



Universidad Nacional Autónoma de México
Instituto de Neurobiología

**Mecanismo de acción de la 3,5-T₂:
interacción hormona-receptor**

Tesis que para obtener el grado de
Maestra en Ciencias (Neurobiología)

Presenta:

Lic. en Biotecnología Ana Gabriela Hernández Puga

Directora de Tesis:

Dra. Aurea Orozco Rivas

Campus Juriquilla, Querétaro. Noviembre 2011.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Universidad Nacional Autónoma de México
Instituto de Neurobiología

Los miembros de Jurado de Examen de Grado certificamos que la tesis elaborada por: Ana Gabriela Hernández Puga, cuyo título es: “Mecanismo de acción de la 3,5-T₂: interacción hormona-receptor” se presenta como uno de los requisitos para obtener el grado de Maestría en Ciencias (Neurobiología) y cumple con los criterios de originalidad y calidad requeridos por la Dirección de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Firma

Presidente

Dr. Enrique Pedernera Astegiano

Secretario

Dra. Aurea Orozco Rivas

Vocal

Dra. Maricela Luna Muñoz

Suplente

Dra. Rocío Brenda Anguiano Serrano

Suplente

Dr. Lenin David Ochoa de la Paz

Aprobado por el Comité Académico

Dra. Teresa Morales Guzmán

Coordinador del Programa

DEDICATORIA

A mi familia María José y Gustavo. Gracias por su amor y paciencia.

A mi mamá Ofelia Puga. Gracias por tu infinita entrega, amor y educación.

A mis hermanas y hermanos Sandy, Palomita, Fati, Elsitá, José y Javier. Gracias por su amor y apoyo incondicional.

A mis tías y tíos. Gracias por su cariño y atenciones.

A mis amigos. Gracias por su alegría y compañía.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Aurea Orozco Rivas, por ser mi maestra e impulsarme a ser una mejor profesional, y sobre todo por su amistad y confianza.

A los miembros del comité tutor, Dra. Brenda Anguiano por sus valiosas aportaciones a este trabajo. Por su amistad y apoyo. Al Dr. Juan Riesgo por sus comentarios y sugerencias.

A los miembros del jurado, Dr. Enrique Pedernera, Dra. Maricela, Dra. Brenda Anguiano Serrano y Dr. Lenin Ochoa, por sus comentarios y sugerencias.

Al Dr. Carlos M. Valverde Rodríguez, por sus valiosos comentarios y críticas, apoyo e interés en mi formación profesional.

A la M. en C. Patricia Villalobos Aguilera, por sus valiosas enseñanzas técnicas, compañía y amistad que hicieron mi trabajo en el laboratorio más placentero.

A Miguel Angel Maqueda, por su apoyo técnico y compañía en el laboratorio.

A mis hermanos del laboratorio, Auro, Pame, Arturo y César; por su alegría y amistad, y su valioso apoyo académico y personal.

A la Dra. María Carlota García-G, por su alegría y ejemplo profesional.

A Edna, Adriana, Ale, Magali, Carlos, Pao, Alex, Adán y Robert, por brindarme su amistad.

A la M. en C. Leonor Casanova Rico, por tu enorme apoyo y atención para los trámites administrativos.

A los miembros del laboratorio de Bioquímica de Hormonas, Dra. Maricela Luna, M. en C. Martha Carranza, Mariselita, Pepe, Cinthia, José Luis, Stephie, Clara y Gerardo por su apoyo técnico y amistad.

Esta tesis se realizó en el laboratorio de Fisiología Evolutiva del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección de la Dra. Aurea Orozco Rivas.

Este trabajo fue apoyado por:

Beca de Maestría CONACYT No. 39939

Proyecto CONACYT No. 080420

Proyecto PAPIIT IN208511

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	1
RESUMEN	3
SUMMARY	4
INTRODUCCIÓN	5
ANTECEDENTES	6
1- Hormonas Tiroideas.....	6
1.1-Mecanismo de acción de las hormonas tiroideas	7
2- Estructura de los receptores de hormonas tiroideas	8
2.1- Expresión y regulación de los receptores de hormonas tiroideas por T ₃	10
2.1.1- TR α.....	11
2.1.2- TR β.....	11
2.2- Mecanismos moleculares de las acciones de los TR.....	12
2.2.1- El receptor de ácido retinoico X y su relación funcional con el TR.....	13
2.2.2- Los correguladores y su función en la transactivación TR-dependiente	14
3-Conocimiento Actual de la 3,5-T ₂	17
JUSTIFICACIÓN	18
HIPOTESIS	20
OBJETIVOS	20
MATERIALES Y MÉTODOS	21
1- Construcciones de TRβ1 y transfección en el sistema de expresión	21
2- Diseño Experimental.....	21

2.1- Experimentos <i>in vitro</i>	21
2.1.1- Tratamientos con T ₂ y T ₃ administradas en el medio de cultivo	21
2.1.2- Adición <i>in vitro</i> de T ₂ y T ₃	22
2.2- Experimentos <i>in vivo</i> (<i>teleósteos</i>).....	22
3- Extracción de proteínas nucleares.....	23
4- EMSA.....	23
5- Análisis estadístico.....	24
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	25
1- Experimentos <i>in vitro</i>	25
1.1- Tratamientos con T ₂ y T ₃ administradas en el medio de cultivo.....	25
1.2- Adición <i>in vitro</i> de T ₂ y T ₃	27
2- Experimentos <i>in vivo</i>	28
2.1- Hipertiroidismo.....	28
2.2- Hipotiroidismo + reemplazo con TH.....	31
2.3- Hipertiroidismo + RA.....	32
2.4- Hipotiroidismo + reemplazo con TH + RA.....	35
CONCLUSIONES	38
REFERENCIAS	39
LISTA DE FIGURAS	44
LISTA DE TABLAS	45
APÉNDICE 1	46
APÉNDICE 2	49

LISTA DE ABREVIATURAS

3,5-T ₂ o T ₂	3,5-diyodotironina
9- <i>cis</i> RA	9- <i>cis</i> ácido retinoico
B	dominio bisagra
Ds	desyodasas
DBD	dominio de unión al ligando
DR	repetido directo
EMSA	ensayo de retardo en la movilidad electroforética
Fh	<i>Fundulus heteroclitus</i>
GH	hormona del crecimiento
IGF-1	factor de crecimiento insulínico 1
IP	palíndrome inverso
LBD	dominio de unión al ligando
MCT8	transportador de monocarboxilatos 8
MMI	metimazol
NT	dominio amino terminal
PAL	palindrómico
RA	ácido retinoico
RAR	receptor de ácido retinoico
RARE	elemento de respuesta de ácido retinoico
RIA	radioinmunoensayo
RN	receptores nucleares
RTH	resistencia a hormonas tiroideas
rT ₃	3,5,3'-triyodotironina reversa
RXR	receptor de retinoides X
Tg	tiroglobulina
TH	hormonas tiroideas
THR α	gen del receptor de hormonas tiroideas alfa
THR β	gen del receptor de hormonas tiroideas beta

TR	receptor de hormonas tiroideas
TRE	elemento de respuesta de hormonas tiroideas
TRH	hormona liberadora de la tirotropina
TR α 1	receptor de hormonas tiroideas alfa 1
TR α 2	receptor de hormonas tiroideas alfa 2
TR β 1	receptor de hormonas tiroideas beta 1
TR β 2	receptor de hormonas tiroideas beta 2
TSH	hormona estimulante de la tiroides
TTR	transtiretina
T ₃	3,5,3'-triyodotironina

RESUMEN

La T_3 es considerada la principal hormona tiroidea bioactiva debido a su alta afinidad por los receptores nucleares de TH. Los TR forman heterodímeros con los receptores de retinoides X e interactúan con los elementos de respuesta de hormonas tiroideas localizados en las regiones promotoras de los genes TH-dependientes. Hemos observado en teleósteos que, al igual que la T_3 , la 3,5- T_2 regula la expresión de genes y promueve el reclutamiento de diferentes poblaciones de factores de transcripción al TRE. Los teleósteos expresan dos isoformas del TR β 1 que difieren en la presencia (TR β 1 largo) o ausencia (TR β 1 corto) de un inserto de 9 aminoácidos en la región de dominio de unión al ligando. En el presente trabajo analizamos si la T_2 interacciona preferentemente con una isoforma específica del TR β 1, realizando experimentos *in vitro*: expresión de ambas isoformas del TR β 1 en células CV1 tratadas con 10 nM de T_3 o T_2 ; y experimentos *in vivo*: inducción de diferentes estados tiroideos en presencia o ausencia de RA. En todos los casos, se evaluó de la formación de complejos TR-TRE mediante EMSAs. Los experimentos *in vitro* sugieren que la presencia de T_2 o T_3 aumenta la formación de los complejos TR β 1 largo-TRE o TR β 1 corto-TRE, respectivamente. Los experimentos *in vivo* muestran la formación de distintos complejos dependiendo del tratamiento con TH o RA. En conjunto, los resultados de esta tesis sugieren que la T_2 se une a la isoforma larga del TR β 1 y que a su vez éste complejo interactúa con una población de factores de transcripción distinta a la del TR β 1 corto unido a T_3 . Además, los resultados muestran que estas interacciones dependen del estado tiroideo del organismo.

SUMMARY

T₃ is considered the main bioactive thyroid hormone (TH) due to its high affinity for TH nuclear receptors (TR). TR form heterodimers with the retinoid X receptors and both interact with thyroid hormone responsive elements (TRE) located in the promoter regions of TH-responsive genes. We have described in teleosts that 3,5-T₂, like T₃, regulates gene expression and promotes the recruitment of different populations of transcription factors to the TRE. Teleosts express two isoforms of TRβ1 that differ in the presence of (long TRβ1) or the lack of (short TRβ1) 9 amino acid inserted in the ligand binding domain. In the present work we analyzed if T₂ preferentially interacts with a specific TRβ1 isoform. To this end, we conducted *in vitro* experiments: expression of both TRβ1 isoforms in CV1 cells treated with 10 nM of T₃ or T₂; and *in vivo* experiments: induction of different thyroidal states in the presence or absence of retinoic acid (RA). For all the experiments, the formation of TRβ1-TRE complexes were assessed by EMSAs. *In vitro* experiments show that the assembly of both complexes; long TRβ1-TRE or short TRβ1-TRE, depend on the presence of T₂ or T₃, respectively. *In vivo* experiments evidenced the formation of complexes with different weights, depending on the TH, or RA treatment. Altogether, present results suggest that T₂ binds to the long TRβ1 isoform, and that this complex recruits a population of transcription factors different from that assembled with the short TRβ1 isoform in the presence of T₃. Furthermore, present results show that these interactions depend on the thyroidal status of the organism.

