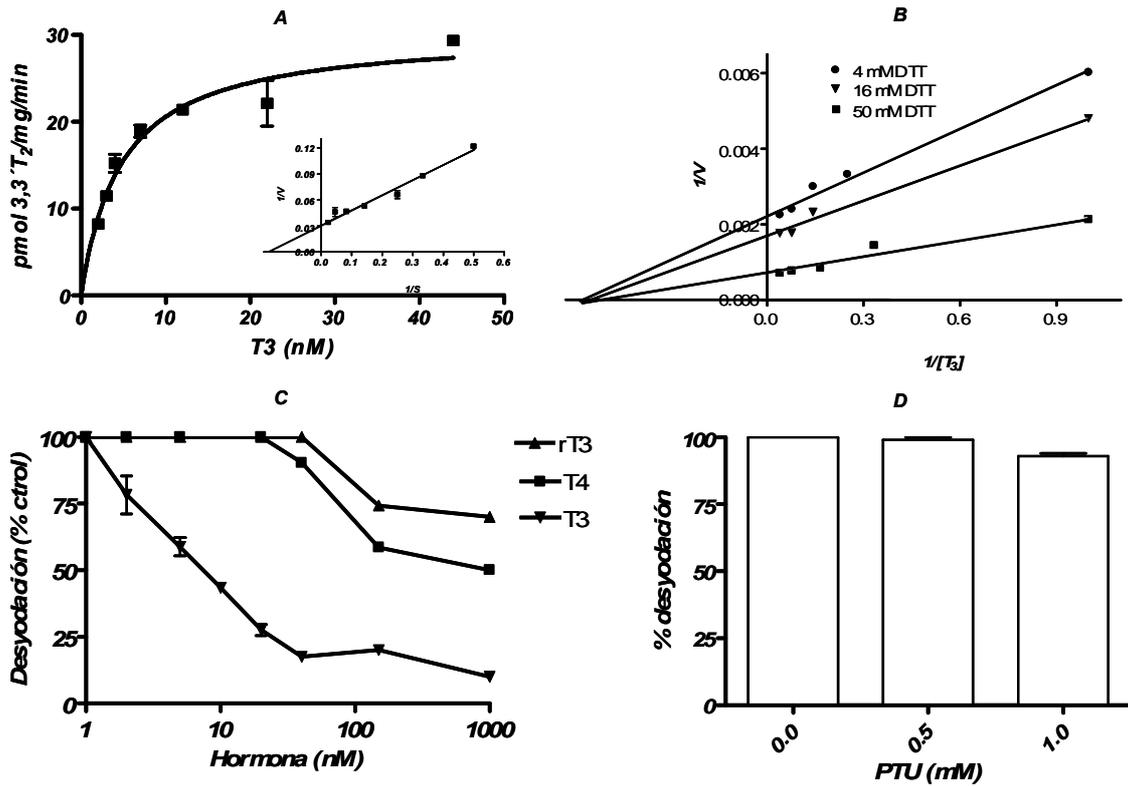


Figura 33. Caracterización Cinética de la sD3 Recombinate. En **A** se ilustra la velocidad de reacción (actividad expresada como pmol 3,3'-T₂/mg/min) en función de la concentración de sustrato. El inserto muestra la grafica de Lineweaver-Burk. El panel **B** corresponde a la grafica de dobles recíprocos para la actividad dependiente del sustrato a diferentes concentraciones fijas de cofactor. En **C** se muestra la especificidad por el sustrato y en **D** el efecto del PTU en la actividad desyodativa T₃-IRD.

DISCUSION

La actividad hepática ORD ha sido la vía más estudiada en todas las clases de vertebrados. En el caso de los endotermos, el hígado es el órgano que más la expresa y en su mayor parte la vía esta catalizada por la D1. En contraste, en el hígado de los peces teleósteos, la actividad ORD es catalizada por D1 y por D2 y la expresión de esta última isoenzima es ≈ 20 veces mayor que la del cerebro de ratas hipotiroideas (Valverde-R. y col., 1997, Orozco y col., 1997). En consonancia con esta singularidad de los peces teleósteos, los resultados de esta tesis mostraron que el hígado del tiburón *Ch. punctatum* también expresa los dos isótipos enzimáticos que participan en la vía de activación. Además, y a diferencia del resto de vertebrados adultos, el hígado de este condrictio también expresa el isótipo D3 que cataliza la vía IRD o de inactivación.

En los párrafos que siguen se discute por separado cada uno de los isotipos enzimáticos caracterizados en la presente tesis.

Desyodasa tipo 1 (D1). El uso de $^{125}\text{I-rT}_3$ como sustrato ha sido decisivo para detectar y caracterizar de manera específica actividad D1 en diversas especies de teleósteos (Orozco y Valverde-R., 2005). Hasta donde sabemos, este es el primer estudio en el cual empleando este sustrato, se muestra actividad rT_3 -ORD en el hígado de un pez cartilaginoso. La caracterización cinética de esta vía en *Ch. punctatum* reveló que la actividad enzimática es dependiente del cofactor DTT; tiene una K_m aparente de 102 nM y una V_{\max} de 350 pmol/mg/h; opera a través de un mecanismo de reacción ping-pong y es resistente a la inhibición por PTU a concentraciones de 1 mM. Aunque tiene un valor de K_m sensiblemente menor y es resistente a PTU, el resto de las características operacionales de la vía rT_3 -ORD en *Ch. punctatum* son similares a las reportadas para el isótipo enzimático D1 en peces óseos y en sus contrapartes mamíferas (Orozco y Valverde-R., 2005; Bianco y col., 2002). La actividad D1 se ha caracterizado en homogenados crudos o en microsomas hepáticos de varias especies de teleósteos. Usando homogenados crudos de *F. heteroclitus* y de trucha, los valores de K_m fueron de 84 y 180 nM, respectivamente (Orozco y col., 1997; Finsson y col., 1999; Orozco y col., 2000). Aunque estos valores son semejantes al encontrado en este trabajo para *Ch. punctatum* (102 nM); en microsomas hepáticos del pez teleósteo (turbot) la K_m es

significativamente mayor: 2000 nM (Mol y col., 1998). En cuanto al valor de V_{max} de *Ch. punctatum* (350 pmol/mg/h), este es 10 veces mayor que el de *Fundulus* y trucha (36 y 28 pmol/mg/h, respectivamente); sin embargo hay que considerar que éstos últimos se determinaron en homogenados crudos. La V_{max} de turbot reportada por Mol y col., 1998: 720 pmol/mg/h, es casi el doble del valor obtenido para *Ch. punctatum* (350 pmol/mg/h). Por otro lado, mientras que la D1 de mamíferos (rata, humano, etcétera) es inhibida completamente (~100%) por 1 mM de PTU, en los peces óseos la sensibilidad de la enzima es significativamente menor. A la misma concentración de PTU (1 mM) la D1 del riñón de tilapia prácticamente no se inhibe (~5%), y en el hígado de trucha y *Fundulus* la inhibición es 40% y 10%, respectivamente (Orozco y col., 1997, Orozco y col., 2000). En esta tesis, se encontró una insensibilidad semejante para la enzima en el hígado de *Ch. punctatum*. La resistencia al PTU de las enzimas D1 de peces se ha tratado de elucidar mediante estudios de mutagénesis dirigida que no son del todo concluyentes (Sanders y col., 1997, Berry, 1992, Orozco y col., 2003). Debido a que el PTU es un inhibidor de la D1 acompetitivo con el sustrato y competitivo con el cofactor, se piensa que interactúa con las selenoproteínas formando un complejo enzima-PTU, y que los aminoácidos que flanquean el sitio activo de la proteína podrían ser determinantes estructurales de la mayor o menor sensibilidad al inhibidor. En este sentido, la clonación y caracterización del cDNA que codifica para la D1 en *Ch. punctatum*, resultaría una herramienta de gran utilidad para estudiar estos aspectos.

Por todo lo anterior y aunque aun resta por clonar y expresar la enzima que cataliza la vía rT_3 -ORD en *Ch. punctatum*, es razonablemente válido considerar que la enzima caracterizada en esta tesis con ese sustrato corresponde al isotipo D1. En cuanto al papel que la isoenzima pudiese jugar en esta clase de vertebrados, aún resulta aventurado asignarle una función específica. En el caso de los mamíferos, hasta hace algún tiempo se pensaba que la D1 era la principal fuente de hormona tiroidea activa circulante; el concepto ha cambiado y al parecer la enzima aporta T_3 a la circulación en casos particulares como el hipertiroidismo, la deficiencia de yodo o la tirotoxicosis (Gereben y col., 2008). Aún más, tomando en cuenta que al menos en mamíferos, la sulfatación de los sustratos favorece la actividad IRD de la D1 (Visser 1994), en los peces no es claro el papel que la sulfatación juega en la

desyodación catalizada por la D1. Se ha propuesto incluso, que la D1 en los teleósteos no desyoda el anillo interno de las yodotironinas, lo cual daría como resultado la acumulación de un exceso de sustrato que regularía a la baja la transcripción de la enzima (García y col., 2004). Esto último es apoyado por la observación de que la D1 de microsomas renales de tilapia cataliza de manera insignificante la desyodación del anillo interno de la T₃ y la T₃ sulfatada (Sanders y col., 1997). Por todo lo anterior, el estudio de la D1 se torna particularmente interesante y será importante ampliar el conocimiento de este isotipo en los peces cartilaginosos.

Desyodasa tipo 2 (D2). La caracterización cinética utilizando ¹²⁵I-T₄ como sustrato, reveló la presencia de actividad desyodativa con características de una D2 en la fracción microsomal hepática de *Ch. punctatum*. Esta actividad T₄-ORD tiene una K_m en el rango nanomolar; su mecanismo de reacción es secuencial y es insensible a la acción del PTU en concentraciones de 1 mM. El valor de K_m (1 nM) es semejante al reportado en el hígado de diversas especies de teleósteos: trucha (0.6 a 1 nM; Orozco y col., 1997; Frith y Eales., 1996); american plaice, *Hippoglossoides platessoides* (0.6 a 4 nM; Adams y col, 2000); red drum, *Sciaenops ocellatus* (1.6 nM; VanPutte y col., 2001); esturión de lago (6.7 nM; Plohman y col., 2002), *Fundulus* (0.5 nM, Orozco y col., 2000); tilapia (1.3 nM; Mol y col., 1997); pez gato (1.3 nM; Mol y col., 1998). En *Squalus acanthias*, la única especie de tiburón donde la actividad T₄-ORD se ha caracterizado parcialmente, el valor de K_m (224 nM; Leary y col., 1999) es significativamente más alto que los informados en la literatura y difícilmente se puede asumir que corresponde al isotipo D2. Además, cabe mencionar que en dicho estudio se utilizaron concentraciones de sustrato en el rango de 0 a 125 nM, por lo que esa K_m tendría que ser reconsiderada. Entre los vertebrados, el hígado de los teleósteos es uno de los órganos que presenta la más alta actividad D2 (Orozco y col., 2000). Los resultados de esta tesis muestran que el hígado de *Ch. punctatum* expresa actividad D2 con una V_{max} de 55 pmol/mg/h (0.91 pmol/mg/min). Este valor, sensiblemente mayor que el reportado para microsomas de hígado de tilapia (0.127 pmol/mig/min; Mol et al., 1997), sugiere que la actividad D2 en el hígado de *Ch. punctatum* es de las más abundantes hasta ahora reportadas. La vía T₄-ORD catalizada por la D2 controla las concentraciones

intracelulares de hormona activa (T_3) que puede acceder rápidamente a los receptores nucleares y ejercer su efecto en la expresión génica (Yen y col., 2001). En algunos teleósteos como la tilapia, se ha propuesto que la D2 es la principal fuente generadora de T_3 plasmática (Van der Geyten y col., 1998). La actividad D2 es finamente regulada por diversos factores entre los cuales destacan el aporte de sustrato y producto; es decir, las concentraciones de T_4 y T_3 , respectivamente; así como la composición (carbohidratos, lípidos y proteínas) y aporte calórico (ayuno) del organismo (Leatherland., 1994, Orozco y col., 2005). Por ejemplo, en trucha arcoiris la actividad T_4 -ORD hepática disminuye luego de la administración de T_3 en el alimento, así como después del ayuno (Finnson y Eales., 1999). Otros estudios en tilapia y en *Fundulus* (Mol y col., 1999; Garcia y col., 2004) han mostrado una mayor expresión tanto de la actividad D2 como de su mRNA durante estados hipotiroideos y lo contrario durante hipertiroidismo. Recientemente (Garcia y col., 2007), se ha mostrado que en *Fundulus*, la administración de 3,5- T_2 , una tironina que se consideraba inactiva, disminuye la actividad y la expresión (mRNA) de la D2 hepática. El efecto de la 3,5- T_2 es equipotente al que ejerce la T_3 y ocurre de manera más rápida. Todo lo anterior expande el escenario clásico de la fisiología tiroidea y plantea una serie de nuevas preguntas, algunas de las cuales se resumen en la sección de perspectivas de esta tesis.

De acuerdo a las características cinéticas de la enzima que cataliza la vía T_4 -ORD en *Ch. punctatum*, podemos decir que se trata de una D2, lo cual es apoyado fuertemente por la clonación de un fragmento de cDNA (1080 pb) que presenta un porcentaje de identidad con sus homólogos D2 de diversas especies del 73%. La secuencia de aminoácidos deducida es de 254, con el triplete TGA que codifica para Sec localizado en la posición 128, la cual corresponde al sitio activo de las desyodasas donde están presentes además diversos aminoácidos muy conservados. El fragmento clonado tiene una región 5' UTR de ~270 pb; sin embargo, se sabe que en otros vertebrados la D2 posee una región 5'UTR larga y estructurada de \approx 600 a 700 pb (Gereben y col., 2002). Por esta razón es necesario verificar la secuencia y precisar la longitud de esta región en *Ch. punctatum*. En cuanto a la región 3'UTR de las D2, se sabe que esta tiene una longitud de hasta 5 kb con numerosos repetidos AUUUA que hacen inestable al mRNA (Gereben y col.,

2002). Probablemente esta es la razón por la cual no fue posible obtener la secuencia de esta región en *Ch. punctatum*. El mRNA de la D2 es de los más grandes descritos en vertebrados, con 7.5 kb en humano (Buettner y col., 1998) y rata (Gereben y col., 2001), 8 kb en ratón (Davey y col., 1999), y 6 kb en pollo (Gereben y col., 1999), los más pequeños son los de *Fundulus* con 4.7 kb (Orozco y col., 2002) y pez pulmonado con 1.8 kb (Sutija y col., 2003). En el marco abierto de lectura de varios de los cDNA's que codifican para D2: humano (Salvatore y col., 1999), ratón (Davey y col., 1999), pollo (Gereben y col., 1999), pez pulmonado (Sutija y col., 2003) se ha identificado un segundo codón TGA situado casi al final de la región codificante. Este codón no se identificó en el fragmento de la D2 de tiburón. Finalmente, y aunque no es claro su significado funcional, en algunas especies, se han descrito variantes de la D2 que se expresan de manera tejida específica y muchas de ellas son el resultado de *splicing* alternativo, tal es el caso del hígado y cerebro de pollo (Gereben y col., 2002), la coclea de ratón (Campos-Barros y col., 2000) y diversas líneas y tejidos celulares como cerebro humano, pulmón, riñón, corazón y traquea (Bartha y col., 2000, Gereben y col., 2002, Ohba y col., 2001). En el caso de los peces, se han reportado transcritos de RNAm de diferente longitud en hígado, riñón, corazón y branquia en el pez pulmonado (Sutija y col., 2003).

Desyodasa tipo 3 (D3). En peces, la vía IRD o de inactivación ha sido menos estudiada que la vía ORD o de activación; de hecho, en el caso de los peces cartilagosos, no existen reportes que documenten la caracterización de las enzimas que participan en dicha vía. El presente trabajo es pionero en la caracterización operacional y molecular de la D3 en condriictios. La actividad D3 se ha identificado en todos los grupos de vertebrados y el cDNA se ha clonado en *xenopus* (St. Germain y col., 1994); rata (Croteau y col., 1995); humano (Salvatore y col., 1995); rana (Becker y col., 1995); pollo (Van der Geyten y col., 1997); tilapia (Sanders y col., 1999); pez pulmonado (Sutija y col., 2004); cerdo (Wassen y col., 2004); vaca (Conroy y col., 2005); trucha (Bres y col., 2006) y víbora (Villalobos y col., resultados no publicados, 2009). La enzima se ha expresado y caracterizado totalmente solo en *xenopus*, humano, rata y tilapia. En esta tesis, los resultados de la caracterización cinética de la vía IRD muestran que las propiedades catalíticas de la D3 de tiburón (sD3) son similares a las reportadas para otros vertebrados. Es

decir, la enzima de *Ch. punctatum* tiene una K_m con un valor en el rango nanomolar, un mecanismo de reacción secuencial, la actividad no se ve afectada por PTU y la preferencia por los sustratos es $T_3 > T_4$. El valor de V_{max} aparente para esta D3: 2.7 pmol/mg/h (0.045 pmol/mg/min) es de los más altos reportados hasta la fecha en peces, aún más que en las branquias de tilapia (0.016 pmol/mg/min; Mol y col., 1997) o el hígado de trucha (Johnston y Eales., 1995). Además de estas características cinéticas y operacionales, la sD3 clonada en esta tesis comparte un alto grado de identidad (72%) con los otros miembros de esta subfamilia de desyodasas. Esta elevada conservación estructural refleja el importante papel que juega esta enzima durante el desarrollo en los vertebrados.

En términos funcionales, la sD3 exhibe al menos dos características distintivas que ameritan estudios adicionales. Entre los vertebrados adultos la presencia de D3 en el hígado parece ser una característica única de algunas especies de peces. Además de este trabajo, la presencia de actividad D3 hepática en peces adultos, se ha reportado en trucha (Johnston y Eales., 2005), american plaice (Adams y col., 2000), esturión de lago (Plohman y col., 2002) y salmón del atlántico y del pacífico (Plate y col., 2002, Specker y col., 2000). En otros vertebrados, la expresión hepática de la D3 está restringida a etapas del desarrollo embrionario y neonatal; se ha reportado en embriones humanos (Richard y col., 1998), rata neonatal (Galton y col., 1991, Bates y col., 1999), embrión de pollo (Valverde y col., 1993), renacuajos (Becker y col., 1997), cocodrilo en etapa embrionaria (Shepherdley y col., 2002) y en agnatos durante la fase larvaria (Valverde-R y col., 2004). Durante la embriogénesis y en estadios ontogenéticos especie específicos, la actividad D3 contribuye a la homeostasis local de las hormonas tiroideas al prevenir la exposición prematura de los tejidos en desarrollo a niveles elevados de TH (Valverde-R y col., 1993; Bianco y col., 2002). Por lo tanto, y aunque su papel fisiológico debe ser elucidado, la información disponible permite proponer que en algunos peces y en la vida adulta, la D3 hepática continua jugando un papel protector asociado a la exposición a cantidades considerables de HT exógenas ingeridas por aquellas especies predadoras que devoran a su presa completa, lo cual se atribuye a la ingesta de tejido tiroideo el cual pudiera contribuir a la elevación en los niveles de TH. En este sentido, en trucha (Eales y Finnson.,

1991, Sweeting y Eales., 1992, MacLatchy y Eales., 1993, Bres y col., 2006) y tilapia (Mol y col., 1999, Van der Geyten y col., 2005) alimentadas con alimento suplementado con T_3 , solamente incrementa de manera significativa la actividad D3 del hígado, pero no la de otros tejidos como las branquias, cerebro y riñón. Una correlación similar entre la dieta y la actividad D3 se observó en el esturión del lago, cuando el cambio de dieta de *pellets* de trucha a zooplancton marino, redujo los niveles de T_3 plasmática e incrementó la actividad T_3 -IRD hepática e intestinal (Plohman y col., 2002). Comparado con los ambientes de agua dulce y terrestre, este incremento de la D3 hepática en respuesta a una fuente exógena de TH es consistente con la estrategia alimentaria de las especies silvestres y el relativamente alto nivel de yodo en los metabolitos de la cadena alimentaria marina y el flujo de nutrientes (Valverde-R y col., 2004, Heyland y Moroz., 2005, Yun y col., 2005). Al parecer el contenido de T_3 en la dieta puede jugar un papel importante en regular la actividad desyodativa hepática en especies piscívoras. Un hecho que apoya esta propuesta es que la actividad específica de la D3 hepática es significativamente mayor (en el orden de pmol) en el hígado de *Ch. punctatum* que en tilapia (rango de fmol) (Van der Geyten y col., 2005) una especie de agua dulce y herbívora. Esta correlación entre hábitos alimentarios y expresión de la D3 se ha documentado durante el periodo parasitario de los agnatos en donde la actividad T_4 y T_3 -IRD es significativamente mayor en el intestino que en el hígado (Eales y col., 1997, McLeese y col., 2000). Todos estos datos sugieren que el intestino y el hígado son sitios primarios de desyodación de TH en craneados inferiores y peces carnívoros y apoyan el posible papel protector que juega la D3.

Tomando en cuenta el peculiar mecanismo de osmorregulación de los peces cartilaginosos, en esta tesis se evaluó el efecto de los osmolitos TMAO y urea en la actividad desyodativa de la sD3 recombinante. Los resultados mostraron que la presencia de urea altera significativamente las propiedades catalíticas de la D3, de manera particular, la afinidad por el sustrato (K_m) se redujo significativamente. Como era de esperarse, el TMAO solo o en combinación con la urea contrarresta el efecto de esta última. Aunque estos datos no coinciden del todo con lo reportado por Leary y col., 1999 si son consistentes con la estrategia ureosmótica de los elasmobranquios marinos. La urea y el TMAO son los dos principales osmolitos

fisiológicos en este grupo de hiper-osmorreguladores ureotélicos. En especies de tiburones marinos como *Ch. punctatum*, la urea en el plasma y en las células musculares alcanza concentraciones de 300 y 200 mM, respectivamente. Los efectos desestabilizantes de la urea son balanceados por el TMAO, el cual constituye aproximadamente un 90% de las metilaminas presentes en el plasma de elasmobranquios (Anderson y col., 2007, Treberg y col., 2006, Hazon y col., 2003). Los resultados del presente trabajo sugieren que en *Ch. punctatum*, el TMAO juega un papel importante protegiendo la actividad catalítica de la D3 al contrarrestar los efectos desnaturalizantes de la urea.

En conjunto y desde una perspectiva evolutiva, la actividad de las desyodasas en los vertebrados parece corresponder a una función ancestral que regula de manera precisa y en tiempo y lugar, la captura celular y la bioactividad de compuestos yodados. El hecho de que la vía T₃-IRD y la actividad D3 estén muy conservadas y se expresen durante la vida adulta en el hígado de especies predadoras que devoran completa a su presa, es consecuente con su historia filogenética ancestral, así como con su importancia fisiológica evitando la exposición a concentraciones inapropiadas de hormonas tiroideas exógenas.

CONCLUSIONES

1. El hígado del tiburón *Ch. punctatum* presenta actividad rT₃-ORD; T₄-ORD y T₃-IRD
2. La vía ORD o de activación, está catalizada por los isotipos enzimáticos D1 y D2 y la vía IRD (inactivación) por el isotipo D3.
3. La clonación de un fragmento de cDNA (1100 pb) que presenta 68% de identidad con las D2 de otros vertebrados, confirma parcialmente la expresión de este isotipo en el hígado de *Ch. punctatum*.
4. La expresión y caracterización del cDNA completo que codifica para el isotipo D3, confirma la expresión de esta desyodasa en el hígado del tiburón *Ch. punctatum*.

PERSPECTIVAS

En lo inmediato y para concluir esta primera aproximación al estudio de las desyodasas hepáticas en esta especie de condictio se requiere:

Completar la clonación del cDNA que codifica para la D2 y por otro lado expresar y caracterizar la proteína quimérica en ovocitos de *X. laevis*.

Clonar y expresar el cDNA que codifica para la D1 hepática.

Por otra parte es evidente que los resultados de esta tesis expanden el horizonte experimental de la fisiología tiroidea y plantean, entre otras, la siguiente interrogante:

¿La expresión hepática de los tres isotipos enzimáticos es exclusiva de los peces piscívoros, o también ocurre en otros vertebrados que devoran entera a su presa?

BIBLIOGRAFIA

Aceves C., Pineda O., Ramirez I., de la Luz Navarro M. y Valverde-R C. 1999. Mammary type I deiodinase is dependent on the suckling stimulus: Differential role of norepinephrine and prolactin. *Endocrinology*. 140: 2948–2953.

Aceves C., Rojas-Huidobro R., Marina N., Morales M.T. y Mena F. 1999. Mammary gland sympathetic innervation is a major component in type 1 deiodinase regulation. *Endocrine*. 11: 115–121.

Adams B.A., Cyr D.G., Eales J.G. 2000. Thyroid hormone deiodination in tissues of American plaice, *Hippoglossoides platessoides*: Characterization and short-term responses to polychlorinated biphenyls (PCBs) 77 and 126. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 127,:367–378.

Anderson W.G., Mariash N.C. y Oppenheimer H.J. 2000. Thyroid Hormone Action: Molecular Actions of Thyroid Hormone. En: *The thyroid: A Fundamental and Clinical Text* (Braverman E., y Utiger RD, Eds), 8 ed, pp 35-42. Lippincott Williams & Wilkins, New York.

Anderson W. G., Taylor J. R., Good J. P., Hazon N., Grosell M. 2007. Body fluid volume regulation in elasmobranch fish. *Comp. Biochem. Physiol. A Molec. Integrative Physiol.* 148: 3-13.

Ashburner M. 1973. Sequential gene activation by ecdysone in polytene chromosomes of *Drosophila melanogaster*. I. Dependence upon ecdysone concentration. *Dev. Biol.* 35: 47–61.

Baqui M.M., Gereben B., Harney J.W., Larsen P.R. y Bianco A.C. 2000 Distinct subcellular localization of transiently expressed types 1 and 2 iodothyronine deiodinases as determined by immunofluorescence confocal microscopy. *Endocrinology*. 141: 4309–4312.

Baqui M., Botero D., Gereben B., Curcio C., Harney J.W., Salvatore D., Sorimachi K., Larsen P.R., Bianco A.C. 2003. Human type 3 iodothyronine selenodeiodinase is located in the plasma membrane and undergoes rapid internalization to endosomes. *J Biol Chem*. 278:1206-1211.

Bartha T., Kim S.W., Salvatore D., Gereben B., Tu H.M., Harney J. W., Rudas, P. y Larsen P.R. 2000. Characterization of the 5'-flanking and 5'-untranslated regions of the cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-responsive human type 2 iodothyronine deiodinase gene. *Endocrinology*. 141: 229–237.

Bates J.M., St Germain D.L. y Galton V.A. 1999. Expression profiles of the three iodothyronine deiodinases, D1, D2, and D3, in the developing rat. *Endocrinology*. 140: 844–851.

Bauer K, Carmeliet P, Schulz M, Baes M, Deneef C. 1990. Regulation and cellular localization of the membrane-bound thyrotropin-releasing hormone-degrading

enzyme in primary cultures of neuronal, glial and adenohypophyseal cells. *Endocrinology*. 127: 1224-1233.

Bellarbarba D., Peterson R.E., Sterling K. 1968. An improved method for chromatography of iodothyronines. *J. Clin. Endocr. Met.* 28: 305-307.

Bernal J., Guadaño-Ferraz A. y Morte B. 2003. Perspectives in the study of thyroid hormone action on brain development and function. *Thyroid*. 13: 1005-1012.

Berry M.J. 1992. Identification of essential histidine residues in rat type I iodothyronine deiodinase. *J. Biol. Chem.* 267: 18055-18059.

Bianco A.C., Salvatore D., Gereben B., Berry M.J., Larsen P.R. 2002. Biochemistry, cellular and molecular biology and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases. *Endocr. Rev.* 23:38–89.

Bianco C.A., Maia A.L., Seixas da Silva W. y Christoffolete A.M. 2005. Adaptive activation of thyroid hormone and energy expenditure. *Bioscience Rep.* 25: 191-208.

Becker K. B., Schneider M. J., Davey J. C., y Galton V. A. 1995. The type III 5-deiodinase in *Rana catesbeiana* tadpoles is encoded by a thyroid hormone-responsive gene. *Endocrinology*. 136: 4424-4431.

Becker K.B., Stephens K.C., Davey J.C., Schneider M.J., Galton V.A. 1997. The type 2 and type 3 iodothyronine deiodinase play important roles in coordinating development in *Rana catesbeiana* tadpoles. *Endocrinology* 138: 2989-2997.

Bentley P.J. 1998. The chemical structure, polymorphism, and evolution of hormones. En: *Comparative Vertebrate Endocrinology*. (P.J.. Bentley, Ed). Pp 94-95. Cambridge university Press. UK.

Berry M.J., Banu L. y Larsen P.R. 1991. Type I iodothyronine deiodinase is a selenocysteine-containing enzyme. *Nature*. 349: 438–440.

Berry M. J. 1992. Identification of essential histidine residues in rat type I iodothyronine deiodinase. *J. Biol. Chem. A.* 67: 18055-18059.

Biddiscombe S. e Idler D.R. 1984. Plasma levels of thyroid hormones in sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) decrease before spawning. *Gen. Comp. Endocrinol.* 52: 467-470.

Boelen A., Kwakkel J., Thijssen-Timmer D. C., Alkemade A., Fliers E. y Wiersinga W. M. 2004. Simultaneous changes in central and peripheral components of the hypothalamus-pituitary-thyroid axis in lipopolysaccharide induced acute illness in mice. *J. Endocrinol.* 182: 315–323.

Bradford M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72: 249-254.

- Bres O., Plohman C.J., Eales G. 2006. A cDNA for a putative type III deiodinase in the trout (*Oncorhynchus mykiss*): influence of holding conditions and thyroid hormone treatment on its hepatic expression. *Gen. Comp. Endocrinol.* 145: 92-100.
- Bromage N.R. 1975. The effects of mammalian thyrotropin-releasing hormone on the pituitary-thyroid axis of teleost fish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 25:292-297.
- Brown C.L., Dashow L., Epple A.W., Stetson M.H. 1982 Thyroid hormone clearance kinetics in adult sea lampreys, *Petromyzon marinus*. *Gen Comp Endocrinol* 47:333–339.
- Bucciarelli G., Di Filippo M., Costagliola D., Alvarez-Valin F., Bernardi G. y Bernardi G. 2009. Environmental genomics: a tale of two fishes. *Mol. Biol. Evol.* En prensa.
- Buettner C., Harney J. W., y Larsen P.R. 1998. The 3'-untranslated region of human type 2 iodothyronine deiodinase mRNA contains a functional selenocysteine insertion sequence element. *J. Biol. Chem.* 273: 33374 – 33378.
- Buettner C., Harney J. W. y Larsen P.R. 2000. The role of selenocysteine 133 in catalysis by the human type 2 iodothyronine deiodinase. *Endocrinology.* 141: 4606–4612.
- Burmeister L.A., Pachucki J. y St Germain D. L. 1997. Thyroid hormones inhibit type 2 iodothyronine deiodinase in the rat cerebral cortex by both pre- and posttranslational mechanisms. *Endocrinology* 138. 5231–5237.
- Byamungu N., Cornielle S., Mol K., Darras V. y Kühn. 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.
- Callebaut I., Curcio-Morelli C., Mornon J.P., Gereben B. Buettner C., Huang S., Castro B., Fonseca T. L., Harney J. W., Larsen P. R. y Bianco A.C. 2003. The iodothyronine selenodeiodinases are thioredoxin-fold family protein containing a glycoside hydrolase clan GH-A-like structure. *J. Biol. Chem.* 278: 36887–36896.
- Campos-Barros A., Hoell T., Musa A., Sampaolo S. Stoltenburg G., Pinna G., Eravci M., Meinhold H. y Baumgartner A. 1996. Phenolic and tyrosyl ring iodothyronine deiodination and thyroid hormone concentrations in the human central nervous system. *J. Clin. Endocrinol Metab.* 81: 2179–2185.
- Campos-Barros A., Amma L.L., Faris J.S., Shailam R., Kelley M.W. y Forrest D. 2000. Type 2 iodothyronine deiodinase expression in the cochlea before the onset of hearing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97: 1287–1292.
- Capen C.Ch. 2000. Comparative anatomy and physiology: Comparative aspects of the thyroid gland. En: *The thyroid: A Fundamental and Clinical Text* (Braverman E., y Utiger RD, Eds), 8 ed, pp 35-42. Lippincott Williams & Wilkins, New York.

Carrasco N. 2000. Thyroid iodide transport: The Na⁺/I⁻ symporter (NIS). En: "The Thyroid. A Fundamental and Clinical Text" (L. E. Braverman, and R. Utiger, Eds.), 8 ed, pp 52-61. Lippincott Williams & Wilkins, New York.

Cecconi S., Rucci N., Scaldaferrì M.L., Masciulli M.P., Rossi G., Moretti C., D'Armiento M. y Ulisse S. 1999. Thyroid hormone effects on mouse oocyte maturation and granulosa cell aromatase activity. *Endocrinology*. 140: 1783–1788.

Celi F.S., Canettieri G., Yarnall D.P., Burns D.K., Andreoli M., Schuldiner A. R., y Centanni M. 1998. Genomic characterization of the coding region of the human type II 5' deiodinase gene. *Mol. Cell. Endocrinol.* 141: 49-52.

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

Chavatte L, Brown BA, Driscoll DM. 2005. Ribosomal protein L30 is a component of the UGA selenocysteine recoding machinery in eukaryotes. *Nat Struct Mol Biol.* 12:408-416.

Chen H., Lin R. J., Schiltz R. L., Chakravarti D., Nash A., Nagy L., Privalsky M. L., Nakatani Y., y Evans R. M. 1997. Nuclear receptor coactivator ACTR is a novel histone acetyltransferase and forms a multimeric activation complex with P/CAF and CBP/p300. *Cell.* 90: 569–580.

Chomczynski P y Sachi N. 1987. Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 162: 156-159.