INTRODUCCIÓN

Las hormonas tiroideas forman parte de un conjunto de compuestos yodados de gran importancia en vertebrados, pues participan en el crecimiento y diferenciación celular, así como en el metabolismo energético. Dichos procesos están mediados principalmente por los efectos nucleares de la triyodotironina o T_3 , la cual regula la transcripción de diversos genes mediante su unión a los receptores nucleares de hormonas tiroideas. En cuanto al resto de las hormonas tiroideas, se sabe que la 3,5-diyodotironina o 3,5- T_2 , que se genera por la desyodación del anillo externo de la T_3 , tiene efectos extra-nucleares sobre la regulación del metabolismo energético a nivel mitocondrial; sin embargo, poco se conoce sobre sus efectos genómicos. En este aspecto, estudios *in vivo* realizados en nuestro laboratorio han demostrado que la T_2 tiene la capacidad de regular la actividad de genes responsivos a hormonas tiroideas en igual magnitud y sentido que la T_3 . Aun cuando los mecanismos involucrados en dicha regulación no se han descrito, existe evidencia que sugiere la participación de complejos transcripcionales o isoformas de receptores a hormonas tiroideas distintos a los que median los efectos de T_3 . Por esta razón, en esta tesis nos proponemos investigar si la T_2 interactúa con al menos una isoforma específica del $TR\beta_1$, distinta a aquella que interacciona con T_3 .

ANTECEDENTES

1- Hormonas Tiroideas.

En todos los vertebrados, las yodotironinas u hormonas tiroideas son mensajeros endócrinos involucrados en procesos de diferenciación durante el desarrollo de los individuos, además de la regulación del balance energético durante su vida adulta.

Las TH son sintetizadas por la glándula tiroides, a partir del aminoácido tirosina y presentan la característica de contener yodo en su estructura. La principal TH secretada por la glándula tiroides es la tetrayodotironina ó T_4 , la cual es considerada una prohormona, pues es convertida de manera tejido específica en TH activa (T_3) ó inactiva (rT_3). Esta conversión implica la remoción estereo-específica de átomos de yodo de la molécula de T_4 y está catalizada por la acción de enzimas denominadas desyodasas. Hasta ahora se reconocen a tres distintas Ds; la D2 cataliza exclusivamente la desyodación del anillo externo o vía de activación y la D3 la desyodación del anillo interno o vía de inactivación, mientras que la D1 cataliza ambas reacciones. Mediante estas vías desyodativas se generan otros compuestos yodados ($3,3'$ - T_2 y $3',5'$ - T_2) a los cuales hasta el momento no se les ha atribuido actividad biológica alguna, con la excepción de la 3,5-diyodotironina ($3,5$ - T_2), la cual se forma por la vía de activación a través de la desyodación de la T_3 (Figura 1). En la presente tesis nos referiremos a la $3,5$ - T_2 como T_2 .

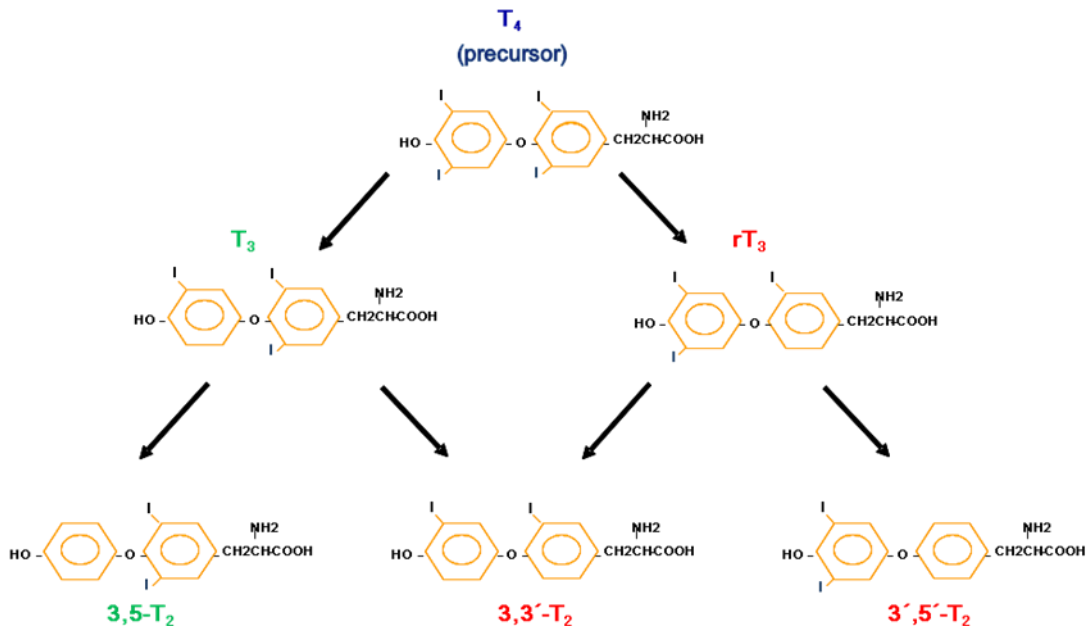


Figura 1. Estructura de las TH. Mediante la desyodación del anillo externo o interno de la T₄ se generan la T₃ y la rT₃, respectivamente. La remoción secuencial de yodo genera a los metabolitos inactivos 3,3'-T₂ y 3',5'-T₂, así como a la TH bioactiva 3,5-T₂.

1.1- Mecanismo de acción de las hormonas tiroideas.

El mecanismo de acción clásico de las TH involucra su unión a los receptores nucleares de hormonas tiroideas, los cuales actúan como factores de transcripción dependientes del ligando. Como se describe más adelante, estos TR se encuentran unidos a secuencias específicas de ADN denominadas TRE, y de esta manera regulan la síntesis de proteínas que modulan procesos biológicos dependientes de TH (Cheng *et al.*, 2010). Como se mencionó, se reconoce a la T₃ como la principal TH bioactiva, ya que presenta la mayor afinidad por los TR ($K_d = 1$ nM, al compararla con la afinidad de la T₄ que presenta una $K_d = 5$ nM) (Latham *et al.*, 1976) e induce la activación o represión de la transcripción. Hasta la fecha, es a la T₃, a la que se le atribuyen los efectos genómicos de las yodotironinas; ya que únicamente se han reportado efectos no genómicos por parte de su precursora, la T₄ (Cheng *et al.*, 2010); sin embargo, y como se mencionara más adelante, existe otra yodotironina a la que se le han descrito efectos genómicos.

Aún cuando el mecanismo de acción para la mayoría de los efectos de las TH se realiza modulando la transcripción de genes a través de la vía mediada por receptores de T₃, estas hormonas también presentan efectos no genómicos o extra-nucleares. Al respecto, se ha descrito que las TH pueden interactuar a nivel de la membrana celular y modular, de manera ligando-dependiente, la función de enzimas y proteínas. Por ejemplo, modifican la composición del citoesqueleto a través de modificaciones en el estado de la actina, inducen la presencia de transportadores de iones como la Na,K-ATPasa a nivel de la membrana plasmática vía segundos mensajeros; modifican la actividad de ciertos receptores a neurotransmisores (Ghosh y Das, 2007, Losi *et al.*, 2008) e incluso modifican la expresión de los TR en la mitocondria. Es importante destacar que estos mecanismos rápidos no están plenamente dilucidados (Davis *et al.*, 2008).

2- Estructura de los receptores de hormonas tiroideas.

Los TR forman parte de la superfamilia de receptores nucleares que incluye a los receptores de hormonas esteroides, vitamina D y ácido retinoico, entre otros. Todos ellos se caracterizan por compartir una organización de dominios funcionales constituida por: un dominio amino-terminal, necesario para la unión de proteínas correguladoras y la activación del receptor independiente del ligando; un dominio de unión al ADN, que contiene dos dedos de zinc esenciales para su unión con el ácido nucleico; una región bisagra, que contiene la señal de localización nuclear del receptor y que participa en la dimerización del mismo, y un dominio carboxilo terminal que une al ligando y al cual también se le asocian proteínas correguladoras y es necesario para la dimerización del receptor (Figura 2).

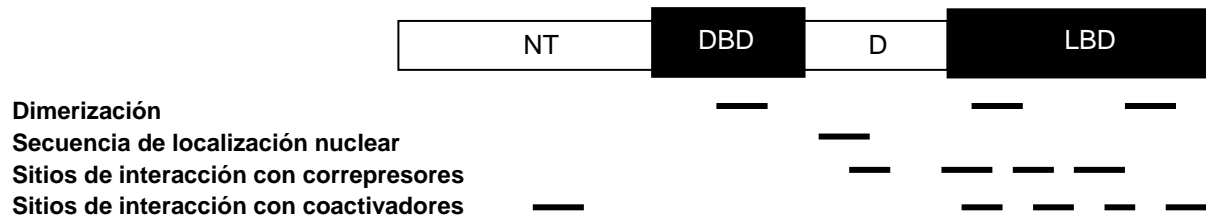


Figura 2. Estructura y organización funcional de los receptores nucleares.

El dominio más altamente conservado entre los RN es el DBD, el cual interactúa específicamente con hexámeros de nucleótidos de ADN. Estas secuencias varían en su arreglo y en su espaciamiento hasta en una base nucleotídica. Por otro lado el LBD está formado por 12 α -hélices que crean una bolsa hidrofóbica a la que se unen ligandos lipofílicos de estructura variable, así como moléculas correguladoras. El resto de los dominios varía entre los miembros de la familia e incluso entre isoformas del receptor (Yen, 2001).