Cohen N.R., Weintraub D.B., y Wondisford E.F. 2000. Factors that control thyroid function: Thyrotropin. En: "The Thyroid. A Fundamental and Clinical Text" (L. E. Braverman, and R. Utiger, Eds.), 8 ed, pp 202-219. Lippincott Williams & Wilkins, New York.

Connor E.E., Laiakis E.C., Fernandes V.M., Williams J.L., Capuco A.V. 2005. Molecular cloning, expression and radiation hybrid mapping of the bovine deiodinase type II (DIO2) and deiodinase type III (DIO3) genes. *Animal Genetics* 36: 240-243.

Courtin F., Chantoux F., Gavaret J.-M., Toru-Delbauve D., Jacquemin C. y Pierre M. 1989. Induction of Type II 5'-deiodinase activity in cultured rat astroglial cells by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate: Dependence on glucocorticoids. *Endocrinology*. 125: 1277–1281.

Crantz F. R., Silva J.E. y Larsen P.R. 1982. Analysis of the sources and quantity of 3,5,3'-triiodothyronine specifically bound to nuclear receptors in rat cerebral cortex and cerebellum. *Endocrinology*. 110: 367–375.

Croteau W., Whittemore S. L., Schneider M. J. y St Germain D. L. 1995. Cloning and expression of a cDNA for a mammalian type III iodothyronine deiodinase. *J. Biol. Chem.* 270: 16569-16575.

Crow L.G., Ron B., Atkinson S., y Rasmussen L.E.L. 1999. Serum T₄ and serum T₃ concentrations in immature captive whitetip reef sharks, *Triaenodon obesus*. *J.Exp.Zool.* 284:500-504.

Cruz R, Vargas MA, Uribe RM, Pascual I, Lazcano I, Yiotakis A, Matziari M, Joseph-Bravo P. y Charli JL. 2008. Anterior pituitary pyroglutamyl peptidase II activity controls TRH-induced prolactin release. *Peptides*. 29: 1953-1964.

Curcio-Morelli C., Gereben B., Zavacki A.M., Kim B.W., Huang S., Harney J.W., Larsen P.R., Bianco A.C. 2003. In vivo dimerization of types 1, 2, and 3 iodothyronine selenodeiodinases. *Endocrinology* 144:937-94

D' Agati P. y Cammarata M. Comparative analysis of thyroxine distribution in ascidian larvae. 2006. *Cell Tissue Res.* 323: 529–535.

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

Davey J. C., Schneider M. J., Becker K. B., y Galton V. A. 1999. Cloning of a 5.8 kb cDNA for a mouse type 2 deiodinase. *Endocrinology.* 140: 1022 - 1025.

Davies P.H., Sheppard M.C. y Franklyn J.A. 1996. Regulation of type I 5'-deiodinase by thyroid hormone and dexamethasone in rat liver and kidney cells. *Thyroid.* 6: 221–228.

Dawson A., King V.M., Bentley G.E. y Ball G.F. 2001. Photoperiodic control of seasonality in birds. *Journal of Biological Rhythms.* 16: 365–380.

de Jesus L.A., Carvalho S.D., Ribeiro M.O., Schneider M., Kim S.W., Harney J.W., Larsen P. R. y Bianco A.C. 2001. The type 2 iodothyronine deiodinase is essential for adaptive thermogenesis in brown adipose tissue. *J. Clin.Invest.*108: 1379–1385.

Dehal P., Satou Y., Campbell R. K., Chapman J., Degnan B., De Tomaso A., Davidson B. 2002. The draft genome of *Ciona intestinalis*: insights into chordate and vertebrate origins. *Science* 298, 2157-2167

Dentice M., Morisco C., Vitale M., Rossi G., Fenzi G. y Salvatore D. 2003. The different cardiac expression of the type 2 iodothyronine deiodinase gene between human and rat is related to the differential response of the Dio2 genes to Nkx-2. 5 and GATA-4 transcription factors. *Mol. Endocrinol.*17: 1508–1521.

Dentice M., Luongo C., Huang S., Ambrosio R., Elefante A., Mirebeau-Prunier D., Zavacki A.M., Fenzi G., Grachtchouk M., Hutchin M., Dlugosz A.A., Bianco A.C., Missero C., Larsen P.R. y Salvatore D. 2007. Sonic hedgehog-induced type 3 deiodinase blocks thyroid hormone action enhancing proliferation of normal and malignant keratinocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104: 14466–14471.

- Dickhoff W.W., Folmar L.C. y Gorbman A. 1978. Changes in plasma thyroxine during smoltification of coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 36: 229-232.
- Eales J.G. 1972. Radiothyroxine metabolism in several freshwater teleost fishes. *Can. J. Zool.* 50: 623-631.
- Eales J.G. 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 J.G. y Himick B.A. 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 J.G. y Finnson K.R. 1991. Response of hepatic thyroxine 5'-deiodinase of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, to chronic ingestion of 3,5,3'-triiodo-L-thyronine. *J. Exp. Zool.* 257: 230-235.
- Eales J.G., Holmes J.A., McLeese J.M., Youson J.H. 1997. Thyroid hormone deiodination in various tissues of larval and upstream-migrant sea lampreys, *Petromyzon marinus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 106:202-210.
- Eales J.G., McLeese J.M., Holmes J.A., y Youson J.H. 2000. Changes in intestinal and hepatic thyroid hormone deiodination during spontaneous metamorphosis of the sea lamprey, *Petromyzon marinus*. *J. Exper. Zool.* 286: 305-312.
- Edwards C.A., Mungall A.J., Matthews L., Ryder E., Gray D.J., Pask A.J., Shaw G., Graves J.A., Rogers J., Dunham I., Renfree M.B. y Ferguson-Smith A.C. 2008. The evolution of the DLK1-DIO3 imprinted domain in mammals. *PLoS Biol.* 6 (6), E135.
- Evans DH 1993 Osmotic and ionic regulation. En: *The Physiology of Fishes*. (Evans DH, ed). , pp. 315-341. CRC Press, Inc., Boca Raton, FL.
- Farwell P.A., Dubord-Tomasetti S.A., Pietrzykowski. Z.A., Stachelek J.S., y Leonard L.J. 2005. Regulation of cerebellar neuronal migration and neurite outgrowth by thyroxine and 3,3',5'-triiodothyronine. *Devel. Brain. Research.* 154: 121-135.
- Fenton B., Orozco A., y Valverde-R C. 1997. Kinetic characterization of skin inner-ring deiodinase pathways and its correlation with circulating levels of reverse T3 (rT3) in developing rainbow trout. *J. Endocrinol.* 154: 547-554.
- Finnson K.W., y Eales J.G. 1999. Effect of T3 treatment and food ration on hepatic deiodination and conjugation of thyroid hormones in rainbow trout, *Oncorhynchus kisutch*. *Gen Comp Endocrinol.* 115: 379-386.
- Finnson KW, McLeese JM, Eales JG. 1999. Deiodination and conjugation of thyroid hormone conjugates and type I deiodination in liver of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Gen Comp Endocrinol.* 155:387-397.

- Forhead A.J., Jellyman J.K., Gardner D.S., Giussani D.A., Kaptein E., Visser T. J. y Fowden A.L. 2007. Differential effects of maternal dexamethasone treatment on circulating thyroid hormone concentrations and tissue deiodinase activity in the pregnant ewe and fetus. *Endocrinology*. 148: 800–805.
- Fredriksson G., Lebel J.M., Leloup J. 1993. Thyroid hormones and putative nuclear T3 receptors in tissues of the ascidian, *Phallusia mammillata* Cuvier. *Gen Comp Endocrinol* 92:379-87.
- Friesema E.C.H., Jansen J. y Visser T.J. 2005. Thyroid hormone transporters. *Biochem Soc Trans*. 33: 228- 232.
- Frith S.D., Eales J.G. 1996. Thyroid hormone deiodination pathways in brain and liver of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 101,323–332.
- Galton V.A., McCarthy P.T., St Germain D.L., 1991. The ontogeny of iodothyronine deiodinase systems in liver and intestine of the rat. *Endocrinology* 128. 1717-1722.
- Galton V.A., Martinez E., Hernandez A., St Germain E. A., Bates J. M. y St Germain D. L. 1999. Pregnant rat uterus expresses high levels of the type 3 iodothyronine deiodinase. *J. Clin. Invest.* 103, 979-987.
- Galton V.A., Martínez E., Hernández A., St.Germain E.A., Bates J.M y St. Germain D.L. 2001. The type 2 iodothyronine deiodinase is expressed in the rat uterus and induced during pregnancy. *Endocrinology*. 142: 2123-2128.
- Galton V. A., Wood E.T., St Germain E.A., Withrow C. A., Aldrich G., St Germain G. M., Clark A.S. y St Germain D. L. 2007. Thyroid hormone homeostasis and action in the type 2 deiodinase-deficient rodent brain during development. *Endocrinology*. 148: 3080–3088.
- Garcia G, C., Jeziorski, M. C., Valverde-R, C., y Orozco, A. 2004 Effects of iodothyronines on the hepatic thyroid hormone activating pathway in killifish. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 135: 201-209.
- Garcia-G.C. López-Bojorquez I., Nuñez J., Valverde-R C., Orozco A. 2007. 3,5-Diiodothyronine in vivo maintains euthyroidal expression of type 2 iodothyronine deiodinase, growth hormone, and thyroid hormone receptor beta1 in the killifish. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 293(2): R877-83.
- Gereben B., Bartha T., Tu H. M., Harney J. W., Rudas P., y Larsen P. R. 1999. Cloning and expression of the chicken type 2 iodothyronine 5' deiodinase. *J. Biol. Biochem.* 274: 13768 - 13776.
- Gereben B., Goncalves C., Harney J. W., Larsen P.R. y Bianco A.C. 2000. Selective proteolysis of human type 2 deiodinase: A novel ubiquitin-proteasomal mediated mechanism for regulation of hormone activation. *Mol. Endocrinol.* 14, 1697–1708.

Gereben B., Salvatore D., Harney J. W., Tu H.M. y Larsen P. R. 2001. The human, but not Rat, *dio2* gene is stimulated by thyroid transcription factor-1 (TTF-1). *Mol.Endocrinol.*15, 112–124.

Gereben B.,Kollar A.,Harney J. W. y Larsen P.R. 2002. The mRNA structure has potent regulatory effects on type 2 iodothyronine deiodinase expression. *Mol. Endocrinol.*16: 1667–1679.

Gereben B. y Salvatore D. 2005.Pretranslational Regulation of type 2 Deiodinase. *Thyroid.* 15: 855-864.

Gereben B., Zavacki A.M., Ribich S., Kim B.W., Huang S.A., Simonides W.S., Zeöld A. y Bianco A.C. 2008. Cellular and molecular basis of deiodinase-regulated thyroid hormone signaling. *Endocrine Rev.* 29: 898-938.

Goglia F. 2005. Biological Effects of 3,5 Diiodothyronine (T2). *Biochemistry (Moscow).*70 164 172.

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., Dickhoff W.W., Vigna S.R., Clark N.B y Ralph C.L. 1983. The thyroid gland. En: *Comparative Endocrinology*. New York: John Wiley & Sons. Pp: 185-276.

Goswami A, Rosenberg I.N. 1983. Stimulation of iodothyronine outer ring monodeiodinase by dihydroliipoamide. *Endocrinology.* 112:1180–1187.

Goswami A, Rosenberg I.N. 1986. Iodothyronine 5'-deiodinase in brown adipose tissue: thiol activation and propylthiouracil inhibition. *Endocrinology.* 119:916-23.

Goswami A, Rosenberg I.N. 1988. Effects of glutathione on iodothyronine 5'-deiodinase activity. *Endocrinology.* 123:192–202.

Gottfried D.M. 2001. Chondrichthyes (Sharks, Rays and Chimeras).En: *Encyclopedia of Life Sciences*. John Wiley Sons, Ltd.www.els.net.

Guadano-Ferraz A., Obregon M.J., St Germain D.L. y Bernal J. 1997. The type 2 iodothyronine deiodinase is expressed primarily in glial cells in the neonatal rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94: 10391–10396.

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

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

Gribble G.W. 2003. The diversity of naturally produced organohalogenes. *Chemosphere.* 52: 289-297.

Hamlett C.W. 2001. Reproduction in Fish. En: Encyclopedia of Life Sciences. John Wiley Sons, Ltd.www.els.net.

Harvey C.B. y Williams G.R. 2002. Mechanism of Thyroid Hormone Action. *Thyroid*. 12: 441-446.

Hazon N., Wells A., Pillans R. D., Good J. P., Anderson W. G., Franklin C. E. 2003. Urea based osmoregulation and endocrine control in elasmobranch fish with special reference to euryhalinity, *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Molec. Biol.* 136, 685-700.

Hernandez A. y Obregon M.J. 1995. Presence of growth factors-induced type III iodothyronine 5-deiodinase in cultured rat brown adipocytes. *Endocrinology* 136, 4543-4550

Hernandez A., Park J. P., Lyon G. J., Mohandas T. K., y St Germain D. L. 1998. Localization of the type 3 iodothyronine deiodinase (DIO3) gene to human chromosome 14q32 and mouse chromosome 12F1. *Genomics*. 53: 119-121.

Hernandez A., Lyon G. J., Schneider M. J. y St Germain D. L. 1999. Isolation and characterization of the mouse gene for the type 3 iodothyronine deiodinase. *Endocrinology* 140:124-130.

Hernandez A., Fiering S., Martinez E., Galton V. A., y St Germain D. L. 2002. The gene locus encoding iodothyronine deiodinase type 3 (Dio3) is imprinted in the fetus and expresses antisense transcripts. *Endocrinology*. 143: 4483-4486.

Hernandez A. y St Germain D.L. 2002b. Dexamethasone inhibits growth factor-induced type 3 deiodinase activity and mRNA expression in a cultured cell line derived from rat neonatal brown fat vascular-stromal cells. *Endocrinology*. 143: 2652-2658.

Hernandez A. y St Germain D.L. 2003. Activity and response to serum of mammalian thyroid hormone deiodinase 3 gene promoter: Identification of a conserved enhancer. *Mol. Cell. Endocrinol.* 206: 23-32.

Hernandez A., Martinez M.E., Croteau W. y St Germain D.L. 2004. Complex organization and structure of sense and antisense transcripts expressed from the DIO3 gene imprinted locus. *Genomics*. 83: 413-424.

Hernandez A. 2005. Structure and function of the type 3 deiodinase gene. *Thyroid*. 15: 865-874.

Hernandez A., Martinez M.E., Fiering S., Galton V. A. y St Germain D. 2006. Type 3 deiodinase is critical for the maturation and function of the thyroid axis. *J. Clin. Invest.* 116: 476-484.

Hernandez A., Garcia B. y Obregon M.J. 2007. Gene expression from the imprinted Dio3 locus is associated with cell proliferation of cultured brown adipocytes. *Endocrinology* 148, 3968-3976.

- Heyland A., Moroz L.L. 2005. Cross-kingdom hormonal signaling: an insight from thyroid hormone functions in marine larvae. *J. Exp. Biol.* 208: 4355-4361.
- Heyland A., Price A.D., Bodnarova-Buganova M. y Moroz L.L. 2006. Thyroid Hormone Metabolism and Peroxidase Function in Two Non-Chordate Animals. *J. Exp. Zool. (Mol Dev Evol)*. 306B:551-566.
- Higgs D.A. y Eales J.G. 1977. Influence of food deprivation of radiothyronine and radioiodine kinetics in yearling brook trout, *Salvelinus fontinalis*, with a consideration of the extent of L-Thyroxine conversion to 3,5,3'-triiodo-L-Thyronine. *Gen. Comp. Endocrinol.* 78: 29-40.
- Hoffmann R.P y Berry J.M. 2005. Selenoprotein Synthesis: A Unique Translational Mechanism Used by a Diverse Family of Proteins. *Thyroid.* 15: 769-755.
- Holland N. D., y Holland L. Z. 1999. Amphioxus and the utility of molecular genetic data for hypothesizing body part homologies between distantly related animals. *Amer. Zool.* 39: 630-640.
- Huang H., Marsh-Armstrong N. y Brown D. D. 1999. Metamorphosis is inhibited in transgenic *Xenopus laevis* tadpoles that overexpress type III deiodinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96: 962-967.
- Huang S. A., Dorfman D.M., Genest D.R., Salvatore D. y Larsen P. R. 2003. Type 3 iodothyronine deiodinase is highly expressed in the human utero placental unit and in fetal epithelium. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88: 1384-1388.
- Huang S. A., Mulcahey M.A., Crescenzi, A., Chung M., Kim B.W., Barnes C., Kuijt W., Turano H., Harney J. y Larsen P. R. 2005. Transforming growth factor-beta promotes inactivation of extracellular thyroid hormones via transcriptional stimulation of type 3 iodothyronine deiodinase. *Mol. Endocrinol.* 19: 3126-3136.
- Imai Y., Toyoda N., Maeda A., Kadobayashi T., Wang F., Kuma K., Mitsushige N. y Iwasaka T. 2001. Type 2 iodothyronine deiodinase expression is upregulated by protein kinase A-dependent pathway and is downregulated by the protein kinase C-dependent pathway in cultured human thyroid cells. *Thyroid* 11, 899-907.
- 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.
- Jackson R.G. y Sage M. 1973. A comparison of the effects of mammalian TSH on the thyroid glands of the teleost *Galeichthys felis* and the elasmobranch *Dasyatis sabina*. *Comp Biochem Physiol A.* 44: 867-870.
- Jansen J., Friesema C.H.E. Milici C. y Visser J.T. 2005. Thyroid hormone transporters in health and disease. *Thyroid.* 15: 757-768.