La clonación inicial de los TR en distintos vertebrados mostró diferencias estructurales entre éstos, especialmente en el dominio NT. Posteriormente, al realizar el análisis de las secuencias se determinó que existían múltiples isoformas del TR, las cuales son codificadas por dos genes: el $THR\alpha$ y el $THR\beta$, presentes en todos los vertebrados. Además, existe heterogeneidad adicional entre los TR debido a la edición alternativa del RNA del $TR\alpha$ y por el uso de un promotor alternativo en el gen $THR\beta$, generando múltiples isoformas de cada gen de TR, entre ellas: $TR\alpha2$, $TR\alpha1$, $TR\beta2$ y $TR\beta1$; de las cuales sólo las últimas tres tienen la capacidad de transactivación, que se refiere a la capacidad de incrementar la tasa de expresión génica (Figura 3).

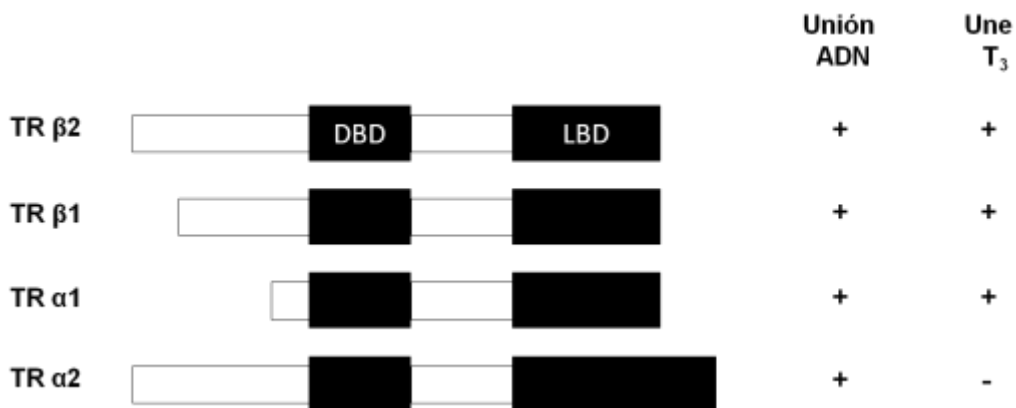


Figura 3. Estructura general de los principales TR y sus propiedades funcionales. *Modificado de Yen, 2001.*

El mecanismo de activación de los TR consiste en: 1) entrada de la hormona hacia el núcleo; 2) unión de la hormona a homo o heterodímeros del receptor; 3) reclutamiento de los complejos correguladores y la maquinaria transcripcional, y 4) activación/represión de la transcripción. Sin embargo, los TR también pueden activarse en ausencia de su ligando y regular la transcripción de genes TH-dependientes de manera positiva, y aunque se desconoce el mecanismo exacto de dicha regulación, existe evidencia que sugiere de la participación de algunos correpresores o incluso la fosforilación del receptor (Yen, 2001). Por lo que el mecanismo descrito anteriormente es aún más complejo y diverso y actualmente se encuentra en estudio.

2.1- Expresión y regulación de los receptores de hormonas tiroideas por T₃.

En el desarrollo y en la etapa adulta, la expresión de las isoformas TR es dependiente del tejido y es regulada por una compleja interacción de señales endócrinas.

2.1.1- TR α .

Como se mencionó anteriormente la expresión del gen THR α genera dos isoformas mediante splicing alternativo, el TR α 1 y el TR α 2; las cuales difieren en la longitud y secuencia de aminoácidos de la región carboxilo y amino terminal. Estas diferencias determinan el papel funcional de las dos isoformas, ya que el TR α 2 que no une T₃, sí se une al TRE, aunque con menor afinidad que el TR α 1. Así, el TR α 2 se considera un receptor dominante negativo ya que compite por los sitios del TRE de genes dependientes de T₃, probablemente reprimiendo su expresión.

En cuanto a su distribución, el TR α 1 se expresa constitutivamente en sistema nervioso durante el desarrollo embrionario y neonatal. En el adulto, esta isoforma se expresa, además del cerebro, en corazón, músculo esquelético, cerebro y tejido adiposo café. El TR α 2 se expresa principalmente en cerebro. La expresión de ambas isoformas disminuye discretamente por T₃ en diversos tejidos, con excepción del cerebro (Lazar, 1993, Yen 2001).

2.1.2- TR β .

El gen THR β contiene dos regiones promotoras que permiten la expresión de uno o ambos transcritos: el TR β 1 y el TR β 2, los cuales son idénticos en su estructura y únicamente difieren en el dominio NT. Esta diferencia no modifica las características de unión al ligando (K_d = 1 nM de T₃) y al DNA.

Los TR β se expresan prácticamente en todas las células, sin embargo los niveles de expresión de las dos isoformas varían de manera órgano y tiempo-específica. Por ejemplo, el TR β 1 se expresa predominantemente en hígado, riñón, tiroides y cerebro mientras que el TR β 2 se expresa primordialmente en la adenohipófisis, retina, así como en el oído interno (Lazar, 1993; Yen, 2001).

La expresión del gen THR β es regulada directamente por las TH, debido a la presencia de un TRE en la región promotora (Suzuki *et al.*, 1994). Esta regulación es negativa, es decir, ambas isoformas TR β 1 y TR β 2 son reguladas a la baja por T₃.

Se ha postulado que las distintas funciones de las TH podrían estar reguladas por isoformas específicas del receptor. Al respecto, estudios de mutagénesis dirigida (*knock out*) de los genes $THR\alpha$ o $THR\beta$ en ratones han mostrado el despliegue de distintos fenotipos para cada TR. Lo anterior obliga a profundizar en el estudio de la regulación de genes en tejido y tiempo específicos por parte de las isoformas de TR (Cheng *et al.*, 2010).

Al respecto, se sabe que mutaciones puntuales en la región codificante del LBD del gen $THR\beta$ generan una enfermedad genética en el humano denominada “resistencia a hormonas tiroideas”. En la RTH, los pacientes presentan niveles circulantes altos de T_3 y un fenotipo de estatura y peso bajos, taquicardia, entre otros aspectos clínicos. Esta patología se asocia a mutaciones en el $TR\beta_1$, lo que genera una baja o nula unión a la hormona y una deficiente transactivación (Cheng, 2005). Estos datos sugieren que cada isoforma de TR y/o la combinación en la que se expresan en los distintos tejidos, podrían desempeñar un papel importante en la diversidad de procesos finamente regulados por las TH.

2.2- Mecanismos moleculares de las acciones de los TR.

Como se mencionó anteriormente, los TR se unen a los TRE, secuencias específicas de nucleótidos localizadas en la región promotora de los genes responsivos a TH. La secuencia idealizada de un TRE es el hexámero (A/G)GGT(C/G)A, el cual representa un medio sitio al que se puede unir un TR; sin embargo, el arreglo más común de los TRE es de dos medios sitios los cuales pueden variar en su orientación y espaciamiento. Se han descrito al menos tres arreglos distintos de TRE: el palindrómico, el repetido directo 4, en el cual los medios sitios se encuentran espaciados por cuatro nucleótidos, y el palindrómico invertido, cuyos medios sitios se encuentran separados por seis nucleótidos. Dichos medios sitios son ocupados por los receptores ya sea formando heterodímeros con el receptor de ácido retinoico X; como homodímeros o incluso como monómeros (Lazar *et al.*, 1991), siendo la configuración de heterodímeros la más estable para los efectos regulatorios de la T_3 (Ikeda *et al.*, 1996) (Figura 4).

2.2.1- El receptor de ácido retinoico X y su relación funcional con el TR. Se sabe que los receptores nucleares de retinoides X y de ácido retinoico, median los múltiples efectos de los retinoides *9-cis*-RA y RA, respectivamente (Levin *et al.*, 1992), mediante el reconocimiento de los elementos de respuesta de ácido retinoico. Estos elementos de respuesta están formados por repetidos directos espaciados por un nucleótido (DR1) con secuencia 5'-A/GGGTC-3'; a la que se unen homodímeros RAR y RXR. Por otro lado, los RXR tienen la capacidad de formar heterodímeros con otros RN no esteroideos que interactúan con elementos de respuesta de distintas configuraciones de DR (DR1-DR5, repetidos directos espaciados por uno a cinco nucleótidos), lo que diversifica la combinación de receptores y permite un mayor control en la expresión génica (*revisado por* Mangelsdorf y Evans, 1995). Hasta hace poco, el RXR era considerado como un “compañero silencioso” requerido para aumentar la estabilidad, especificidad y selectividad de unión heterodímero-ADN de los TR; sin embargo estudios realizados *in vitro* muestran que agonistas selectivos del RXR transactivan de forma sinérgica con los TR ligados (Li *et al.*, 2002, Castillo *et al.*, 2004). Esto sugiere el reclutamiento de combinaciones distintas de corre reguladores para inducir la transcripción, lo cual parece depender del contexto celular en el que se exprese una combinación favorable de coactivadores y correpresores.

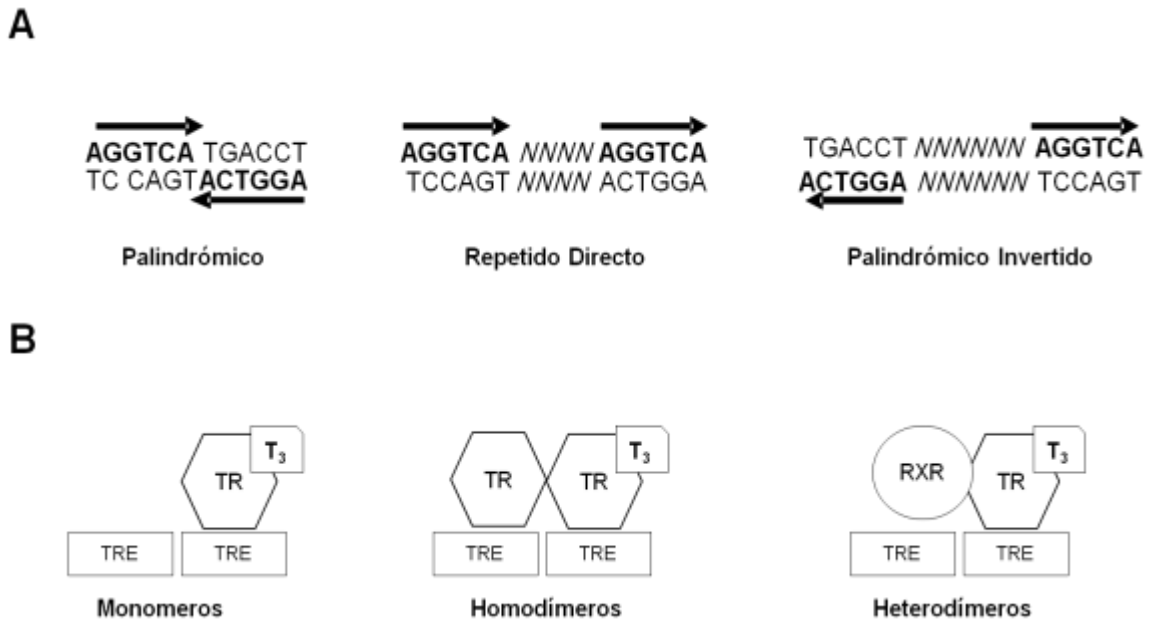


Figura 4. Mecanismos moleculares de la acción de los TR. A. Orientación y arreglo de los medios sitios que conforman a los principales TRE. Las flechas indican la orientación del medio sitio en el ADN, *N* se refiere al número de nucleótidos inespecíficos que separan a los medios sitios. Se muestra la configuración palindrómico, repetido directo espaciado por cuatro nucleótidos y palindrómico invertido espaciado por seis nucleótidos. B. Tipos de asociación de los TR con el TRE. Los TR pueden asociarse al TRE como monómeros, homodímeros o formando heterodímeros con el RXR. *TRE*, elemento de respuesta a TH, *TR*, receptor de TH; *RXR*; receptor de ácido retinoico.

2.2.2- Los correguladores y su función en la transactivación TR-dependiente. El mecanismo de regulación de la expresión génica por TH es muy complejo y dependiendo del gen blanco, la combinación T₃-TR-TRE o TR-TRE puede promover ya sea la inducción ó la represión de la transcripción del mismo. Además, existe otro nivel de regulación transcripcional dada por los correguladores, que incluyen coactivadores y correpresores, los cuales modulan la transcripción vía modificaciones enzimáticas sobre la cromatina y median la interacción del TR con el complejo transcripcional (Lee *et al.*, 2001).

Los correpresores se unen a los TR y reprimen la expresión de genes en ausencia del ligando. Los correpresores se encuentran dentro de complejos que poseen actividad desacetilasa de histonas que a su vez pueden interactuar con elementos de la maquinaria transcripcional para generar un estado de represión basal (Tabla 1).

Posteriormente, la unión del ligando induce un cambio conformacional en el receptor que permite la unión de complejos coactivadores.

Los coactivadores regulan la transcripción mediada por TR, algunos coactivadores que se asocian a los TR son factores que poseen actividad acetilasa de histona o que interactúan directamente con la maquinaria de transcripción basal e inducen la relajación de la cromatina, reclutamiento de la RNA polimerasa y activación transcripcional (Yen, 2001) (Tabla 1).

Tabla 1. Proteínas correguladoras que interaccionan con el complejo TR-TRE.

	Complejo	Componentes	Nombre	Actividad
Coactivadores	HAT	SRC-1, 2 y 3	<i>steroid receptor coactivator</i>	Histona acetiltransferasa
		p300/ CBP	<i>CREB binding protein</i>	
		PCAF	<i>p300/ CBP associated factor</i>	
	HMT	CARM1	<i>coactivator-associated arginine methyltransferase 1</i>	Metiltransferasa
		PRMT1	<i>arginine methyltransferase 1</i>	
	DRIP/TRAP	~ 15 miembros	<i>vitamin D receptor interacting protein/ coactivator complex and the thyroid hormone receptor-associated proteins</i>	Asociación con TR y RNA polimerasa II
Correpresores		N-coR	<i>nuclear receptor corepressor</i>	Asociación con TR y maquinaria de transcripción basal
		SMRT	<i>silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptors</i>	
		SUN-CoR	<i>small ubiquitous nuclear corepressor</i>	
		Sin3	<i>"seven in absentia" 3</i>	Histona desacetilasa
		HDAC1, 3 y 4	<i>histone deacetylase 1, 3 y 4</i>	
		RPF1	<i>ring finger domain 1</i>	Ubiquitinasa
		Ubch7	<i>ubiquitin-conjugating enzyme</i>	

Se muestran los complejos de correguladores y sus componentes (siglas y significado), así como la actividad reportada.

Es importante señalar que la expresión de los correguladores es dependiente del tipo celular y del estado de desarrollo, sin embargo, se conocen algunos mecanismos generales de la participación de los correguladores en la transcripción de genes tironino-dependientes (Figura 5): 1) la asociación TR-TRE en ausencia del ligando permite la unión de correpresores y; 2) la interacción T₃-TR-TRE induce la disociación de correpresores, el reclutamiento del complejo de acetilasas y metilasas de histonas, lo que induce el remodelamiento de la cromatina en las regiones promotoras; 3) la asociación del complejo DRIP/TRAP, que facilita la interacción del complejo RN con la

maquinaria de transcripción basal y 4) la disrupción del complejo de iniciación por ligasas de ubiquitina y Ubc ATPasa permitiendo la elongación y el cese de la activación.

Algunos estudios sugieren que la selectividad funcional de los receptores TR α 1 y TR β 1 podría deberse a la asociación con corre reguladores específicos (Fozzati *et al.*, 2011).

Hasta la fecha se han identificado más de 350 corre reguladores, algunos de ellos interaccionan con los TR e incrementan la transcripción dependiente de T₃.

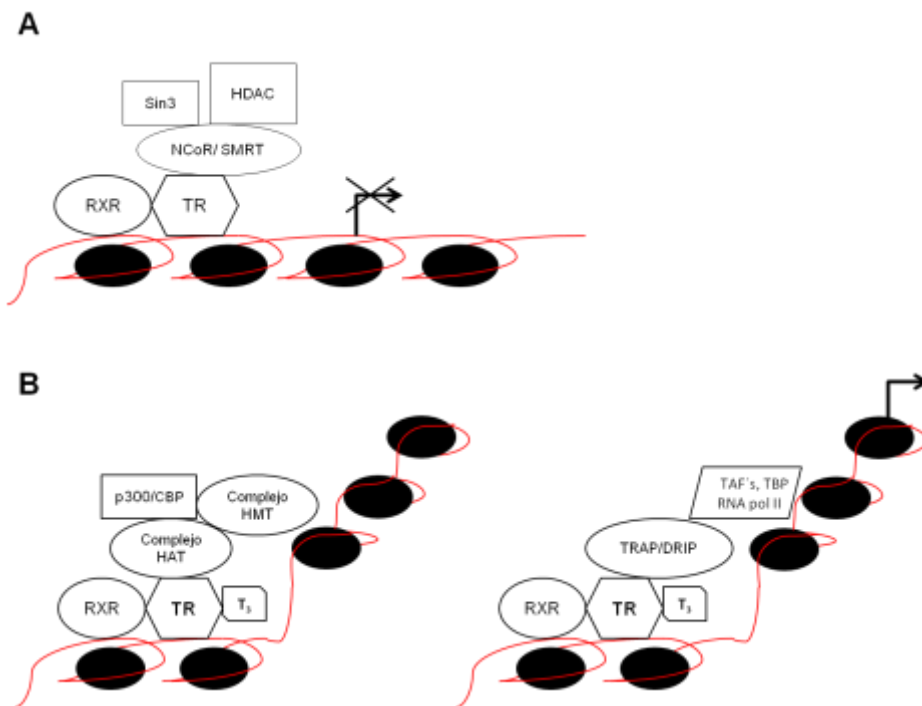


Figura 5. Mecanismos generales de la participación de los corre reguladores sobre la transcripción TH-dependiente. A. La ausencia de la TH induce el reclutamiento de corre presores hacia el complejo TR-RXR-TRE, los cuales inhiben el inicio de la transcripción. B. La interacción T₃-TR-RXR-TRE induce el reclutamiento de coactivadores que modifican el estado de la cromatina (extremo izquierdo) para permitir la asociación de la maquinaria transcripcional y promover el inicio de la transcripción (extremo derecho). TR, receptor a TH, RXR, receptor de ácido retinoico X. Complejo HAT, complejo con actividad acetilasa de histonas; CBP/p300, proteína de unión a CREB/p300; Complejo HMT, complejo con actividad metiltransferasa de histona; DRIP/TRAP, proteína de interacción con el receptor de vitamina D/ y proteínas asociadas al TR. NCoR, corepresor nuclear; SMRT, mediador de silenciamiento del receptor a retinoides y TH; Sin3, "seven in absentia" 3; HDAC, desacetilasa de histona. TAFs, factores asociados a TBP; TBP, proteína de unión a TATA; RNApol II, RNA polimerasa II.

3- Conocimiento actual de la 3,5-T₂.

Los efectos de las yodotironinas se pueden agrupar en dos categorías. Los involucrados en el mantenimiento del balance energético y los morfogénicos relacionados a la ontogenia o historia de vida de los organismos. Los efectos sobre el balance energético o efectos calorigénicos se conocen desde finales del siglo XIX (Magnus-Levi, 1895), sin embargo, hasta la fecha, los mecanismos moleculares a través de los cuales ocurren estos efectos no son claros. Tata (1963) demostró que el aumento en el consumo de oxígeno observado después del tratamiento con T₃ en ratas hipotiroideas requería de síntesis de proteínas *de novo* y sugirió que el núcleo era seguramente el efector final. Horst y colaboradores (1989) mostraron que la T₂, al igual que T₃ estimulaba el consumo de oxígeno en el hígado hipotiroideo con una potencia similar (1 pM), a excepción de que el efecto observado con T₂ ocurría más temprano que el efecto producido por la T₃. Posteriormente, mediante un modelo de hipotiroidismo y reemplazo, se demostró que una sola dosis de T₃ aumenta el consumo de oxígeno de manera similar a la descrita por Tata en 1963. Además, los animales tratados con una sola dosis de T₂ mostraron un incremento en el consumo de oxígeno, y este ocurrió más temprano que el provocado por el tratamiento con T₃. La co-administración con actinomicina-D, un inhibidor de la transcripción, únicamente bloqueó el efecto de T₃, pero no el de 3,5-T₂. En conjunto, estos resultados sugieren: i) que la T₃ y la T₂ tienen un efecto sobre el metabolismo energético; ii) que el efecto observado con T₂ es más temprano; y iii) que el efecto de T₂ no requiere de transcripción *de novo*. Estos dos últimos puntos sugieren un mecanismo de acción extra-nuclear (Moreno *et al.*, 1998; 2002; Goglia, 2005).