- Jakobs T.C., Koehler M.R., Schmutzler C., Glaser F., Schmid M. y Kohrle J. 1997. Structure of the human type I iodothyronine 5'-deiodinase gene and localization to chromosome 1p32-p33. *Genomics*. 42: 361–363.
- Jeziorski M.C., Greenberg R.M., Clark K.S., Anderson P.A.V. 1998. Cloning and functional expression of a voltage-gated calcium channel $\alpha 1$ subunit from jellyfish. *J.Biol.Chem.* 273: 22792-22799.
- Johnson C.E., Eales J.G. 1995. Effects of acclimation and assay temperature on outer- and inner-ring thyroxine and 3,5,3'- triiodo-L-thyronine deiodination by liver microsomes of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *J Exp. Zool.* 272, 426-434.
- Kamiya Y., Murakami M., Araki O., Hosoi Y., Ogiwara T., Mizuma H. y Mori M. 1999. Pretranslational regulation of rhythmic type II iodothyronine deiodinase expression by α -adrenergic mechanism in the rat pineal gland. *Endocrinology* 140: 1272-1278.
- Kaplan M. M., y Yaskoski K. A. 1980. Phenolic and tyrosyl ring deiodination of iodothyronines in rat brain homogenates. *J. Clin. Invest.* 66: 551-562.
- Kardong V.K. 1998. Vertebrates. Origin of Chordates. En: Comparative Anatomy, Function, Evolution. Second Edition. McGraw-Hill Eds. Pp: 47-79.
- Kerkof P.R., Boschwitz D y Gorbman A. 1973. The response of hagfish thyroid tissue to thyroid inhibitors and to mammalian thyroid-stimulating hormone. *Gen. Comp. Endocr.* 21: 231-240.
- Kingsley R.J., Corcoran M.L., Kriderk.I., Kiechbaum K.L. 2001. Thyroxine and vitamin D in the gorgonian *Leptogorgia virgulata*. *Comp. Biochem Physiol A.* 129: 897-907.
- Kinzy SA, Caban K, Copeland PR. 2005. Characterization of the SECIS binding protein 2 com-plex required for the co-translational insertion of selenocysteine in mammals. *Nucleic Acids Res.* 33:5172-5180
- Kim S. W., Harney J. W. y Larsen P. R. 1998. Studies of the hormonal regulation of type 2 5'-iodothyronine deiodinase messenger ribonucleic acid in pituitary tumor cells using semiquantitative reverse transcription-polymerase chain reaction. *Endocrinology.* 139: 4895–4905.
- Kobayashi H., Tsuneki K., Akiyoshi H., Kobayashi Y., Nozaki M., Ouji M. 1983. Histochemical distribution of peroxidase in ascidians with special reference to the endostyle and the branchial sac. *Gen Comp Endocrinol.* 50:172-87
- Kopp P. 1999. Pendred´ s syndrome: identification of the genetic defect a century after its recognition. *Thyroid.* 9: 65-69.
- Kühn E.R., Mol K.A., y Darras V.M. 1993. Control strategies of thyroid hormone monodeiodination in vertebrates. *Zoological Sci.* 10: 873-885.

- Kuiper G.G., Klootwijk W y Visser,T.J. 2003. Substitution of cysteine for selenocysteine in the catalytic center of type III iodothyronine deiodinase reduces catalytic efficiency and alters substrate preference. *Endocrinology*. 144: 2505–2513.
- Kuiper G.G.J.M., Kester M.H.A., Peeters R.P. y Visser T.J. 2005. Biochemical Mechanisms of thyroid hormone deiodination. *Thyroid*. 15. 787-798.
- Kuiper G.G., Klootwijk W., Morvan Dubois G., Destree O., Darras V.M., Van der Geyten S., Demeneix B. y Visser T.J. 2006. Characterization of recombinant *Xenopus laevis* type I iodothyronine deiodinase: Substitution of a proline residue in the catalytic center by serine (Pro132Ser) restores sensitivity to 6-propyl-2-thiouracil. *Endocrinology*. 147: 3519–3529.
- Küpper F.C., Schweigert N., Ar Gall E., Legendre J.-M., Vilter H. y Kloareg B. 1998. Iodine uptake in Laminariales involves extracellular, haloperoxidase- mediated oxidation of iodide. *Planta* 207: 163-171.
- Leatherland J.F., Reddy P.K., Yong A.N. Leatherland A. y Lam T.J. 1990. Hepatic 5'-monodeiodinase activity in teleosts in vitro: a survey of thirty-three species. *Fish Physiol. Biochem.* 8: 1-10.
- Leatherland JF. 1994. Reflections on the thyroidology of fishes: From molecules to humankind. *Guelph Ichthyol Rev.* 2:1–67.
- Leary C.S., Ballantyne S.J. y Leatherland F.J. 1999. Evaluation of thyroid hormone economy in elasmobranch fishes, with measurements of hepatic 5'-monodeiodinase activity in wild dogfish. *J.Exp.Zool.* 248:492-499.
- Lechan M.R. y Feteke C. 2005. Role of thyroid hormone deiodination in the hypothalamus. *Thyroid*. 15:883-897.
- 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. 1986. Biochemistry of deiodination. En: *Thyroid Hormone Metabolism*, Hennemann G (ed). Marcel Dekker, New York.pp: 189-229.
- Leonard J.L., Ekenbarger D.M., Frank S.J., Farwell A.P. y Koehrle J. 1991. Localization of type I iodothyronine 5' deiodinase to the basolateral plasma membrane in renal cortical epithelial cells. *J.Biol. Chem.* 266: 11262–11269.
- Leonard J.L., y Koehrle J. 2000. Intracellular pathways of iodothyronine metabolism. In: "The thyroid: A Fundamental and Clinical Text" (L. E. Baverman, R. D. Utiger, Eds.). Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia. pp. 136-173.
- Leonard JL, Simpson G, Leonard DM 2005 Characterization of the protein dimerization domain responsible for assembly of functional selenodeiodinases. *J Biol Chem.* 280:11093-11100

- Li W., Zhang X., Yang L., Zha J. y Wang Z. 2009. Changes of thyroid hormone levels and related gene expression in Chinese rare minnow (*Gobiocypris rarus*) during 3-amino-1,2,4-triazole exposure and recovery. *Aquat Toxicol.* 92:50-7
- Luer A.C. 2000. Elasmobranchs (Sharks, skates, and rays) as animal models for biomedical research. En: Non Mammalian Animal Models for Biomedical Research. (Woodhead, D.A. ed). CRC Press. United States. Pp. 121-145.
- Luna M., Guzman G., Navarro L., Sánchez de la Peña S., y Valverde-R. C. 1995. Circadian rhythm of type II 5' deiodinase activity in the rat hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Endocrine.* 3: 597-601.
- MacLatchy D.L. y Eales J.G. 1992. Intra- and extra-cellular sources of T₃ binding to putative thyroid hormone receptors in liver, kidney, and gill nuclei of immature rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *J. Exp.Zool.* 262: 22-29.
- MacLatchy D.L., Eales J.G. 1993. Effects of T₃ or T₄ challenge on inner- and outer-ring deiodination of T₃ and T₄ in the liver, kidney and gill of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *J. Exp. Zool.* 265: 637-645.
- Maia A.L., Berry M.J., Saberg R., Harney J.W., y Larsen P.R. 1995. Structural and functional differences in the dio 1 gene mice with inherited type I deiodinase deficiency. *Mol. Endocrinol.* 9: 969 - 980.
- Maia A.L., Kim B. W., Huang S.A., Harney J.W. y Larsen P.R. 2005. Type 2 iodothyronine deiodinase is the major source of plasma T₃ in euthyroid humans. *J.Clin.Invest.* 115: 2524–2533.
- Mandel S.J., Berry M.J., Kieffer J.D., Harney J.W., Warne R. L., y Larsen P.R. 1992. Cloning and in vitro expression of the human selenoprotein, type I iodothyronine deiodinase. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 75: 1133 – 1139.
- Marsh-Armstrong N., Huang H., Remo B.F., Liu T.T. y Brown D.D. 1999. Asymmetric growth and development of the *Xenopus laevis* retina during metamorphosis is controlled by type III deiodinase. *Neuron* 24, 871–878.
- Martin L.L. 1995. Thioredoxin-a fold for all reasons. *Structure.* 3: 245-250.
- McLeese JN, Wright GM, Youson JH, Eales JG 2000 Deiodination activity in extrathyroidal tissues of the Atlantic hagfish, *Myxine glutinosa*. *J. Exp. Zool.* 287:445–452.
- Mol K., Kaptein E., Darras V., de Greef W., Kühn E. y Visser T. 1993. Different thyroid hormone-deiodinating enzymes in tilapia (*Oreochromis niloticus*) liver and kidney. *FEBS.* 321:140-144.
- Mol K. A., Van der Geyten S., Darras V.M., Visser T.J., Kühn E.R. 1997. Characterization of iodothyronine outer ring and inner ring deiodinase activities in the blue tilapia, *Oreochromis aureus*. *Endocrinology.* 138, 1787-1793.

Mol K. A., van der Geyten S., Burel C., Kühn E. R., Boujard T., y Darras V.M. 1998. Comparative study of iodothyronine outer ring and inner ring deiodinase activities in five teleostean fishes. *Fish Physiol. Biochem.* 18: 253–266

Mol K.A., Van der Geyten S., Kühn ER. Y Darras V.M. 1999. Effects of experimental hypo- and hyperthyroidism on iodothyronine deiodinases in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Fish Physiol Biochem.* 20: 201-207.

Moore J.M. y Guy R.K. 2005. Coregulator interactions with the thyroid hormone receptor. *Mol Cell Proteomics.* 4:475-82.

Morvan Dubois G., Sebillot A., Kuiper G. G., Verhoelst C. H., Darras V. M., Visser T.J. y Demeneix B.A. 2006. Deiodinase activity is present in *Xenopus laevis* during early embryogenesis. *Endocrinology* 147: 4941–4949.

Moreno M, de Lange P, Lombardi A, Silvestri E, Lanni A, Goglia F. 2008. Metabolic effects of thyroid hormone derivatives. *Thyroid.* 18:239-53.

Nelson E.R. y Habibi H.R. 2008. Functional significance of a truncated thyroid receptor subtype lacking a hormone-binding domain in goldfish. *Endocrinology.* 149: 4702-4709.

Norris O.D. 1997. Vertebrate Endocrinology. Cap.8. Comparative Aspects of Vertebrate Thyroids.. Tercera edición. Academic press. San Diego California. USA. Pp 268-298

Norris O.D. 1997. Vertebrate endocrinology. Cap.15. Regulation of Calcium and phosphate homeostasis: major clinical disorders associated with calcium metabolism. Pp 557-558.

Ogasawara M, Di Lauro R, Satoh N. 1999. Ascidian homologs of mammalian thyroid peroxidase genes are expressed in the thyroid-equivalent region of the endostyle. *J Exp Zool.* 285:158-69.

Ogasawara M. 2000. Overlapping expression of amphioxus homologues of the thyroid transcription factor-1 gene and thyroid peroxidase gene in the endostyle: insight into evolution of the thyroid gland. *Dev. Genes Evol.* 210: 231-242.

Ohba K., Yoshioka T. y Muraki T. 2001. Identification of two novel splicing variants of human type II iodothyronine deiodinase mRNA. *Mol. Cell. Endocrinol.* 172: 169–175.

Oppenheimer J.H., Schwartz H.L. y Surks M.I. 1972. Propylthiouracil inhibits the conversion of L-thyroxine to L- triiodothyronine: An explanation of the antithyroxine effect of propylthiouracil and evidence supporting the concept that triiodothyronine is the active thyroid hormone. *J. Clin. Invest.* 51: 2493–2497.

Orozco A., Silva E., y Valverde-R. C. 1997. Rainbow trout liver expresses two iodothyronine phenolic deiodinase pathways with the characteristics of mammalian types I and II 5' deiodinases. *Endocrinology.* 138: 254-258.

- Orozco A., Linser P. J., y Valverde-R. C. 2000. Kinetic characterization of outer-ring deiodinase activity (ORD) in the liver, gill and retina of *Fundulus heteroclitus*. *J. Comp. Biochem. Physiol. Part B*. 126: 283-290.
- Orozco A., Jeziorski M.C., Linser, P.J., Greenberg R.M., y Valverde-R C. 2002. Cloning of the gene and complete cDNA encoding a type 2 deiodinase in *Fundulus heteroclitus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 128: 162-167.
- Orozco A., Villalobos P., Jeziorski M.C. y Valverde, R. C. 2003. The liver of *Fundulus heteroclitus* expresses deiodinase type 1 mRNA. *Gen. Comp. Endocrinol.* 130: 84–91.
- Orozco A. y Valverde-R.C. 2005. Thyroid hormone deiodination in fish. *Thyroid*. 15 (8): 799- 813.
- Osborn R.H. y Simpson T.H. 1969. Thyroxine metabolism in plaice (*Pleuronectes platessa* L). *Gen. Comp. Endocrinol.* 13: 524.
- Paris M., Escriva H., Schuber M., Brunet F., Brtko J., Ciesielski F., Roecklin D., Vivat-Hannah V., Jamin E.L., Cravedi J.P., Scanlan T.S., Renaud J.P., Holland N.D., Laudet V. 2008. Amphioxus postembryonic development reveals the homology of chordate metamorphosis. *Curr Biol*. 18: 825-830.
- Patricolo E., Cammarata M., D'Agati P. 2001 Presence of thyroid hormones in ascidian larvae and their involvement in metamorphosis. *J Exp Zool*. 290:426-30
- Peeters R.P., van Toor H., Klootwijk W., de Rijke Y.B., Kuiper G. G., Uitterlinden A.G. y Visser T.J. 2003. Polymorphisms in thyroid hormone pathway genes are associated with plasma TSH and iodothyronine levels in healthy subjects. *J.Clin. Endocrinol. Metab.* 88: 2880–2888.
- Peter R.E. y McKeown B.A. 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.
- Plate E.M., Adams B.A., Allson W.T., Martens G., Hawryshyn C.W., Eales J.G. 2002. The effects of thyroid or a GnRH analogue on thyroid hormone deiodination in the olfactory epithelium and retina of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, and sockeye salmon, *Oncorhynchus nerka*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 127: 59-65.
- Plohman J.C., Dick T.A., Eales J.G., 2002. Thyroid of lake sturgeon *Acipenser fluvescens* II. Deiodination properties, distribution, and effects of diet, growth, and a T₃ challenge. *Gen. Comp. Endocrinol.* 125: 56-66.
- Poppe K., Glinioer D., Tournaye H., Schiettecatte J., Devroey P., van Steirteghem A., Haentjen P y Velkeniers B. 2004. Impact of ovarian hyperstimulation on thyroid function in women with and without thyroid autoimmunity. *J Clin Endocrinol Metab* 89: 3808–3812.

Poppe K., Velkeniers B. y Glinoeer D. 2008. The role of thyroid autoimmunity in fertility and pregnancy. *Nat Clinl Practice Endocrinology & Metabolism*. 4: 394-405.

Randall D, Burggren W, French K. 1997. Ionic and Osmotic Balance. En: Eckert Animal Physiology. Mechanism and Adaptations, 4th ed. WH Freeman & Co., pp. 571–625.

Rapoport B. 2000. Factors that control thyroid function: The Thyrotropin Receptor. En: "The Thyroid. A Fundamental and Clinical Text" (L. E. Braverman, and R. Utiger, Eds)., 8 ed, pp 219-227. Lippincott Williams & Wilkins, New York

Richard K., Hume R., Kaptein E., Sanders J. P., van Toor H., De Herder W. W., den Hollander J. C., Krenning E.P., y Visser T.J. 1998. Ontogeny of iodothyronine deiodinases in human liver. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 83, 2868-2874.

Robbins J. 2000. Thyroid hormone transport proteins and the physiology of hormone binding. En: "The Thyroid. A Fundamental and Clinical Text" (L. E. Braverman, and R. Utiger, Eds)., 8 ed, pp 105-115. Lippincott Williams & Wilkins, New York

Sagar GD, Gereben B, Callebaut I, Mornon JP, Zeold A, Curcio-Morelli C, Harney JW, Luongo C, Mulcahey MA, Larsen PR, Huang SA, Bianco AC. 2008. The thyroid hormone-inactivating deiodinase functions as a homodimer. *Mol Endocrinol* 22:1382-1393

Safran M, Leonard JL. 1991. Comparison of the physicochemical properties of type I and type II iodothyronine 5¹-deiodinase. *J Biol Chem* 266:3233-3238

Salvatore D., Low S. C., Berry M. J., Maia A. L., Harney J. W., Croteau W., St. Germain D. L., y Larsen P. R. 1995. Type 3 iodothyronine deiodinase: cloning, in vitro expression, and functional analysis of the placental selenoprotein. *J. Clin. Invest.* 96, 2421-2430.