Además de sus acciones sobre el metabolismo energético, la T₂ tiene otros efectos como la inhibición de la secreción hipofisaria de la hormona estimulante de la tiroides y de la expresión de los receptores TRβ2 (Ball *et al.*, 1997), además de efectos estimulatorios sobre la síntesis de los mRNAs que codifican para la GH (Moreno *et al.*, 1998) y la D1 (Baur *et al.*, 1997). Es importante destacar que estos resultados se han obtenido en experimentos *in vitro* y que la magnitud de los efectos de la T₂ es hasta 100 veces menor a los observados con dosis equivalentes de T₃.

JUSTIFICACIÓN

En nuestro laboratorio nos hemos interesado en estudiar la bioactividad de la T_2 . Para esto, hemos utilizado principalmente como modelo biológico al teleósteo *Fundulus heteroclitus* (Apéndice 1). Inicialmente mostramos que: *i*) en animales intactos y de la misma manera y a la misma dosis que la T_3 , la administración de T_2 en dosis suprafisiológicas inhibe a la D2, enzima que cataliza su formación, tanto a nivel de actividad como de la expresión de su mRNA (García-G *et al.*, 2004), *ii*) en animales hipotiroideos y reemplazados con T_3 o con T_2 , al igual que con la T_3 , la T_2 mantiene en niveles eutiroideos la expresión (mRNA) de la D2 hepática, gen regulado a la baja por TH, así como el de la GH, gen regulado a alta por estas hormonas. Estos efectos no se observan en presencia del isómero inactivo rT_3 (García-G *et al.*, 2007). Estos resultados claramente demostraron que la T_2 tiene efectos a nivel de la expresión génica en estos organismos, hecho muy provocativo, ya que los únicos efectos que se le habían atribuido hasta la fecha eran los extra-nucleares (Goglia, 2005).

Para establecer el papel de la T_2 en la modulación de genes TH-responsivos, hemos examinado la unión de extractos de proteínas nucleares hepáticas a oligonucleótidos cuyas secuencias corresponden a los TRE canónicos. Los extractos de peces eutiroideos (no tratados) forman dos complejos proteína-DNA con el TRE, mientras que el tratamiento con MMI, un inhibidor de la síntesis de TH prácticamente eliminó estos complejos proteína-TRE. En los animales hipotiroideos (MMI) reemplazados con T_3 , predominó la formación del complejo de menor peso molecular, siendo de intensidad similar a la del animal eutiroideo. En contraste, en el tratamiento de MMI con T_2 predominó el complejo de mayor peso molecular (García-G *et al.*, 2007). Estos resultados sugieren que la T_2 , al igual que la T_3 , actúa directamente en la regulación de genes TH-dependientes. Más aún, nuestros datos demuestran que la T_3 y la T_2 interactúan con proteínas que se unen con alta especificidad a los clásicos TRE. La diferencia que se observa en el peso de los complejos formados sugiere que cada yodotironina podría unirse de manera específica ya sea a un receptor distinto, o a una

isoforma distinta del mismo receptor. Para responder a esto, clonamos el TR β 1 del hígado del teleosteo *Fh*, receptor predominante en dicho tejido, y encontramos dos isoformas distintos que presenta diferencias importantes al compararlo con los TR β 1 del resto de los vertebrados; *i*) ambas isoformas son 76 aminoácidos más cortos en la región NT; y *ii*) uno de las isoformas contiene un inserto de 9 aminoácidos en el dominio de unión al ligando. Nosotros hemos denominado a la isoforma con inserto como “larga” o TR β 1 largo, y a la isoforma sin inserto como “corta” o TR β 1 corto. Estas dos isoformas han sido reportadas en otros teleosteos (Marchand *et al.*, 2001), y pudieran tener relevancia funcional en la fisiología tiroidea de los organismos.

Los dos TR β 1: el largo y el corto, difieren en el dominio de unión al ligando, por lo que es posible que la presencia del inserto de 9 aa (TR β 1 largo) modifique la afinidad del receptor por una TH específica; y ya que el TR β 1 corto tiene mayor homología con el TR β 1 de humano en la porción carboxilo terminal y éste último tiene una alta afinidad por T₃, especulamos que el TR β 1 corto podría estar interactuando preferentemente con T₃, mientras que la T₂ podría estar interactuando preferentemente con el TR β 1 largo.

Por lo tanto, en el presente proyecto pretendemos profundizar en el estudio del mecanismo de acción de la T₂, analizando la interacción T₂/T₃-TR-TRE.

HIPOTESIS

El mecanismo de acción de la T_2 involucra su interacción con el TR β 1 largo, a diferencia de T_3 que interacciona preferentemente con el TR β 1 corto.

OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar la interacción de la T_2 con las distintas isoformas de receptores TR β 1 de teleósteo.

Objetivos Particulares

- 1.1 Expresar las construcciones (corto y largo) de TR β 1 de teleósteo en un sistema heterólogo (células que no expresan TR).
- 1.2 Explorar el efecto de las distintas yodotironinas sobre la interacción de los TR β 1 (largo y corto) con el TRE.
- 1.3 Evaluar el efecto de tratamientos con distintas yodotironinas y ácido retinoico *in vivo* sobre la interacción TR-TRE.

MATERIALES Y MÉTODOS

1- Construcciones de TR β 1 y transfección en el sistema de expresión heterólogo.

Los isotipos TR β 1 corto y largo se clonaron e insertaron en el vector de expresión pcDNA 3.3 (Invitrogen) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Como sistema heterólogo se empleo la línea celular CV1 (derivados de fibroblastos de riñón de mono), puesto que está reportado que en esta línea celular la expresión de TR es limitante (Zhu *et al.*, 1997, Nakano *et al.*, 2004). De esta forma, su empleo resulta ideal para la producción *in vitro* de TR. Las condiciones de cultivo para las células CV1 fueron las siguientes: medio mínimo Eagle modificado (Dulbecco), suplementado con 10% de suero bovino fetal, 100 U/mL de ampicilina y 100 μ g/mL de estreptomycin, 37°C de temperatura, 96% de humedad y 5% CO₂. El empleo de líneas celulares de mamíferos como sistema heterólogo para la expresión de TR de teleósteos ha sido utilizado previamente (Marchand *et al.*, 2001).

Las transfecciones se realizaron con el método de precipitación con fosfato de calcio (Apéndice 2). Cuando las células alcanzaron un 60-80% de confluencia ($\sim 5 \times 10^5$ células/placa) se transfectaron con 10 μ g ADN por placa de 100 mm. Se utilizaron dos plásmidos pcDNA 3.3 (Invitrogen) en los que se insertó la secuencia de ADN que contiene el marco abierto de lectura para los receptores Fh TR β 1 largo y Fh TR β 1 corto.

2- Diseño Experimental.

2.1- Experimentos *in vitro*.

2.1.1- Tratamientos con T₂ y T₃ administradas en el medio de cultivo.

El tratamiento con hormonas tiroideas de las células CV1 transfectadas con el TR β 1 largo o corto consistió en el reemplazo del medio de cultivo celular por medio

suplementado con T₂ ó T₃ a una concentración fisiológica de 10 nM durante 48 horas (37°C, 96% de humedad y 5% CO₂). Las proteínas nucleares aisladas (apartado 3) se analizaron en ensayos de retardo en la movilidad electroforética o EMSA.

2.1.2- Adición *in vitro* de T₂ y T₃.

Los extractos de proteínas nucleares que contenían a los TRβ1 largo o corto provenientes de células CV1 tratadas con T₂ o T₃ obtenidos (apartado 2.1.1) fueron incubados con una dosis de T₂ o T₃ (concentración final 10 nM) durante 12 h a 4°C, justo antes de ser ensayadas nuevamente mediante EMSA. De esta forma, se aumentó la concentración de los ligandos T₂ o T₃ con el propósito de favorecer la interacción de los TR con el TRE.

2.2- Experimentos *in vivo* (teleósteos): tratamientos con TH y RA.

Se diseñaron cuatro experimentos *in vivo* para evaluar el efecto de diferentes estados tiroideos sobre la interacción TR-TRE. Los detalles de cada uno se encuentran en la Tabla 2. Se emplearon tilapias (*Oreochromis niloticus*) juveniles (0.8 ± 0.07 g), que fueron mantenidas en el bioterio en condiciones de temperatura ambiente de 25 °C y ciclos de luz-oscuridad de 12:12 h. En todos los casos, la inducción de los distintos estados tiroideos en los grupos de tilapias (n= 4/grupo experimental/ 4 experimentos independientes) se llevó a cabo mediante la administración de TH y/o RA a distintas dosis. Concluidos los tratamientos, los juveniles se sacrificaron por decapitación y se disecaron los hígados, los cuales fueron procesados inmediatamente para la extracción de proteínas nucleares como se indica más adelante (apartado 3) y se evaluó la interacción TR-TRE mediante ensayos de retardo en la movilidad electroforética o EMSA (apartado 4). La administración de todos los tratamientos en los experimentos *in vivo* se realizó mediante el método de inmersión, el cual resulta ser muy eficiente para administrar fármacos hidrofóbicos a especies acuáticas (García-G *et al.*, 2004, 2007). En todos los casos, se verificó la eficacia de los tratamientos cuantificando la

concentración hepática de T₃ por RIA.

Tabla 2. Tratamientos con TH y RA.

Estado Tiroideo	Tratamiento: Dosis/Tiempo
Hipertiroidismo	T ₃ o T ₂ : 100 nM / 24 h
Hipotiroidismo y Reemplazo	MMI: 4.5 mM, T ₃ o 3,5-T ₂ : 30 nM / 5 días
Hipertiroidismo + RA	T ₃ o T ₂ : 100 nM, RA: 100 nM / 24 h
Hipotiroidismo y Reemplazo + RA	MMI: 4.5 mM, T ₃ o T ₂ : 30 nM, RA: 30 nM / 5 días

MMI: metimazol, RA: ácido retinoico. Las TH se disolvieron en NaOH 0.1 N y el RA se disolvió en DMSO. Los fármacos se administraron por el método de inmersión y la concentración final de ambos disolventes en el agua de cultivo no es tóxica para los organismos.

3- Extracción de proteínas nucleares.

La extracción de las proteínas nucleares de las células transfectadas y del tejido hepático se realizó con el kit ProteoJet Nuclear and Cytoplasmic Extraction (Fermentas) de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Apéndice 2).

4- EMSA.

Para evaluar si la interacción TR-TRE es modificada por las distintas yodotironinas se empleo la técnica EMSA, la cual permite estudiar la interacción DNA:proteína. En dicha técnica, extractos de proteínas nucleares son incubados con una sonda de DNA y los complejos formados son separados por electroforesis.

Mediante este ensayo se determinó la interacción de los TR presentes en los extractos nucleares de los experimentos *in vitro* e *in vivo* utilizando los TRE palindrómico [PAL: (AGGTCATGACCT)] y repetido directo 4 [DR4:

(AGGTCANNNNAGGTCA)] marcados con ^{32}P . La reacción de unión estándar (20 μL) contenía HEPES 20 mM, EDTA 1 mM, ditrioetilol 1 mM, glicerol 0.2%, KCl 30 mM, 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de competidor poli[dl-dC], 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de albumina bovina sérica y 100-200 μg de extracto de proteínas nucleares. Después de la adición del oligonucleótido marcado (10 pmol) la reacción fue incubada a 4 $^{\circ}\text{C}$ por 40 min. Para evaluar la especificidad de los complejos se agregó 1000 X de TRE no marcado en la mezcla de unión. Los complejos proteína-DNA se resolvieron en un gel de poliacrilamida no desnaturizante al 5% a 120 V por 4 h. Posteriormente el gel fue secado y se expuso a una pantalla sensible a ^{32}P (Molecular Dynamics). La pantalla se escaneó con el equipo Storm Phosphorimager y se realizó un análisis densitométrico de la imagen obtenida con el 1D Kodak Analysis Software (Kodak).

5- Análisis estadístico.

Los datos de intensidad de los complejos TR-TRE se analizaron con la prueba ANOVA acoplada a la prueba de comparaciones múltiples de Tukey (control vs tratamientos). En los experimentos *in vitro* se tomo como control a los complejos formados con los extractos nucleares de las células transfectadas con el receptor largo o corto y que no recibieron tratamiento. Mientras que para los experimentos *in vivo* se tomo como control a los complejos formados los extractos nucleares del grupo de tilapias que no recibió tratamiento y que fue mantenido bajo las mismas condiciones experimentales.

RESULTADOS Y DISCUSION

1- Experimentos *in vitro*

1.1- Tratamientos con T₂ y T₃ administradas en el medio de cultivo.

Los resultados obtenidos del EMSA con los TRβ1 largo y corto expresados en células tratadas en el medio de cultivo con T₃ o T₂ (10 nM) se ilustran en la Figura 6, panel A. En el primer carril observamos la migración del TRE libre, seguido del control negativo (extracto nuclear de células CV1 sin transfectar) en donde no se forman complejos, lo que confirma la baja expresión endógena de TR en esta línea celular. En el resto de los carriles se puede observar la interacción TR-TRE de los TRβ1 largo y corto expresados en células tratadas con las dos TH. El análisis densitométrico de los complejos muestra que ambos receptores reconocen e interaccionan con el elemento de respuesta de forma similar, esto es, no se observan diferencias significativas en la intensidad de los complejos TR-TRE de los TRβ1 largo y corto provenientes de células tratadas o no tratadas.

La interacción TR-TRE se puede ver afectada por varios factores, tales como la hetero u homodímerización del receptor; la configuración del elemento de respuesta, la presencia de TH (Pan *et al.*, 2010) e incluso el estado de fosforilación del receptor (Yen, 2001). Con respecto a la presencia de la hormona, se ha mostrado que la presencia *in vitro* de T₃ (100 nM) no afecta la afinidad de unión de homodímeros TRβ1-TRβ1 de humano al DNA (Takeda *et al.*, 2000). Nuestros resultados concuerdan con esta idea, ya que muestran que el tratamiento en cultivo empleando dosis fisiológicas de T₃ o T₂ no modifica la formación de complejos TRE-TRβ1 (largo y corto).

La falta de diferencias observadas entre los dos tratamientos se podría explicar por la baja disponibilidad de la hormona. Es decir, en una población de receptores sobreexpresados, es posible que el ligando pudiera encontrarse en concentraciones limitantes, por lo que dichos extractos podrían contener una gran cantidad de TRβ1 largo y corto no ligado.

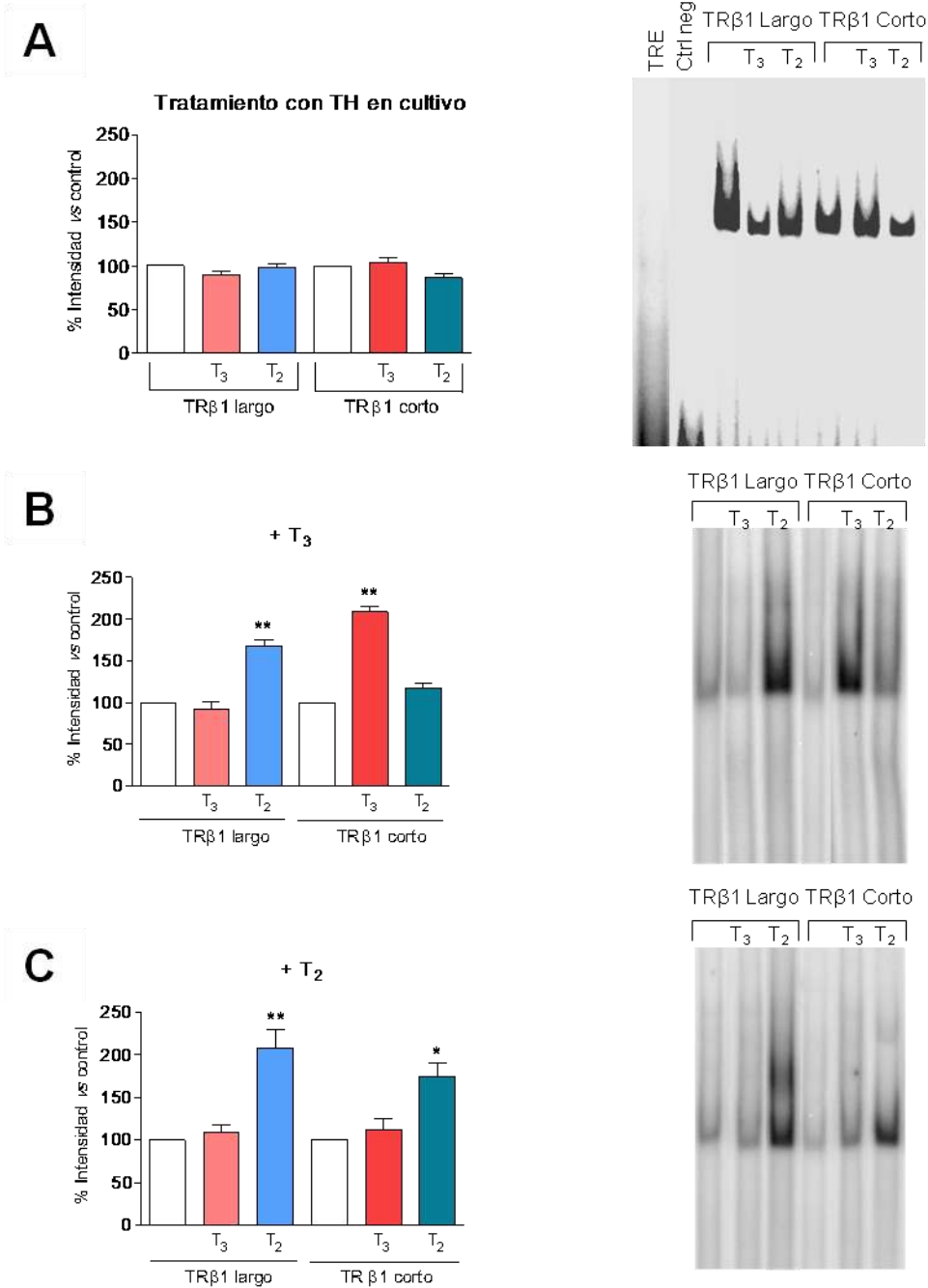


Figura 6. Efecto del tratamiento con TH sobre la interacción TR-TRE. A. EMSA representativo de TRβ1 corto y largo expresados en células tratadas con T₃ o T₂ (10 nM) e incubados con TRE palindrómico y análisis densitométrico de los complejos formados, Ctrl negativo (células sin transfectar). Los valores representan las medias±DS (n=3). Efecto de la adición *in vitro* de T₃ (B) o T₂ (C) durante 12 h a 4°C sobre la formación de complejos TRE- TRβ1 largo ó corto extraídos de células CV1 previamente tratadas con T₃ o T₂ y análisis densitométrico de los complejos formados. Los valores representan las medias±DS (n=3) (*p<0.01, **p<0.001 con respecto al control representado por las barras blancas).

1.2- Adición *in vitro* de T₂ y T₃.

En un intento por favorecer la formación de los distintos complejos, los extractos nucleares que contenían al TRβ1 largo o corto provenientes de células CV1 tratadas (con T₃ o T₂) o no tratadas (véase apartado 2.1.1) fueron incubados con una dosis fisiológica de 10 nM de T₃ o T₂ durante 12 h a 4°C y se evaluó la interacción TR-TRE mediante EMSA. De esta forma, también se podría evaluar el efecto de la presencia de ambas TH en los extractos nucleares que contenían al receptor largo y corto.