Salvatore D., Bartha T., Harney J.W. y Larsen P. R. 1996. Molecular biological and biochemical characterization of the human type 2 selenodeiodinase. *Endocrinology*. 137: 3308–3315.

Salvatore D, Harney JW, Larsen PR. 1999. Mutation of the Secys residue 266 in human type 2 selenodeiodinase alters ⁷⁵Se incorporation without affecting its biochemical properties. *Biochimie*. 81:535–538.

Sánchez E, Vargas MA, Singru PS, Pascual I, Romero F, Fekete C, Charli JL. Y Lechan RM. 2009. Tanycyte pyroglutamyl peptidase II contributes to regulation of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis through glial-axonal associations in the median eminence. *Endocrinology*. 150: 2283-2291.

Sanders JP., Van der Geyten S., Kaptein E., Darras V.M. Kuhn,E. R.,Leonard J.L. y Visser,T.J. 1997. Characterization of a propylthiouracil-insensitive type I iodothyronine deiodinase. *Endocrinology*.138: 5153–5160.

Sanders J. P., van der Geyten S., Kaptein E., Darras V. M., K , E. R., Leonard J. L., y Visser T.J. 1999. Cloning and characterization of type III iodothyronine deiodinase from the fish *Oreochromis niloticus*. *Endocrinology*. 140: 3666–3673.

Santini F., Chiovato L., Ghirri P., Lapi P., Mammoli C., Montanelli L., Scartabelli G., Ceccarini G., Coccoli L., Chopra I. J., Boldrini A., y Pinchera A. 1999. Serum iodothyronines in the human fetus and the newborn: evidence for an important role of placenta in fetal thyroid hormone homeostasis. *J Clin. Endocrinol. Metab.* 84, 493-498.

Sambroni E., Gutieres S., Cauty C., Guiguen Y., Breton B., y Lareyre J.J. 2001. Type II iodothyronine deiodinase is preferentially expressed in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver and gonads. *Mol. Reprod. Dev.* 60 ,338-350.

Sarnat H.B. 1983. The discovery, proof and reproof of neurosecretion (Speidel, 1917; Scharer and Scharer, 1934). *Can J Neurol Sci.* 10: 208-212.

Sawada K, Hummel BC, Walfish PG. 1985. Cytosolic cofactors and dihydrolipoamide stimulate hepatic microsomal 5 deiodination. *Endocrinology*. 117:1259–1263.

Scanlan T.S., Suchland K.L., Hart M.E., Chiellini G., Huang Y., Kruzich P.J., Frascarelli S., Crossley II D:A., Bunzow J.R., Ronca-Testoni S., Lin E.T., Hatton D., Zucchi R., Grandy D.K. 2004. 3-iodothyronamine is an endogenous and rapid acting derivate of thyroid hormone. *Nat Med.* 10: 638-642.

Scanlon F.M., Toft D.A. 2000. Regulation of thyrotropin secretion: Control of thyrotropin release. En: *The thyroid: A Fundamental and Clinical Text* (Braverman E., y Utiger RD, Eds), 8 ed, pp 234-240. Lippincott Williams & Wilkins, New York

Scharer B. 1985. Neurosecretion: the development of a concept: Neurosecretion and the neurosecretory neuron. En: “*Current Trends in Comparative Endocrinology*” (Lofts B. y Holmes W.N, Eds),pp 23-27. Hong Kong University Press.

Schneider M.J., Fiering S.N., PalludS. E., Parlow A.F., St Germain D. L. y Galton V. A. 2001. Targeted disruption of the type 2 selenodeiodinase gene (DIO2) results in a phenotype of pituitary resistance to T4.*Mol. Endocrinol.*15: 2137–2148.

Schneider M.J., Fiering S.N., Thai B., Wu S. Y., St Germain E., Parlow A.F., St Germain D.L. y GaltonV. A. 2006. Targeted disruption of the type 1 selenodeiodinase gene (Dio1) results in marked changes in thyroidhormone economy in mice. *Endocrinology*. 147: 580–589.

Schreiber G. 2002. The evolutionary and integrative roles of transthyretin in thyroid hormone homeostasis. *Journal Endocrinol.* 175: 61–73.

Schroder-van der Elst J. P., van der Heide D., Morreale de Escobar G., y Obregón M. J. 1998. Iodothyronine deiodinase activities in fetal rat tissues at several levels of iodine deficiency: a role for the skin in 3,5,3'-triiodothyronine economy? *Endocrinology*. 139: 2229-2234.

Shepherdley C.A., Daniels C.B., Orgeig S., Richardson S.J., Evans B.K., y Darras V. M. 2002b. Glucocorticoids, thyroid hormones, and iodothyronine deiodinases in embryonic saltwater crocodiles. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 283: R1155-R1163.

Shepherdley C.A, Klootwijk W., Makabe K.W., Visser T.J. y Kuiper G. 2004. An ascidian homolog of vertebrate iodothyronine deiodinase. *Endocrinology.* 145, 1255-1268.

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

Silva JE, Dick TE, Larsen PR. 1978. Contribution of local tissue thyroxine monodeiodination to the nuclear 3,5,3'-triiodothyronine in pituitary, liver, and kidney of euthyroid rats. *Endocrinology.* 103:1196-1207.

Small-Howard A., Morozova N., Stoytcheva Z., Forry E.P., Mansell J.B., Harney J.W., Carls B.A, Xu X.M., Hatfield D.L., Berry M.J. 2006. Supramolecular complexes mediate selenocystein incorporation in vivo. *Mol Cell Biol.* 26:2337-2346.

Solis-Sainz y Valverde-R. 2006. Hipotiroidismo Neonatal: Fisiopatogenia, Aspectos Moleculares, Metabólicos y Clínicos. *Rev Invest Clin.* 58: 318-334.

Song S., Sorimachi k., Adachi K. y Oka T. 2000. Biochemical and molecular biological evidence for the presence of type II iodothyronine deiodinase in mouse mammary gland. *Mol Cell Endocrinol.* 160: 173-181.

Sorimachi K. y Robbins J. 1977. Metabolism of thyroid hormones by cultured monkey hepatocarcinoma cells. Nonphenolic ring deiodination and sulfation. *J.Biol. Chem.* 252: 4458-4463.

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

Specker J.I., Eales J.G., Tagawa M., Tyler W.A. 2000. Parr-smolt transformation in atlantic salmon: thyroid hormone deiodination in liver and brain and endocrine correlates of change in rheotactic behavior. *Can. J. Zool.* 78: 696-705.

St. Germain D.L. 1986. Hormonal control of a low Km (type II) iodothyronine 5'-deiodinase in cultured NB41A3 mouse neuroblastoma cells. *Endocrinology.* 119: 840-846.

St Germain D.L. 1988. The effects and interactions of substrates, inhibitors, and the cellular thiol-disulfide balance on the regulation of type II iodothyronine 5'-deiodinase. *Endocrinology.* 122: 1860-1868.

St. Germain D. L., Schwartzman R. A., Croteau W., Kanamori A., Wang Z., Brown D. D., y Galton V.A. 1994. A thyroid hormone-regulated gene in *Xenopus laevis*

encodes a type III iodothyronine 5-deiodinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 91: 7767-7771.

St. Germain D.L., Hernandez A., Schneider M.J. y Galton A.V. 2005. Insights into the role of deiodinases from studies of genetically modified animals. *Thyroid.* 15: 905-916.

Steinsapir J., Harney J. y Larsen P. R. 1998. Type 2 iodothyronine deiodinase in rat pituitary tumor cells is inactivated in proteasomes. *J.Clin. Invest.*102: 1895–1899.

Sutija M., Terrence J.L., Joss J.M. 2003. Deiodinase type II and tissue specific mRNA alternative splicing in the Australian lungfish, *Neoceratodus forsteri*. *Gen Comp Endocrinol.* 132: 409-417.

Sutija M., Longhurst T.J., Joss J.M. 2004. Deiodinase type III in the Australian lungfish, *Neoceratodus forsteri*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 136: 152-161.

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

Taurog M.A. 2000. Hormone synthesis: Thyroid iodide metabolism. En: “The Thyroid. A Fundamental and Clinical Text” (L. E. Braverman, and R. Utiger, Eds), 8 ed, pp 61-85. Lippincott Williams & Wilkins, New York

Teijido O., Manso M.J y Anadon R. 2002. Distribution of thyrotropin-releasing hormone immunoreactivity in the brain of the dogfish *Scyliorhinus canicula*. *J. Comp. Neurol.* 454:65–81.

Toyoda N., Harney J. W., Berry M. J., y Larsen P.R. 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., Berry M.J., Harney J.W. y Larsen P. R. 1995. Topological analysis of the integral membrane protein, type 1 iodothyronine deiodinase (D1). *J. Biol. Chem.* 270:12310–12318.

Toyoda N., Kaptien E., Berry M. J., Harney J. W., Larsen P. R., y Visser T.J. 1997. Structure-activity relationships for thyroid hormone deiodination by mammalian type I iodothyronine deiodinases. *Endocrinology.* 138: 213-219.

Treberg J. R., Speers-Roesch B., Piermarini P., Ip Y. K., Ballantyne J. S., Driedzic W. R. 2006. The accumulation of methylamine counteracting solutes in elasmobranchs with differing levels of urea: comparison of marine and freshwater species. *J. Exp. Biol.* 209: 860 -870

Tu H.M., Kim S.W., Salvatore D., Bartha T., Legradi G., Larsen P. R. y Lechan R.M. 1997. Regional distribution of type 2 thyroxine deiodinase messenger ribonucleic

acid in rat hypothalamus and pituitary and its regulation by thyroid hormone. *Endocrinology*. 138: 3359–3368.

Tu H.M., Legradi G., Bartha T., Salvatore D., Lechan R.M. y Larsen P. R. 1999- Regional expression of the type 3 iodothyronine deiodinase messenger ribonucleic acid in the rat central nervous system and its regulation by thyroid hormone. *Endocrinology*. 140: 784–790.

van der Geyten S., Sanders J. P., Kaptein E., Darras V. M., Kuhn E. R., Leonard J. L., y Visser T. J. 1997. Expression of chicken hepatic type I and type III iodothyronine deiodinases during embryonic development. *Endocrinology*. 138: 5144-5152.

Van der Geyten S., Mol K.A., Pluymers W., Kuhn E.R., Darras V.M. 1998. Changes in plasma T3 fasting/refeeding in tilapia (*Oreochromis niloticus*) are mainly regulated through changes in hepatic type II iodothyronine deiodinase. *Fish Physiol Biochem*. 19: 135-143.

Van der Geyten S., Buys N., Sanders J.P., Decuypere E., Visser T. J., Kuhn E. R. y Darras V.M. 1999. Acute pretranslational regulation of type III iodothyronine deiodinase by growth hormone and dexamethasone in chicken embryos. *Mol. Cell. Endocrinol*. 147: 49–56.

Van der Geyten S., Segers I., Gereben B., Bartha T., Rudas P., Larsen P.R., Kuhn E.R. and Darras V.M. 2001. Transcriptional regulation of iodothyronine deiodinases during embryonic development. *Mol. Cell. Endocrinol*. 183:1–9.

Van der Geyten S., Van den Eynde I., Segers I.B., Kuhn E.R. y Darras V.M. 2002. Differential expression of iodothyronine deiodinases in chicken tissues during the last week of embryonic development. *Gen. Comp. Endocrinol*. 128: 65–73.

Van der Geyten S., Byamungu N., Reyns G.E., Kühn E.R. 2005. Iodothyronine deiodinases and the control of plasma and tissue thyroid hormone levels in hyperthyroid tilapia (*Oreochromis niloticus*). *J. Endocrinology* 184: 467-479

Valverde-R.C., Aceves C. y Reyes-Z. E. 1993. Ontogenesis of iodothyronine deiodinase activities in brain and liver of the chick embryo. *Endocrinology*. 132: 867-872.

Valverde C., Croteau W., Lafleur G. J., Jr., Orozco A. y Germain D.L. 1997. Cloning and expression of a 5'-iodothyronine deiodinase from the liver of *Fundulus heteroclitus*. *Endocrinology*. 138: 642–648.

Valverde-R C., Orozco A., Becerra A., Jeziorski M.C., Villalobos P., Solis-S J.C. 2004 Halometabolites and cellular de halogenase systems. An evolutionary perspective. *Int Rev Cytol* 234:143–199.

Venkatesh T. V., Holland N. D., Holland L. Z., Su M-T., y Bodner, R. 1999. Sequence and developmental expression of amphioxus *AmphiNk2-1*: Insights into the evolutionary origin of the vertebrate thyroid gland and forebrain. *Dev. Genes Evol*. 209: 254-259.

- VanPutte CL, MacKenzie DS, Eales JG. 2001. Characterization of hepatic low-K(m) outer-ring deiodination in red drum (*Sciaenops ocellatus*). *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 128:413–423.
- Visser T. J., van der Does-Tobe I., Docter R. y Hennemann G. 1975. Conversion of thyroxine into tri-iodothyronine by rat liver homogenate. *Biochem. J.* 150: 489–493.
- Visser T.J. 1979. Mechanism of action of iodothyronine 5'-deiodinase. *Biochim. Biophys. Acta.* 569: 302-308.
- Visser T.J., Fekkes D., Docter R. y Henneman G. 1979. Kinetics of enzymatic reductive deiodination of iodothyronines. *Biochem J.* 179: 489.
- Visser T.J., Leonard J. L., Kaplan M.M. y Larsen P.R. 1982. Kinetic evidence suggesting two mechanisms for iodothyronine 5'-deiodination in rat cerebral cortex. *Proc.Natl. Acad. Sci. USA* 79: 5080–5084.
- Visser T.J., Kaptein E. Terpstra O.T. y Krenning E.P. 1988. Deiodination of thyroid hormone by human liver. *J.Clin. Endocrinol. Metab.* 67. 17-24.
- Visser, T.J. 1994. Role of sulfation in thyroid hormone metabolism. *Chem. Biol. Interact.* 92:293–303.
- Vivek Sagar GD, Gereben B, Callebaut I, Mornon JP, Zeold A, da Silva WS, Luongo C, Dentice M, Tente SM, Freitas BC, Harney JW, Zavacki AM, Bianco AC 2007 Ubiquitination-induced conformational change within the deiodinase dimer is a switch regulating enzyme activity. *Mol Cell Biol.* 27:4774-4783
- Volkoff H., Wourms P.J., Amesbury E. y Snelson F.F. 1999. Structure of the thyroid gland, serum thyroid hormones, and the reproductive cycle of the Atlantic stingray, *Dasyatis Sabina*. *J.Exp.Zool.* 284:505-516
- Wallach S., G. Rousseau L. Martin y M. Azria. 1999. Effects of calcitonin on animal and in vitro models of skeletal metabolism. *Bone.*25:509–516.
- Walpita C.N., Van der Geyten S., Rurangwa E. y Darras V.M. 2007. The effect of 3,5,3'-triiodothyronine supplementation on zebrafish (*Danio rerio*) embryonic development and expression of iodothyronine deiodinases and thyroid hormone receptors. *Gen. Comp. Endocrinol.* 152. 206-214.
- Wassen F.W.J.S., Klootwijk W., Kaptein E., Duncker D.J., Visser T.J., Kuiper G.G.J.M., 2004. Characteristics and thyroid state-dependent regulation of iodothyronine deiodinases in pigs. *Endocrinology.* 145: 4251-4263.
- Wu S., Green L.W., Huang W., Hays T.M. y Ch J.I. 2005. Alternate pathways of thyroid hormone metabolism. *Thyroid.* 15: 943-958.
- Xu X.M., Mix H., Carlson B.A., Grabowski P.J., Gladyshev V.N., Berry M.J., Hatfield D.L. 2005. Evidence for direct roles of two additional factors, SECp43 and soluble

liver antigen, in the selenoprotein synthesis machinery. *J Biol Chem.* 280:41568-41575.

Yen P.M. 2001. Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. *Physiol Rev.* 81: 1097-1142.

Yen P.M., et al. 2006. Thyroid hormone action at the cellular, genomic and target gene levels. *Mol. Cell. Endocrinol.* 246:121–127.

Yoshimura T, Yasuo S, Watanabe M, Iigo M, Yamamura T, Hirunagi K y Ebihara S. 2003. Light-induced hormone conversion of T4 to T3 regulates photoperiodic response of gonads in birds. *Nature.* 426: 178–181.

Yun J.A., Lee. Y.P., Bazar A.K., Daniel M.S. y Doux J.D. 2005. The incorporation of iodine in thyroid hormone may stem from its role as a prehistoric signal of ecologic opportunity: an evolutionary perspective and implications for modern diseases. *Medical hypothesis.* 65. 804-810.

Zeold A., Doleschall M., Haffner M.C., Capelo L.P., Menyhart J., Liposits Z., da Silva W.S., Bianco A.C., Kacs Kovics I., Fekete C. y Gereben B. 2006. Characterization of the nuclear factor-kappa B responsiveness of the human *dio2* gene. *Endocrinology.* 147: 4419–4429.

Zhang C., Kim S., Harney J.W. y Larsen, P.R. 1998. Further characterization of thyroid hormone response elements in the human type 1 iodothyronine deiodinase gene. *Endocrinology.* 139: 1156–1163.