Encontramos que la adición de T₃ (Figura 6, panel B) favorece la interacción TRE-TRβ1 corto, cuando es expresado en células tratadas con T₃. Inesperadamente, la adición de T₃ también favoreció la interacción T₂-TRβ1 largo-TRE, lo que evidencia la alta afinidad de la T₂ por el receptor largo, que no es afectada en presencia de T₃. Estos resultados también podrían sugerir un efecto alostérico de la T₃ al favorecer la interacción de la T₂ con su receptor; y aunque no existen datos en la literatura al respecto; en los receptores a estrógenos se han reportado sitios de unión para antagonistas localizados en las superficies de interacción de coactivadores del LBD, y se ha mostrado que dicha asociación induce un cambio conformacional en los receptores que genera un estado de represión a nivel estructural de los mismos (Wang *et al.*, 2006).

Por otro lado, la adición de T₂ (Figura 6, panel C) favoreció la interacción T₂-TRβ1 largo-TRE y en menor proporción la de T₂-TRβ1 corto-TRE, lo que sugiere una mayor afinidad de la T₂ por el TRβ1 largo, favoreciendo su interacción con el TRE.

Es interesante observar que el tratamiento de las células CV1 con T₂ promueve una mayor interacción de los complejos cuando los TRβ1 son incubados con ese ligando; en cambio, cuando son incubados con T₃, la formación de dichos complejos se promueve únicamente con el TRβ1 corto. Estos resultados sugieren que la exposición continua a un determinado ligando a nivel celular podría activar la expresión de corre reguladores específicos que promueven una estabilidad en la interacción con el TRE y una isoforma de TR.

En conjunto, los resultados de los ensayos *in vitro* sugieren que la T₃ y la T₂ favorecen la formación de complejos TR-TRE al asociarse a un isotipo específico del TRβ1, siendo la forma larga probablemente más afín a T₂ y la corta a T₃. Esto concuerda con datos obtenidos en el laboratorio, que muestran que la capacidad de transactivación del TRβ1 largo es significativamente mayor en presencia de T₂ que de T₃. En contraste, la respuesta del TRβ1 corto es opuesta (Mendoza *et al.*, 2011).

2- Experimentos *in vivo*.

Por otro lado, se diseñaron una serie de experimentos *in vivo* para analizar el efecto del estado tiroideo sobre la formación de complejos TR-TRE. Como se indicó anteriormente (apartado 2.2 sección *Materiales y Métodos*) los tratamientos consistieron en la administración de distintas dosis de T₃ o T₂, para evaluar los efectos inducidos por ambas TH. Además, en algunos experimentos se co-administró RA para determinar el efecto de la presencia del ligando del RXR, compañero heterodimérico de los TR. Para verificar la eficacia de los tratamientos, se extrajeron las TH del hígado de los animales experimentales y se cuantificó la concentración hepática de T₃.

2.1- Hipertiroidismo.

La Figura 7, panel A muestra las concentraciones hepáticas de T₃ de los hígados de tilapias hipertiroideas por T₃ o T₂. Se observa que el tratamiento con T₃ aumenta significativamente las concentraciones hepáticas de dicha hormona (véase grupo T₃ vs control), lo que corrobora la eficacia del tratamiento. Por otro lado, el EMSA (Figura 7, panel B y C) muestra dos complejos TR-TRE con los extractos de proteínas nucleares de las tilapias no tratadas, situación similar a la observada en otras especies (García-G *et al.*, 2007). Una posible explicación a estos distintos complejos sería la interacción con TR distintos: corto y largo, y el reclutamiento de poblaciones distintas de corre reguladores.

El tratamiento con T₃ aumenta la intensidad de ambos complejos, indicando que el ligando induce la asociación de su receptor con el elemento de respuesta, y en efecto,

experimentos *in vitro* han mostrado que en la presencia de T₃ induce la interacción del TR-TRE (Force y Spindler, 1994, Tagami *et al.*, 2009), lo que podría indicar que debido a la alta afinidad de la hormona por los TR, la formación de los complejos aumenta.

De igual forma, el tratamiento con T₂ aumenta la intensidad de los complejos, siendo mayor el aumento del complejo de mayor peso ($p < 0.0001$). Lo que sugiere que la T₂ también tiene afinidad por los TR de tilapia.

En resumen, ambas yodotironinas aumentan la intensidad de los complejos sugiriendo que: 1) interaccionan con los TR y 2) podrían participar en la asociación de dichos receptores con correguladores distintos.

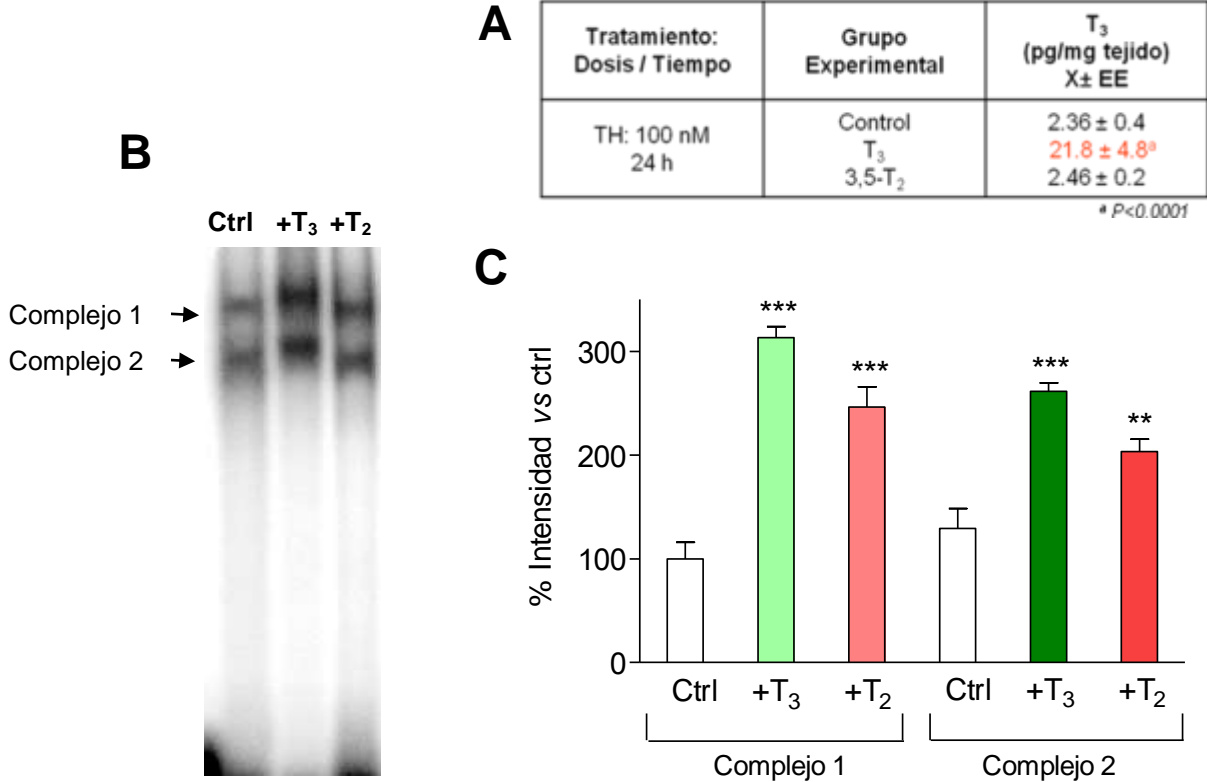


Figura 7. Efecto del hipertiroidismo sobre la interacción TR-TRE DR4. A. Concentraciones hepáticas de T₃ en los diferentes grupos experimentales y el tratamiento (dosis/tiempo) ^a P<0.0001 en comparación con el control. B. EMSA representativo de extractos nucleares de tilapias tratadas con dosis suprafisiológicas de T₃ o T₂. Las flechas indican los complejos formados. C. Análisis densitométrico de los complejos formados en comparación con el grupo control, los valores representan las medias±DS, n=3 (**p<0.001, *** p<0.0001 con respecto al control).

2.2- Hipotiroidismo + reemplazo con TH.

Las concentraciones hepáticas de T_3 (Figura 8, panel A) confirman la inducción de hipotiroidismo y la eficacia del tratamiento de reemplazo al obtener una disminución de alrededor del 50% en la concentración hepática de T_3 en el grupo tratado con MMI y no reemplazado. Además, las concentraciones hepáticas de T_3 en el grupo reemplazado con dicha hormona fueron semejantes al grupo control. El EMSA de los extractos de proteínas nucleares de tilapias hipotiroideas no muestra la formación de complejos definidos al compararlo con el grupo de tilapias no tratadas, lo que sugiere que es necesaria la presencia de la hormona (el ligando) en una concentración determinada para que se lleve a cabo la interacción TR-TRE (Figura 8, panel B y C). En el grupo tratado con MMI y reemplazado con T_3 únicamente se observa la formación y un aumento en la intensidad del complejo de menor peso. De igual forma, en el grupo reemplazado con T_2 se forma el complejo de menor peso, y de intensidad similar a la del grupo de tilapias no tratadas (Figura 8, panel B y C).

Es interesante notar que la administración de dosis equimolares de T_3 y T_2 en tilapia favorecen la formación del complejo de menor peso, patrón distinto a lo observado en experimentos de reemplazo en otras especies, en los que la formación de uno u otro complejo depende de la yodotironina presente (García-G *et al.*, 2007). Aunque desconocemos la composición de estos complejos, las diferencias en la intensidad de los mismos sugieren que la T_3 podría estar asociándose a los TR con mayor afinidad que la T_2 . Sin embargo, sería necesario realizar más estudios para determinarlo.