ANEXOS

ANEXO 1

CONDRICTIOS

Los condriictios son una clase de vertebrados que incluye a los tiburones, rayas y quimeras. Se caracterizan por un esqueleto interno de cartílago en lugar de hueso. Los condriictios son animales muy exitosos que aparecieron hace cerca de 400 millones de años, mucho antes de la era de los dinosaurios. Los tiburones y las rayas han mantenido su posición como importantes predadores en muchos ambientes marinos y algunos de agua dulce.

Diseño básico

Los tiburones han mantenido el mismo plano básico de su cuerpo a lo largo de su historia. Típicamente tienen un cuerpo aerodinámico con un hocico largo, 5 a 7 pares de hendiduras branquiales, una pequeña apertura espiracular, aletas pélvicas y pectorales en pares, una o dos aletas dorsales, una aleta anal (ausente en algunos grupos) y una aleta caudal de forma creciente. Los tiburones machos poseen *claspers* –accesorios en par usados en el apareamiento- asociados con sus aletas pélvicas.

Las rayas, muy cercanos de los tiburones, habitan principalmente en la profundidad del océano y han desarrollado un cuerpo en forma de disco aplanado, con los ojos localizados en la superficie de la cabeza. Usan sus aletas pectorales expandidas como alas para deslizarse airoosamente por el agua. Muchas rayas han modificado sus dientes en placas incrustadas planas para alimentarse de moluscos y crustáceos.

Además de los tiburones y las rayas, los condriictios incluyen un tercer grupo: el de los *Holocephali*, comúnmente referido como quimeras, peces elefante o peces rata. Hay alrededor de 35 especies vivas, todas marinas y encontradas principalmente en aguas frías profundas. Al igual que los tiburones y las rayas tienen un esqueleto cartilaginoso y los machos tienen *claspers* asociados con sus aletas pélvicas. Sin embargo, difieren marcadamente en algunos aspectos que no se revisaran aquí.

Los peces cartilaginosos no poseen vejiga natatoria, la cual usan los peces óseos para mantenerse en flote, en lugar de esto poseen grandes hígados grasosos para evitar el hundimiento. No todos los tiburones tienen que mantenerse continuamente nadando para vivir, muchas especies, regularmente descansan en el fondo. La mayoría de los tiburones son predadores activos y tienen dientes afilados en forma triangular, los cuales producen y mudan continuamente (Luer., 2000).

Diversidad

Los tiburones y las rayas son miembros importantes de muchos ecosistemas marinos y de agua dulce y el grupo no es muy diverso. Hay cerca de 600 especies vivas de rayas y aproximadamente 350 especies de tiburones. En comparación, el número de especies de peces óseos es de 23 000. El tamaño de los tiburones es variado desde 20 cm de longitud total (*Etmopterus perryi*) hasta el gigante tiburón blanco de 12 m (*Rhincodon typus*). De acuerdo a clasificaciones recientes, los tiburones y rayas se dividen en dos grupos principalmente: el Squalea y el Galeomorphii (**Figura 1**).

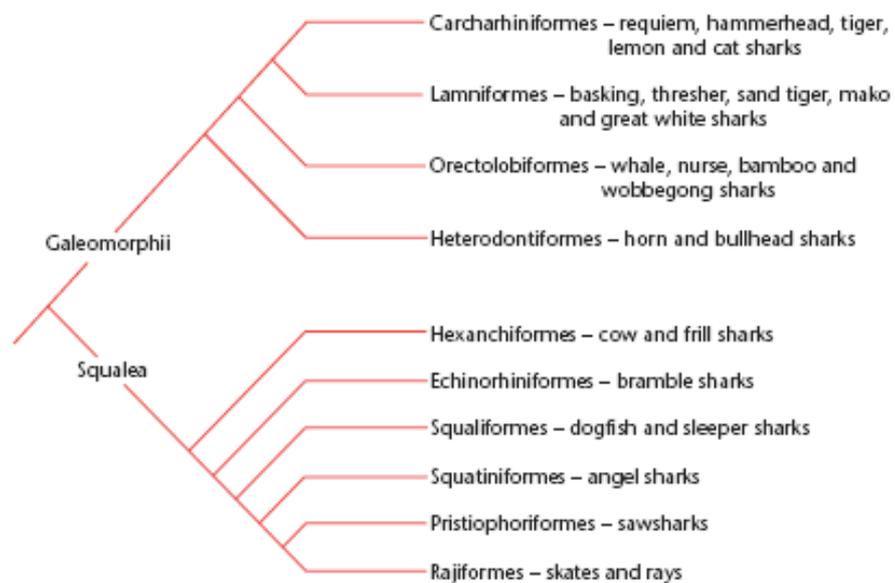


Figura 1. Relación evolutiva de los grupos mayoritarios de elasmobranquios modernos (Tomado de Gottfried., 2001)

Habitats

Los condriictios habitan un amplio rango de ecosistemas acuáticos, principalmente marinos. Son más comunes y presentan mayor diversidad en ambientes marinos templados a tropicales, en áreas de arrecifes y poco profundas. Pocas especies se encuentran por debajo de los 2000 m (la especie *Centrophorus*, puede encontrarse hasta los 4000 m). Muchas especies de tiburones ocupan grandes nichos marinos de predadores, donde hay una gran diversidad de peces y animales que son sus presas potenciales. Estos hábitats generalmente incluyen fondos arenosos poco profundos, estuarios, arrecifes rocosos y de coral y bosques de algas. Pocas

especies incluida *Carcharhinus leucas*, entran en ambientes de agua dulce. Algunas rayas pasan su vida completa en agua dulce, incluidas las rayas de los ríos de América del Sur (Gottfried., 2001)

Reproducción

Los peces cartilaginosos, a diferencia de los peces óseos, se caracterizan por tener un número relativamente bajo de progenie, desde uno a una docena dependiendo de la especie. Estas especies poseen una serie de especializaciones reproductivas, para proveer a su descendencia de nutrientes, eliminar desechos y cubrir las demandas respiratorias. La reproducción puede ser ovípara o vivípara. Los huevos se fertilizan internamente, los machos usan sus *claspers* para depositar el esperma durante la copulación. En la mayoría de los tiburones, las etapas iniciales de la embriogénesis generalmente ocurren dentro del útero femenino, con un periodo de gestación muy largo, hasta de dos años, y la nutrición a través del gran saco de la yema. El desarrollo de los vivíparos puede ser placentado o bien aplacentado. La viviparidad en elasmobranquios se puede clasificar como: 1) variedad aplacentaria con yema (aplacental yolk cas variety), tradicionalmente llamada ovovivíparo 2) aplacentaria oofagica (aplacental oophagous), con o sin canibalismo intrauterino, 3) aplacental with uterine villi or trophonemata o 4) placentaria. (Hamlett., 2001).

ANEXO 2

Chiloscyllium punctatum



Reino	<i>Animalia</i>
Filum	<i>Chordata</i>
Subfilum	<i>Vertebrata</i>
Clase	<i>Chondrichthyes</i>
Subclase	<i>Elasmobranchii</i>
Superorden	<i>Euselachii</i>
Orden	<i>Orectolobiformoes</i>
Familia	<i>Hemiscyllidae</i>
Genero	<i>Chiloscyllium</i>
Especie	<i>Punctatum</i>

Chiloscyllium punctatum (tiburón bambú de bandas oscuras) es una especie tropical ampliamente distribuida en el pacifico indo-oriental. Incluye las regiones de Java, las costas del sur de Papúa Nueva Guinea hasta las costas norte de Australia. Se encuentra a profundidades de hasta 85 m. Habita en arenas blandas y en arrecifes de coral. Se alimentan de crustáceos, moluscos y peces bentónicos. La especie es muy resistente y puede tolerar la hipoxia ambiental severa, una característica que le permite ocupar y sobrevivir en medio ambientes que cursan con condiciones de hipoxia cíclicas, como los pisos de arrecifes coralinos. Es una especie ovípara. Al salir del cascaron tiene un tamaño de 13 a 17 cm y alcanza un máximo de ~ 118 cm. Al alcanzar la madurez su tamaño es de 68-76 cm (machos), 63 cm (hembras). Esta especie se ha adaptado fácilmente a los acuarios, en parte debido a su tamaño, a la temperatura ambiente en la que sobrevive (22-27°C) y a los hábitos que tienen de pasar gran parte del tiempo escondidos entre las rocas y pequeñas cuevas.

<http://www.petsforum.com/cis-fishnet/seascope/MA0298.html>



Contents lists available at ScienceDirect

General and Comparative Endocrinology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ygcen

Short Communication

Cloning and characterization of a type 3 iodothyronine deiodinase (D3) in the liver of the chondrichthyan *Chiloscyllium punctatum*

Lidia Mayorga Martínez, Aurea Orozco*, Patricia Villalobos, Carlos Valverde-R

Instituto de Neurobiología, Departamento de Neurobiología Celular y Molecular, Universidad Nacional Autónoma de México UNAM-UAQ, Juriquilla, CDMX 76230 Querétaro, México

ARTICLE INFO

Article history:

Received 22 November 2007

Revised 20 February 2008

Accepted 25 February 2008

Available online 29 February 2008

Keywords:

Iodothyronine deiodinase

Type 3 deiodinase

Inner-ring deiodination

Chondrichthyan

ABSTRACT

Thyroid hormone bioactivity is finely regulated at the cellular level by the peripheral iodothyronine deiodinases (D). The study of thyroid function in fish has been restricted mainly to teleosts, whereas the study and characterization of Ds have been overlooked in chondrichthyes. Here we report the cloning and operational characterization of both the native and the recombinant hepatic type 3 iodothyronine deiodinase in the tropical shark *Chiloscyllium punctatum*. Native and recombinant sD3 show identical catalytic activities: a strong preference for T₃-inner-ring deiodination, a requirement for a high concentration of DTT, a sequential reaction mechanism, and resistance to PTU inhibition. The cloned cDNA contains 1298 nucleotides [excluding the poly(A) tail] and encodes a predicted protein of 259 amino acids. The triplet TGA coding for selenocysteine (Sec) is at position 123. The consensus selenocysteine insertion sequence (SECIS) was identified 228 bp upstream of the poly(A) tail and corresponds to form 2. The deduced amino acid sequence was 77% and 72% identical to other D3 cDNAs in fishes and other vertebrates, respectively. As in the case of other piscivore teleost species, shark expresses hepatic D3 through adulthood. This characteristic may be associated with the alimentary strategy in which the protection from an exogenous overload of thyroid hormones could be of physiological importance for thyroidal homeostasis.

© 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

In all vertebrates, in concert with the neuroendocrine cascade of regulatory signals controlling their production and release by the thyroid gland, intracellular thyroid hormone (TH) homeostasis is finely tuned by a set of target-cell reductive dehalogenases generically called iodothyronine deiodinases or Ds. This ubiquitous family of selenoenzymes has differing catalytic properties which have led to the recognition of three distinct isotypes: D1, D2, and D3. These enzymes act upon T₄, the major iodothyronine produced exclusively by the thyroid gland. Depending on the ring of the molecule from which iodine atoms are removed, Ds catalyze two different but complementary metabolic routes that generate active or inactive isomers of both triiodothyronine and diiodothyronine (T₃ and T₂, respectively). The activating or outer-ring deiodinating pathway (ORD) is catalyzed by D1 and D2 and produces active iodothyronines by converting T₄ to T₃. On the other hand, the inactivating or inner-ring deiodinating (IRD) pathway is catalyzed by D1 and D3 and produces the inactive isomers: rT₃ from T₄, as well as 3,3'-T₂ and 3',5'-T₂ from T₃ and rT₃, respectively (Bianco et al., 2002).

As compared to other vertebrates, the study of thyroid function in fishes has been mainly restricted to teleosts, with minimal examination in other fish species. Available data reviewed elsewhere (Orozco and Valverde-R, 2005) indicate that, although similar in their molecular and kinetic properties, the regulation and organotypic distribution of teleostean Ds differ significantly from their vertebrate counterparts. In fish, the least studied deiodinative route is the inactivating one, which has, however, been found to be highly expressed in trout skin (Fenton et al., 1997) and tilapia brain (Mol et al., 1997). T₄ and/or T₃-IRD activity has been documented in the brain and/or the liver of trout (Johnston and Eales, 1995; Frith and Eales, 1996; Mol et al., 1998; Plate et al., 2002); tilapia, catfish, and turbot (Mol et al., 1998); American plaice (Adams et al., 2000); Atlantic salmon (Specker et al., 2000), and lake sturgeon (Plohman et al., 2002). Similarly, T₄ and T₃-IRD activity has been detected in the retina and the olfactory epithelium of rainbow trout and sockeye salmon (Plate et al., 2002), as well as in the liver, intestine, muscle, and brain of the Atlantic Hagfish, *Mixine glutinosa* (McLeese et al., 2000), and the liver and intestine of the metamorphosing sea lamprey (Eales et al., 2000). Although D3 cDNAs have been cloned from the liver of tilapia (Sanders et al., 1999), Australian lungfish (Sutija et al., 2004), trout (Bres et al., 2006), and recently a fragment from walleye (Picard-Aitken et al., 2007), only the tilapia clone has been expressed and characterized (Sanders et al., 1999). However, in the case of chondrichthyans, one of the two earliest extant jawed vertebrates (gnathostomes), there is no information regarding the IRD pathway.

* Corresponding author. Fax: +52 442 238 1038.

E-mail addresses: lidiamm2@yahoo.com.mx (L.M. Martínez), aurea@servidor.unam.mx (A. Orozco), aguilerav@gmail.com (P. Villalobos), cavaro@servidor.unam.mx (C. Valverde-R).

To our knowledge there is only one study in which hepatic T₄-ORD activity was partially characterized (Leary et al., 1999). Here, we report the operational characterization of hepatic D3 in the tropical marine brown-banded shark *Chiloscyllium punctatum*, as well as the cloning and expression of the cDNA that encodes type 3 deiodinase in this chondrichthyan. The abundant expression of D3 found in the adult shark liver suggests that this feature is not unique to teleost species. Furthermore, the high hepatic D3 expression and the fact that shark entirely engulfs its prey, suggest that D3 may play a key physiological role in preventing the thyroid hormone overexposure implicit in this feeding strategy.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Sharks ranging from 25–50 cm in total length were obtained from a commercial fish collector. Animals were held at 25 ± 1 °C in a seawater aquarium in the laboratory under a 12 h:12 h L:D photoperiod. They were fed with shrimp *ad libitum* twice a week and acclimated for 20 days. Prior to sacrifice, sharks were anesthetized in MS-222 (0.5 g L⁻¹), and the livers were immediately dissected and quick frozen. All animal procedures were reviewed and approved by the Animal Welfare Committee of our Institute.

2.2. Reagents and chemicals

Non-radioactive iodothyronines (rT₃, T₃, T₄), PTU (6-n-propyl-2-thiouacil), urea, TMAO (trimethylamine N-oxide), MS-222 (tricaine methane sulfonate), and synthetic oligonucleotides were obtained from the Sigma Chemical Co. (St. Louis MO). ¹²⁵I-labeled T₃ and T₄ (specific activities: 1200 µCi/µg) were purchased from Perkin-Elmer Life Sciences, Inc. (Boston MA). Radiolabeled thyronines were purified prior to use by means of a SEP-PAK C18 cartridge from Millipore (Waters Chromatography, Boston MA). Bradford reagents for protein determination were from Bio-Rad (Richmond, CA). Dithiothreitol (DTT) was obtained from Calbiochem (La Jolla, CA). Taq DNA polymerase was obtained from MBI Fermentas. TRIzol reagent; dNTPs, RNase H⁻, RNase inhibitor (RNasin), SuperScriptTM II RNase H⁻ reverse transcriptase, and Terminal Deoxynucleotidyl Transferase (rTdT) were from Invitrogen (Carlsbad, CA). HindIII, NcoI, and NotI were from New England Biolabs (Ipswich, MA). pGEM-T vector was obtained from Promega (Madison, WI).

2.3. Microsomes

Preparation of microsomal fractions was based on a previously described method (Mol et al., 1997) that was modified for these experiments. Briefly, liver was homogenized in 10 volumes of buffer (0.25 M sucrose, 10 mM Hepes, 1 mM DTT, pH 7) and centrifuged 10 min at 3000g. The supernatant was then centrifuged for 30 min at 10,000g, and the resulting supernatant was again centrifuged for 90 min at 40,000g. The final pellet was resuspended in 5 volumes of buffer, snap-frozen in aliquots, and stored at -80 °C.

2.4. Deiodinase activity and kinetic characterization

Type 3 deiodinase activity was assessed for both the native (microsomal preparations) and recombinant enzyme (whole oocyte homogenates) using a descending chromatography system as previously described (Fenton et al., 1997). In brief: the assay mixture contained 2 nM ¹²⁵I-T₃, varying concentrations of DTT, unlabeled T₃, and a saturating concentration (1 µM) of unlabeled rT₃ to minimize the ID1-IRD activity. Conversion of labeled T₃ to radioactive 3,3'-T₂ was corrected for the non-enzymatic deiodination observed in blanks incubated in the absence of protein (buffer blank). The labeled compounds present in the reaction mixture were resolved by descending paper chromatography (Bellabarba et al., 1968) and counted in a gamma scintillation counter (Cobra II, Auto-Gamma). In all cases, less than 30% of the substrate was consumed during the reaction. Results are expressed either as percentage of deiodination or as the enzyme specific activity [pmol 3,3'-T₂ mg⁻¹ min⁻¹]. Protein concentrations were determined using the Bio-Rad protein assay reagent and BSA as the standard. Kinetic characterization included the following parameters: protein concentration (1–200 mg mL⁻¹), pH (5–8, at intervals of 0.5), cofactor (DTT) concentration (1–100 mM), as well as incubation time (1–3 h) and temperature (15–45 °C). The effect of organic osmolytes, 400 mM urea or 200 mM TMAO, or a mixture of both, was assessed (n = 6 independent assays) using the recombinant shark D3. Kinetic constants were determined by non-linear fit of the raw data to the Michaelis–Menten equation using the GraphPad Prism 4.02 program. Experimental data were analyzed by double reciprocal plots to determine the operational characteristics of the enzyme (V_{max}, K_m and the reaction mechanism).

2.5. Cloning, sequencing, and expression

Total RNA was extracted from shark livers with the TRIzol reagent. Reverse transcription was performed using 10 µg total RNA and an oligo(dT) adaptor primer (GACTTCAGGCTAGCATCGATCCATGGGTCGAC[T₁₉]). A pair of degenerate primers that recognize the active site of deiodinases TTYGGNWSCTGYACNTGACC (sense), and TTYTTRAANGCCCANCRC (antisense) was used for PCR with a touch-down protocol. The reaction yielded a fragment of 130 bp, which was subcloned into a pGEM-T vector and sequenced. Based on this sequence, specific primers were designed to perform 3' and 5' rapid amplifications of cDNA ends (RACE) in a series of nested PCRs. 3'RACEs were performed using sequence-specific primers and a pair of oligonucleotides that anneal to the adapter sequence in the oligo (dT) primer. For 5'RACE, a series of RTs were performed with total RNA and specific antisense primers. The resulting cDNAs from the different RT reactions were treated with rTdT and dCTPs to add a poly(dC) extension to the 3' end. The products of these reactions served as templates for nested PCRs in a 5'RACE. The amplified products from both 3' and 5'RACE were cloned and sequenced. Once the entire cDNA sequence was obtained from the overlapping fragments, a sense and an antisense primer were designed. The former, corresponding to the translation initiation site, included a NcoI site, and the latter, corresponding to the 3' untranslated region immediately adjacent to the poly(A), was designed to contain a NotI site. The full-length cDNA was amplified and sequenced to establish the sequence of the shark D3 cDNA. The deduced amino acid sequence of the shark D3 clone was aligned using the DNAMAN program. RNA secondary structure was predicted using the MFOLD program (<http://bioinfo.math.rpi.edu/~zuke/mf>).

The full, amplified cDNA was digested with NcoI and NotI and ligated into the NcoI/NotI sites of the vector pXENEX1 (Jeziorski et al., 1998). The cDNA was linearized with HindIII, purified, and used to transcribe capped RNA with T7 polymerase. Female *Xenopus laevis* frogs were anesthetized by hypothermia, and 2 or 3 ovarian lobes were removed through an abdominal incision and placed into Barths' solution. Stage V–VI oocytes (n = 30) were microinjected with 50 nL (300 ng/oocyte) of RNA and incubated 4 days at 18 °C in Barths' solution with daily medium changes. Oocytes were then harvested, homogenates prepared, and recombinant deiodinase activity was assayed. It is important to note that uninjected oocytes do not express detectable deiodinase activity (data not shown).

3. Results

3.1. Native shark D3 (sD3) deiodinase activity and kinetic characterization

Initial assay conditions for IRD activity were defined in a series of preliminary experiments using 2 nM of ¹²⁵I-T₃ as substrate. As shown in Fig. 1, enzyme activity was linearly dependent on protein concentration and incubation time, up to 100 µg/tube of microsomal protein and 3 h, respectively. The activity was enhanced in the presence of DTT. Maximal deiodinase activity was obtained at pH 6.5 and 37 °C (data not shown). Subsequent deiodinase assays were performed as follows: 40 µg mL⁻¹ microsomal protein and 50 mM DTT at 37 °C for 1 h. The Michaelis–Menten plots for substrate kinetics are depicted in Fig. 2A. True K_m and V_{max} values were 2.7 nM and 0.017 pmol 3,3'-T₂ mg⁻¹ min⁻¹, respectively.

As shown in Fig. 2C, Lineweaver–Burk plots of deiodination rate versus substrate concentration at different fixed DTT concentrations yield a set of intersecting lines. This suggests that sD3 kinetics obey a bisubstrate sequential-type reaction mechanism, which is compatible with the formation of a ternary enzyme–substrate–cofactor complex during catalysis. Substrate specificity assessed by the competitive inhibition of [¹²⁵I]T₃ deiodination (1 nM) with increasing concentrations of unlabeled T₃, T₄, and rT₃ is depicted in Fig. 2D. Substrate preference for the native sD3 was T₃ > T₄ > rT₃. sD3 was insensitive to PTU inhibition at doses up to 1 mM (Fig. 3). These results show that the native sD3 has catalytic properties which are in close agreement with those reported for other vertebrate D3.

3.2. Cloning and expression of shark D3 cDNA

We here report the cloning from *Chiloscyllium punctatum* liver of a cDNA (GenBank Accession No. EU275162) which encodes a protein with structural and functional characteristics that correspond to a type 3 deiodinase. The full-length clone of the sD3 cDNA was

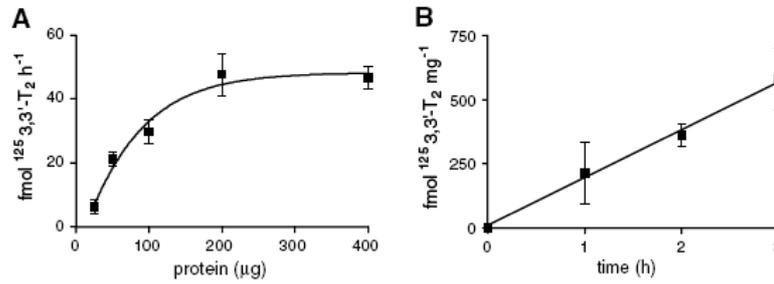


Fig. 1. Effect of protein concentration and incubation time on ird of ^{125}I - T_3 by shark liver microsomes. Conversion of T_3 to $3,3',3'\text{-T}_2$ as a function of microsomal protein concentration (A) and incubation time (B). Each point represents means \pm SE from three separate experiments performed in duplicate.

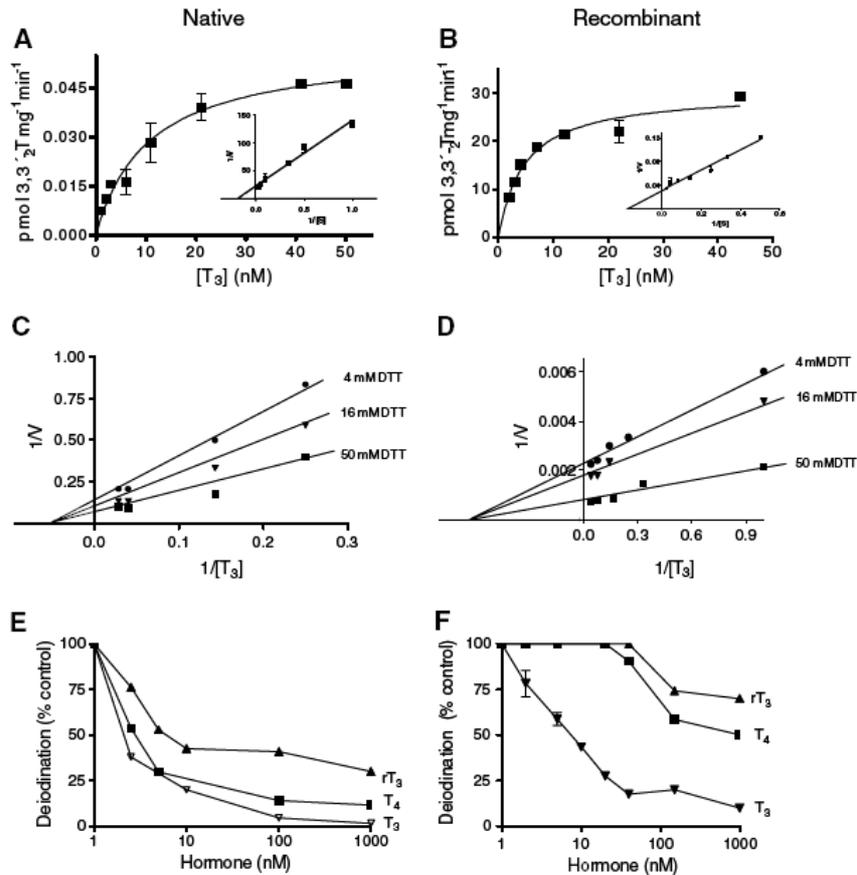


Fig. 2. Kinetics of T_3 -ird by shark liver microsomes and the recombinant enzyme. (A) and (B) show velocity-substrate concentration plots. Each point represents means \pm SE of the activity expressed as $\text{pmol } 3,3',3'\text{-T}_2 \text{ mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ of 5 different assays, each performed in duplicate. The insert shows the Lineweaver-Burk plot for K_m determination. C and D depict double reciprocal plots at different substrate and cofactor concentrations. E and F show the substrate specificity of native and recombinant shark deiodinases.

1298 bp long (excluding the poly(A) tail). The cDNA and predicted protein sequences are depicted in Fig. 4A. Besides the start and stop codons, the nucleotide sequence includes the triplet TGA coding for the insertion of the amino acid selenocysteine (Sec) at a.a. position 123. The consensus polyadenylation signal is located at nucleotide 1283–1288. The selenocysteine insertion sequence (SECIS) was identified from nt 1067–1168 of the 3'untranslated

region. The secondary structure of this SECIS corresponds to a form 2 (Fig. 4B), and its nucleotide sequence is 70% identical to that from tilapia (Sanders et al., 1999) and lungfish (Sutija et al., 2004). The deduced protein for sD3 is 259 amino acids long, with a predicted molecular mass of 29.4 kDa and an isoelectric point of 7.8. The amino acid alignment of sD3 with the sequences of its vertebrate counterparts reveals 72% identity and shows several highly con-

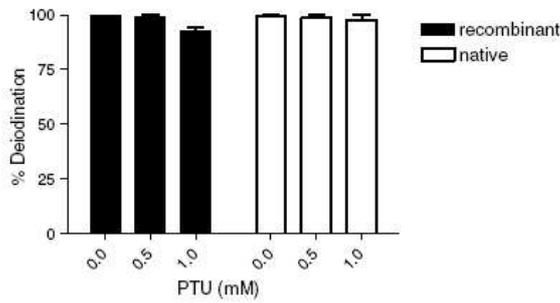


Fig. 3. Effect of ptu on t_3 -ird by shark liver microsomes and the recombinant enzyme. Each bar represents means \pm SE of 3,3'- T_2 as percent of the control (0 mM PTU) (n = 3).

served areas towards the COOH terminus of the protein. These areas include, at the active site, the so-called "signature domain" FGSCIXP that characterizes this family of selenoenzymes. As in other deiodinases, sD3 contains a single hydrophobic region between amino acids 3 and 31, which corresponds to a transmembrane domain (data not shown).

3.3. Recombinant shark D3 (rsD3) kinetic characterization and effect of organic osmolytes

Expression of the sD3 cDNA resulted in a protein with kinetic characteristics similar to those of the native enzyme. Recombinant shark D3 showed a true K_m value of 2 nM, a sequential reaction mechanism, a substrate preference $T_3 > T_4 > rT_3$, and insensitivity to PTU inhibition (Fig. 2 B,D,F and Fig. 3).

The presence of the organic osmolytes urea and TMAO in the incubation medium exerted different effects upon rsD3 substrate affinity. When assayed in phosphate buffer, pH 6.5, the enzyme had an apparent K_m for T_3 of 10.0 ± 0.73 nM, whereas in the presence of urea or TMAO this value was 50.2 ± 2.8 or 9.7 ± 0.5 nM, respectively. In the presence of urea plus TMAO, rsD3 K_m values remained in the same range as when incubated with phosphate (0.5 nM, pH 6.5). In terms of substrate affinity of the enzyme, these

changes represent a 5-fold decrease in the case of urea, while the apparent K_m value was not modified when TMAO was present alone or combined with urea in the incubation mixture.

4. Discussion

To our knowledge this is the first study that reports the molecular and operational characterization of type 3 iodothyronine deiodinase in a chondrichthyan. D3 activity has been identified in all vertebrate groups (Kaplan et al., 1983; Frith and Eales, 1996; Fenton et al., 1997; Mol et al., 1999a; Adams et al., 2000; Plohman et al., 2002; Villalobos et al., 2006), and the cDNA has been cloned in *Xenopus* (St. Germain et al., 1994), rat (Croteau et al., 1995), human (Salvatore et al., 1995), frog (Becker et al., 1995), chicken (Van der Geysen et al., 1997), tilapia (Sanders et al., 1999), lungfish (Sutija et al., 2004), pig (Wassen et al., 2004), cow (Connor et al., 2005), and trout (Bres et al., 2006), and recently a fragment from walleye (Picard-Aitken et al., 2007) as well as from snake (Villalobos et al., 2006). However, only in *Xenopus*, human, rat, and tilapia has the protein been expressed and fully characterized. The present results show that, in general, the catalytic properties of sD3 are similar to those previously reported for other vertebrates. That is, sD3 shows K_m values in the nanomolar range, prefers T_3 over T_4 as substrate, and its activity is virtually unaffected by PTU. Interestingly, the V_{max} value for shark T_3 -IRD is among the highest so far reported in fish, either gills (Mol et al., 1997) or liver (Johnston and Eales, 1995). In addition to its operational and functional characteristics, the evidence that sD3 is a homolog of the D3 subset of deiodinating enzymes is further supported by the high degree of identity (72%) that it shares with other members of this subfamily of deiodinases. This high degree of structural conservation may reflect the important developmental role of this enzyme throughout the vertebrate kingdom.

In functional terms, sD3 exhibits at least two distinct features which deserve further comment as well as additional studies. Among adult vertebrates, the presence of D3 in the liver seems to be a feature unique to some fish species. Apart from the present study, the occurrence of D3-like activity in the liver of adult fish has been reported in trout (Johnston and Eales, 1995), American plaice (Adams et al., 2000), and lake sturgeon (Plohman et al.,

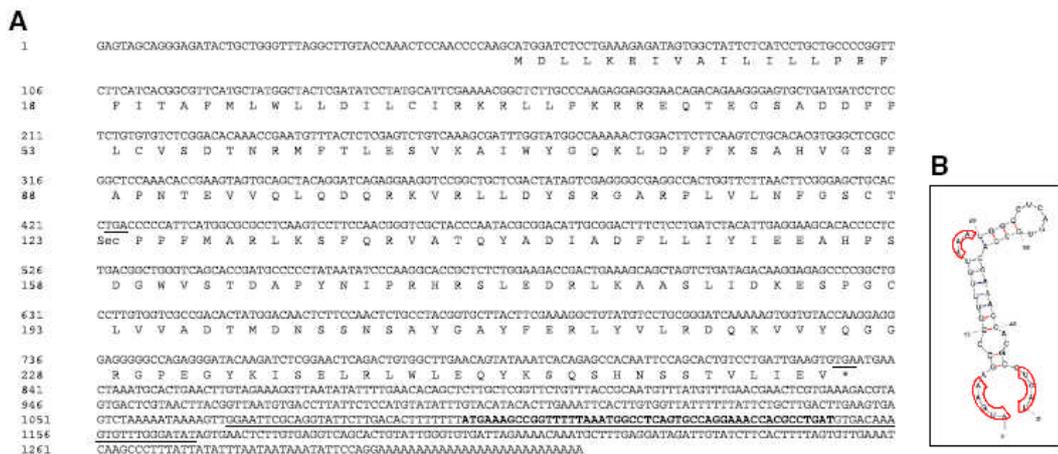


Fig. 4. Nucleotide sequence of the full-length shark d3 cDNA and the deduced peptide sequence. (A) The complete mRNA spans 1298 bp (excluding the poly(A) tail), comprising an open reading frame of 777 bp (nucleotides 56–832) which includes an in-frame TGA codon at positions 422–424 (underlined). The stop codon ATA is also underlined. A consensus SECIS includes bp 1067–1168 (underlined). (B) The sequence that forms the proposed secondary structure of the SECIS from the shark D3 mRNA is in bold and resembles a Form 2.

2002). A similar finding has been reported in immature Pacific and Atlantic salmon (Plate et al., 2002; Specker et al., 2000). In other vertebrates, liver D3 expression seems to be restricted to embryonic or neonatal stages of development, and it has been documented in human embryo (Richard et al., 1998), neonatal rat (Galton et al., 1991; Bates et al., 1999), chicken embryo (Valverde-R et al., 1993; Van der Geyten et al., 1997), metamorphosing tadpoles (Becker et al., 1997), embryonic crocodile (Shepherdley et al., 2002), and during the larval phase of agnathans (reviewed by Orozco and Valverde-R, 2005). It is generally accepted that during embryogenesis, at precise, species-specific ontogenetic stages, D3 activity contributes to thyroid hormone homeostasis by preventing premature exposure of developing tissues to adult levels of thyroid hormones (Valverde-R et al., 1993; Bianco et al., 2002). Therefore, and although its physiological role waits to be elucidated, circumstantial evidence leads to the proposal that, in some fishes, embryonic liver D3 continues to play a protective role during adult life. This protective function may be related to the exposure to substantial amounts of exogenous thyroid hormones ingested by those predatory species that devour whole prey. In support of this proposal, in trout (Eales and Finsson, 1991; Sweeting and Eales, 1992; MacLachy and Eales, 1993; Bres et al., 2006) and tilapia (Mol et al., 1999b; Van der Geyten et al., 2005) fed with T₃-supplemented food, only liver D3, but not brain, gill, and kidney enzyme activity, was significantly increased. Furthermore, besides the increase in liver, T₄ treatment in rainbow trout also increased T₄ and T₃ IRD in brain and retina (Plate et al., 2002). A similar correlation between diet and D3 activity was observed in the lake sturgeon when a diet change from trout pellets to ocean zooplankton reduced plasma T₃ levels and increased hepatic and intestinal T₃-IRD activities (Plohman et al., 2002). The increase in hepatic D3 in response to an exogenous overload of thyroid hormones is consistent with both the alimentary strategy of the species in the wild and the relatively high iodine content of metabolites in the marine food chain and nutrient flow, as compared to fresh water or terrestrial environments (Valverde-R et al., 2004; Heyland and Moroz, 2005; Yun et al., 2005). In this context it is noteworthy that in immature walleye, a top piscivore from the *Percidae* family, there was a significant negative correlation between hepatic D3 mRNA levels and plasma T₃ concentrations, as well as between D3 and D2 mRNA levels (Picard-Aitken et al., 2007). Thus, even though the nutritional status of these field-captured individuals was not assessed, these findings point toward the major role that dietary T₃ content may play in regulating liver deiodinase activity in piscivore fish species. Supporting this proposal is the fact that among fish, the specific activity of hepatic D3 is significantly higher (on the order of pmol) in shark liver (present results) than in tilapia (fmol range) (Van der Geyten et al., 2005), a fresh water and herbivorous species. The proposal that D3 expression in adult fish could be associated with feeding habits is strengthened by the fact that during the parasitic period in agnathans, intestinal T₄ and T₃ IRD is significantly higher than in liver (Eales et al., 1997; McLeese et al., 2000). Indeed, during its sanguivorous period, lampreys ingest surplus amounts of TH from their host, and the intestinal inner-ring pathway could degrade TH thus regulating their entry to the circulation. Altogether, these studies suggest that the intestine and the liver are a primary site of TH deiodination in lower craniates and carnivorous fish, and give further support to the notion of the protective role played by D3 system. Besides the present results and the studies in lamprey, liver D3 has not been assessed in the wild nor in domestic carnivorous or hematophagous species. The proposed protective physiological role played by D3 in species with this type of feeding behavior can be tested by further studies.

The present results show that the presence of urea significantly altered the catalytic properties of sD3; most notably its substrate affinity (K_m) was significantly reduced. As expected, TMAO alone

or combined with urea counteracted the effects of the latter. Although these findings disagree with the original report by Leary et al. (1999) they are consistent with the well-known ureosmotic strategy of marine elasmobranchs (Anderson et al., 2007). Indeed, urea and TMAO are the two major endogenous physiologic osmolytes in this group of ureotelic hyper-osmoregulators. In marine shark species such as *C. punctatum*, urea in plasma and muscle cells reaches concentrations above 300 and 200 mM, respectively. The molecular and functional protein-destabilizing effects of urea are counterbalanced by TMAO, which constitutes approximately 90% of the methylamine compounds in elasmobranch plasma (Yancey and Somero, 1989; Hazon et al., 2003; Anderson et al., 2007; Treberg et al., 2006). Therefore, our present results strongly suggest that in *C. punctatum*, TMAO plays an important role protecting the catalytic D3 reaction by counteracting the destabilizing force of urea upon D3.

Overall and as we had previously proposed, the inactivating activity of Ds may correspond to an ancient function to regulate, in time and amount, the cellular uptake and bioactivity of developmentally related iodine compounds. These iodometabolites could have functioned, in turn, as signals of an appropriate nutritional status or fitness to follow the ontogenetic program towards a reproductive adult stage (Valverde-R et al., 2004). The fact that hepatic sD3 is highly conserved and expressed throughout adulthood is in accord both with its ancestral phylogenetic history, as well as with its potential sentinel role to avoid an inappropriate overload of exogenous T₃ secondary to feeding.

Acknowledgments

This study was partially supported in part by Grants PAPIIT UNAM IN218307; IN202807, and CONACYT 54282. L. Mayorga was supported by graduate fellowships from CONACYT 142421 and DGEP-UNAM 504013613. We thank Dr. Anaid Antaramian and Leonor Casanova for their invaluable technical support, and Dr. Dorothy Pless for critically reading the manuscript.

References

- Adams, B.A., Cyr, D.G., Eales, J.G., 2000. Thyroid hormone deiodination in tissues of American plaice, *Hippoglossoides platessoides*: characterization and short-term responses to polychlorinated biphenyls (PCBs) 77 and 126. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 127, 367–378.
- Anderson, W.G., Taylor, J.R., Good, J.P., Hazon, N., Grosell, M., 2007. Body fluid volume regulation in elasmobranch fish. *Comp. Biochem. Physiol. A Molec. Integrative Physiol.* 148, 3–13.
- Bates, J.M., St. Germain, D.L., Galton, V.A., 1999. Expression profiles of the three iodothyronine deiodinases, D1, D2, and D3, in the developing rat. *Endocrinology* 140, 844–851.
- Becker, K.B., Schneider, M.J., Davey, J.C., Galton, V.A., 1995. The type III 5-deiodinase in *Rana catesbeiana* tadpoles is encoded by a thyroid hormone-responsive gene. *Endocrinology* 136, 4424–4431.
- Becker, K.B., Stephens, K.C., Davey, J.C., Schneider, M.J., Galton, V.A., 1997. The type 2 and type 3 iodothyronine deiodinase play important roles in coordinating development in *Rana catesbeiana* tadpoles. *Endocrinology* 138, 2989–2997.
- Bellabarba, D., Peterson, R.E., Sterling, K., 1968. An improved method for chromatography of iodothyronines. *J. Clin. Endocr. Met.* 28, 305–307.
- Bianco, C.A., Salvatore, D., Gereben, B., Berry, J.M., Larsen, P.R., 2002. Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases. *Endocr. Rev.* 23, 38–89.
- Bres, O., Plohman, C.J., Eales, G., 2006. A cDNA for a putative type III deiodinase in the trout (*Oncorhynchus mykiss*): influence of holding conditions and thyroid hormone treatment on its hepatic expression. *Gen. Comp. Endocrinol.* 145, 92–100.
- Connor, E.E., Laiakis, E.C., Fernandes, V.M., Williams, J.L., Capuco, A.V., 2005. Molecular cloning, expression and radiation hybrid mapping of the bovine deiodinase type II (DIO2) and deiodinase type III (DIO3) genes. *Anim. Genet.* 36, 240–243.
- Croteau, W., Whittemore, S.L., Schneider, M.J., St. Germain, D.L., 1995. Cloning and expression of a cDNA for a mammalian type III iodothyronine deiodinase. *J. Biol. Chem.* 270, 16569–16575.
- Eales, J.G., Finsson, K.W., 1991. Response of hepatic thyroxine 5'-deiodinase of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*, to chronic ingestion of 3,5,3'-triiodo-L-thyronine. *J. Exp. Zool.* 257, 230–235.

- Eales, J.G., Holmes, J.A., McLeese, J.M., Youson, J.H., 1997. Thyroid hormone deiodination in various tissues of larval and upstream-migrant sea lampreys, *Petromyzon marinus*. Gen. Comp. Endocrinol. 106, 202–210.
- Eales, J.G., McLeese, J.M., Colmes, J.A., Youson, J.H., 2000. Changes in intestinal and hepatic thyroid hormone deiodination during spontaneous metamorphosis of the sea lamprey, *Petromyzon marinus*. J. Exp. Zool. 286, 305–312.
- Fenton, B., Orozco, A., Valverde-R, C., 1997. Kinetic characterization of skin inner-ring deiodinase pathways and its correlation with circulating levels of reverse T₃ (rT₃) in developing rainbow trout. J. Endocrinol. 154, 547–554.
- Frith, S.D., Eales, J.G., 1996. Thyroid hormone deiodination pathways in brain and liver of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Gen. Comp. Endocrinol. 101, 323–332.
- Galton, V.A., McCarthy, P.T., St. Germain, D.L., 1991. The ontogeny of iodothyronine deiodinase systems in liver and intestine of the rat. Endocrinology 128, 1717–1722.
- Heyland, A., Moroz, L.L., 2005. Cross-kingdom hormonal signaling: an insight from thyroid hormone functions in marine larvae. J. Exp. Biol. 208, 4355–4361.
- Hazon, N., Wells, A., Pillans, R.D., Good, J.P., Anderson, W.G., Franklin, C.E., 2003. Urea based osmoregulation and endocrine control in elasmobranch fish with special reference to euryhalinity. Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Molec. Biol. 136, 685–700.
- Jeziorski, M.C., Greenberg, R.M., Clark, K.S., Anderson, P.A.V., 1998. Cloning and functional expression of a voltage-gated calcium channel (1 subunit from jellyfish. J. Biol. Chem. 273, 22792–22799.
- Johnston, C.E., Eales, J.G., 1995. Effects of acclimation and assay temperature on outer- and inner-ring thyroxine and 3,5,3'-triiodo-L-thyronine deiodination by liver microsomes of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. J. Exp. Zool. 272, 426–434.
- Kaplan, M.M., Visser, T.J., Kimberlee, A., Yaskoski, Leonard, J.L., 1983. Characteristics of iodothyronine tyrosyl ring deiodination by rat cerebral cortical microsomes. Endocrinology 112, 35–42.
- Leary, C.S., Ballantyne, S.J., Leatherland, F.J., 1999. Evaluation of thyroid hormone economy in elasmobranch fishes, with measurements of hepatic 5'-monodeiodinase activity in wild dogfish. J. Exp. Zool. 248, 492–499.
- MacLatchy, D.L., Eales, J.G., 1993. Effects of T₃ or T₄ challenge on inner- and outer-ring deiodination of T₃ and T₄ in the liver, kidney and gill of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. J. Exp. Zool. 265, 637–645.
- McLeese, J.M., Wright, G.M., Youson, J.H., Eales, J.G., 2000. Deiodination activity in extrathyroidal tissues of the atlantic hagfish, *Myxine glutinosa*. J. Exp. Zool. 287, 445–452.
- Mol, K.A., Van der Geyten, S., Darras, V.M., Visser, T.J., Kühn, E.R., 1997. Characterization of iodothyronine outer ring and inner ring deiodinase activities in the blue tilapia, *Oreochromis aureus*. Endocrinology 138, 1787–1793.
- Mol, K.A., van der Geyten, S., Burel, C., Kühn, E.R., Boujard, T., Darras, V.M., 1998. Comparative study of iodothyronine outer ring and inner ring deiodinase activities in five teleostean fishes. Fish Physiol. Biochem. 18, 253–266.
- Mol, K.A., van der Geyten, S., Kühn, E.R., Darras, V.M., 1999. Effects of experimental hypo- and hyperthyroidism on iodothyronine deiodinases in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. Fish Physiol. Biochem. 20, 201–207.
- Orozco, A., Valverde-R, C., 2005. Thyroid hormone deiodination in fish. Thyroid 15, 799–813.
- Picard-Aitken, M., Fournier, H., Pariseau, R., Marcogliese, D.J., Cyr, D.G., 2007. Thyroid disruption in walleye (*Sander vitreus*) exposed to environmental contaminants: Cloning and use of iodothyronine deiodinases as molecular biomarkers. Aquatic Toxicol. 20, 200–211.
- Plate, E.M., Adams, B.A., Allison, W.T., Martens, G., Hawryshyn, C.W., Eales, J.G., 2002. The effects of thyroid or a GnRH analogue on thyroid hormone deiodination in the olfactory epithelium and retina of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, and sockeye salmon, *Oncorhynchus nerka*. Gen. Comp. Endocrinol. 127, 59–65.
- Plohm, J.C., Dick, T.A., Eales, J.G., 2002. Thyroid of lake sturgeon *Acipenser fulvescens* II deiodination properties, distribution, and effects of diet, growth, and a T₃ challenge. Gen. Comp. Endocrinol. 125, 56–66.
- Richard, K., Hume, R., Kaptein, E., Sanders, J.P., van Toor, H., De Herder, W.W., den Hollander, J.C., Krenning, E.P., Visser, T.J., 1998. Ontogeny of iodothyronine deiodinases in human liver. J. Clin. Endocrinol. Metab. 83, 2868–2874.
- Salvatore, D., Low, S.C., Berry, M., Maia, A.L., Harney, J.W., Croteau, W., St. Germain, D.L., Larsen, P.R., 1995. Type 3 iodothyronine deiodinase: cloning, in vitro expression, and functional analysis of the placental selenoenzyme. J. Clin. Invest. 96, 2421–2430.
- Sanders, J.P., van der Geyten, S., Kaptein, E., Darras, V.M., Kühn, E.R., Loenard, J.L., Visser, T.J., 1999. Cloning and characterization of type III iodothyronine deiodinase from the fish *Oreochromis niloticus*. Endocrinology 140, 3666–3673.
- Shepherdley, C.A., Richardson, S.J., Evans, B.K., Kühn, B.K., Darras, V.M., 2002. Thyroid hormone deiodinases during embryonic development of the saltwater crocodile (*Crocodylus porosus*). Gen. Comp. Endocrinol. 126, 153–164.
- Specker, J.L., Eales, J.G., Tagawa, M., Tyler W.A., 2000. Parr-smolt transformation in atlantic salmon: thyroid hormone deiodination in liver and brain and endocrine correlates of change in rheotactic behavior. Can. J. Zool. 78, 696–705.
- St. Germain, D.L., Schwartzman, R.A., Croteau, W., Kanamori, A., Wang, Z., Brown, D.D., Galton, V.A., 1994. A thyroid hormone-regulated gene in *Xenopus laevis* encodes a type III iodothyronine 5-deiodinase. Proc. Natl. Acad. Sci. 91, 7767–7771.
- Sutija, M., Longhurst, T.J., Joss, J.M., 2004. Deiodinase type III in the Australian lungfish, *Neoceratodus forsteri*. Gen. Comp. Endocrinol. 136, 152–161.
- Sweeting, R.M., Eales, J.G., 1992. The acute influence of ingested thyroid hormones on hepatic deiodination pathways in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Gen. Comp. Endocrinol. 85, 376–384.
- Treberg, J.R., Speers-Roesch, B., Piermarini, P., Ip, Y.K., Ballantyne, J.S., Driedzic, W.R., 2006. The accumulation of methylamine counteracting solutes in elasmobranchs with differing levels of urea: comparison of marine and freshwater species. J. Exp. Biol. 209, 860–870.
- Valverde-R, C., Aceves, C., Reyes, E., 1993. Ontogenesis of iodothyronine deiodinase activities in brain and liver of the chick embryo. Endocrinology 132, 867–872.
- Valverde-R, C., Orozco, A., Becerra, A., Jeziorski, C., Villalobos, P., Solis-S, J.C., 2004. Halometabolites and cellular dehalogenase systems: an evolutionary perspective. Int. Rev. Cyt. 234, 143–199.
- Van der Geyten, S., Sanders, J.P., Kaptein, E., Darras, V.M., Kühn, E.R., Leonard, K.L., Visser, T.J., 1997. Expression of chicken hepatic type I and type III iodothyronine deiodinases during embryonic development. Endocrinology 138, 5144–5152.
- VanderGeyten, S., Byamungu, N., Reyns, G.E., Kühn, E.R., 2005. Iodothyronine deiodinases and the control of plasma and tissue thyroid hormone levels in hyperthyroid tilapia (*Oreochromis niloticus*). J. Endocrinol. 184, 467–479.
- Villalobos, P., Orozco, A., Valverde-R, C., 2006. Hepatic iodothyronine deiodinase type 3 in the snake *Pituophis deppii*: biochemical and molecular characterization. In: 23rd Conference European Comparative Endocrinologists. Manchester, UK.
- Wassen, F.W.J.S., Klootwijk, W., Kaptein, E., Duncker, D.J., Visser, T.J., Kuiper, G.G.J.M., 2004. Characteristics and thyroid state-dependent regulation of iodothyronine deiodinases in pigs. Endocrinology 145, 4251–4263.
- Yancey, P.H., Somero, G.N., 1989. Counteraction of urea destabilization of protein structure by methylamine osmoregulatory compounds of elasmobranch fishes. Biochem. J. 183, 317–323.
- Yun, A.J., Lee, P.Y., Bazar, K.A., Daniel, S.M., Doux, J.D., 2005. The incorporation of iodine in thyroid hormone may stem from its role as a prehistoric signal of ecologic opportunity: an evolutionary perspective and implications for modern diseases. Med. Hypotheses 65, 804–810.