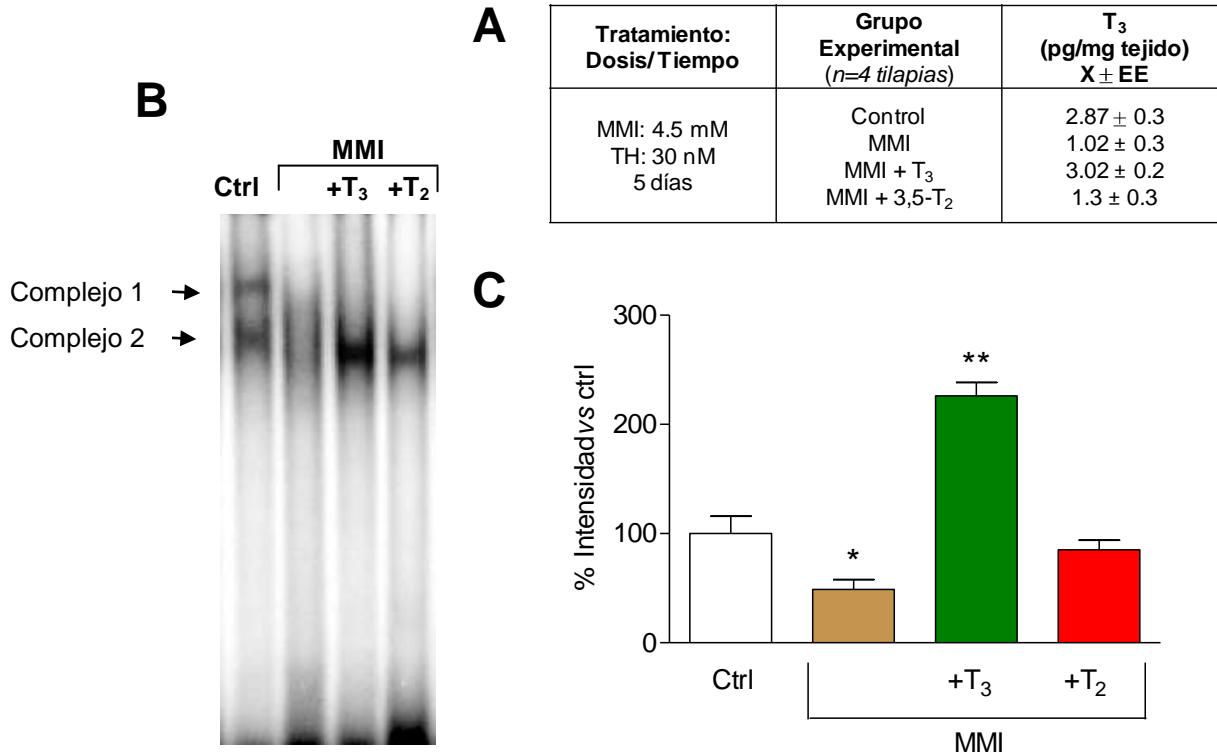


Figura 8. Efecto del hipotiroidismo+TH sobre la interacción TR-TRE DR4. **A.** Concentraciones hepáticas de T₃ de los diferentes grupos y el tratamiento (dosis/tiempo). **B.** EMSA representativo de extractos nucleares de tilapias hipotiroideas reemplazadas con T₃ o T₂. Las flechas indican los complejos formados. **C.** Análisis densitométrico del **complejo 2** formado con los diferentes grupos experimentales. Los valores representan las medias±DS, n=3 (*p<0.05, **p<0.001 con respecto al control).

2.3- Hipertiroidismo + RA.

Como se observa en la Figura 9, panel A, el tratamiento con RA aumenta discretamente las concentraciones hepáticas de T₃. Dicho efecto podría deberse a un aumento en la expresión de transportadores intracelulares de T₃ (Kogai *et al.*, 2010) o de la proteína transportadora transtirretina (Tan *et al.*, 2001). De igual forma, se ha reportado que dosis farmacológicas de RA aumentan la conversión de T₄ a T₃ *in vitro* (Morley *et al.*, 1980). Por lo que la administración de RA podría tener un efecto positivo sobre algunos reguladores de la disponibilidad de TH en tejido de teleosteo y sería necesario realizar otros estudios para evaluar dichas posibilidades.

Como observamos con los animales hipertiroides (Figura 7, A), el grupo tratado con RA + T₃, pero no aquel tratado con RA + T₂ muestra un aumento significativo en las

concentraciones hepáticas de T_3 , verificando una vez más la eficacia de los tratamientos.

El EMSA correspondiente se muestra en el panel B de la Figura 9. Como se puede observar, un exceso del ligando RA (100 nM), impide la formación de complejos TR-TRE. Una posible explicación sería que el RA aumenta la expresión de su receptor (Wan *et al.*, 1994) y favorezca la formación de homodímeros RXR-RXR, lo que a su vez reduciría la asociación con los TR. Por otro lado, el co-tratamiento de RA y T_3 o T_2 induce la formación del complejo de menor peso (complejo 2) y de menor intensidad al observado con el grupo control (Figura 9, C); este patrón de interacción TR β 1-TRE es distinto al obtenido en tilapias hipertiroideas (Figura 7, B), sugiriendo una posible participación de ambos ligandos en el complejo observado. Esta idea es congruente con estudios previos que han reportado que en presencia del RXR, la principal interacción de los TR con el TRE es en la configuración de heterodímeros (Lazar, 1993). Además, se ha mostrado que el tratamiento *in vitro* de TH+RA aumenta la transactivación mediada por heterodímeros TR-RXR.

En cuanto a la disminución en la intensidad de los complejos pudiera deberse a varios factores como son: un efecto inhibitorio del RA sobre la expresión del TR, el cual ha sido reportado en ensayos *in vitro* (Drvota, 1998) y que se traduce en una disminución de las unidades de dicho receptor o la homodimerización del RXR, como se planteó anteriormente.

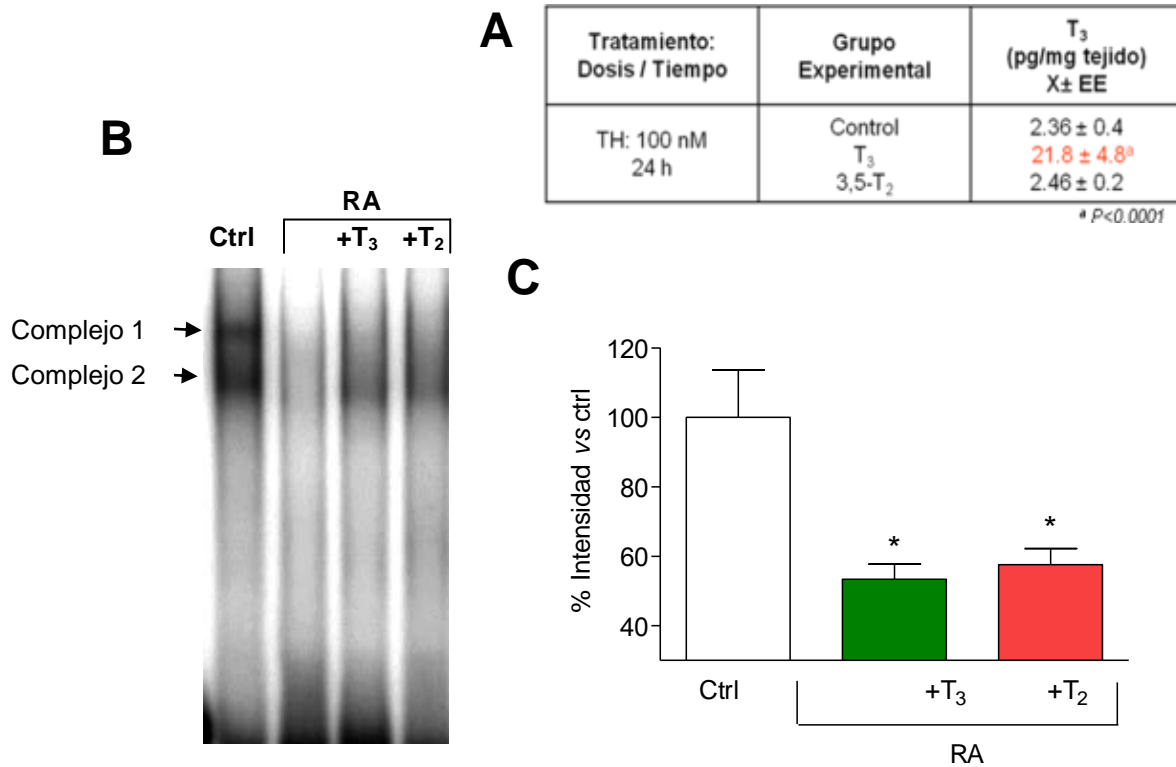


Figura 9. Efecto del hipertiroidismo+RA sobre la interacción TR-TRE DR4. *A.* Concentraciones hepáticas de T₃ de los diferentes grupos y el tratamiento (dosis/tiempo) ^a P < 0.0001 en comparación con el control. *B.* EMSA representativo de extractos nucleares de tilapias tratadas con dosis suprafisiológicas de RA + T₃ o T₂. Las flechas indican los complejos formados. *C.* Análisis densitométrico del **complejo 2** formado con los diferentes grupos experimentales. Los valores representan las medias ± DS, n=3 (*p < 0.05 con respecto al control).

2.4- Hipotiroidismo + reemplazo con TH + RA.

Las concentraciones hepáticas de T_3 se muestran en la Figura 10, panel A, en las que se observa que el grupo hipotiroideo que recibió RA alcanza concentraciones de T_3 similares a las del grupo control, por lo que probablemente el RA tiene un efecto positivo sobre la vida media de la TH circulante o sobre los reguladores del metabolismo de las TH a nivel celular, como se mencionó anteriormente.

Como puede observarse en el EMSA (Figura 10, panel B y C) el grupo que recibió MMI co-administrado con RA, favorece la formación del complejo de mayor peso, y aunque sabemos que en este grupo no se abate de manera significativa las concentraciones hepáticas de T_3 , la presencia del ligando RA en conjunto con las THs presentes, podrían inducir la asociación de heterodímeros TR-RXR al TRE (véase Figura 10, panel B y C), en contraste a lo observado con el grupo de tilapias hipotiroideas (Figura 8, B) en donde no observamos complejos definidos.

Con los extractos nucleares de tilapias tratadas con RA + MMI y reemplazadas con T_3 se induce la formación del complejo de menor peso, similar al del control. Mientras que con T_2 se favorece la formación del complejo de mayor peso y de mayor intensidad que el control ($p < 0.001$). Aunque no conocemos la composición de dichos complejos, estos resultados sugieren que bajo las condiciones experimentales, la presencia de RA induce la asociación de lo que podrían ser heterodímeros TR-RXR con T_3 y T_2 , y por las diferencias en peso, creemos que podrían estar asociándose distintas proteínas correguladoras.

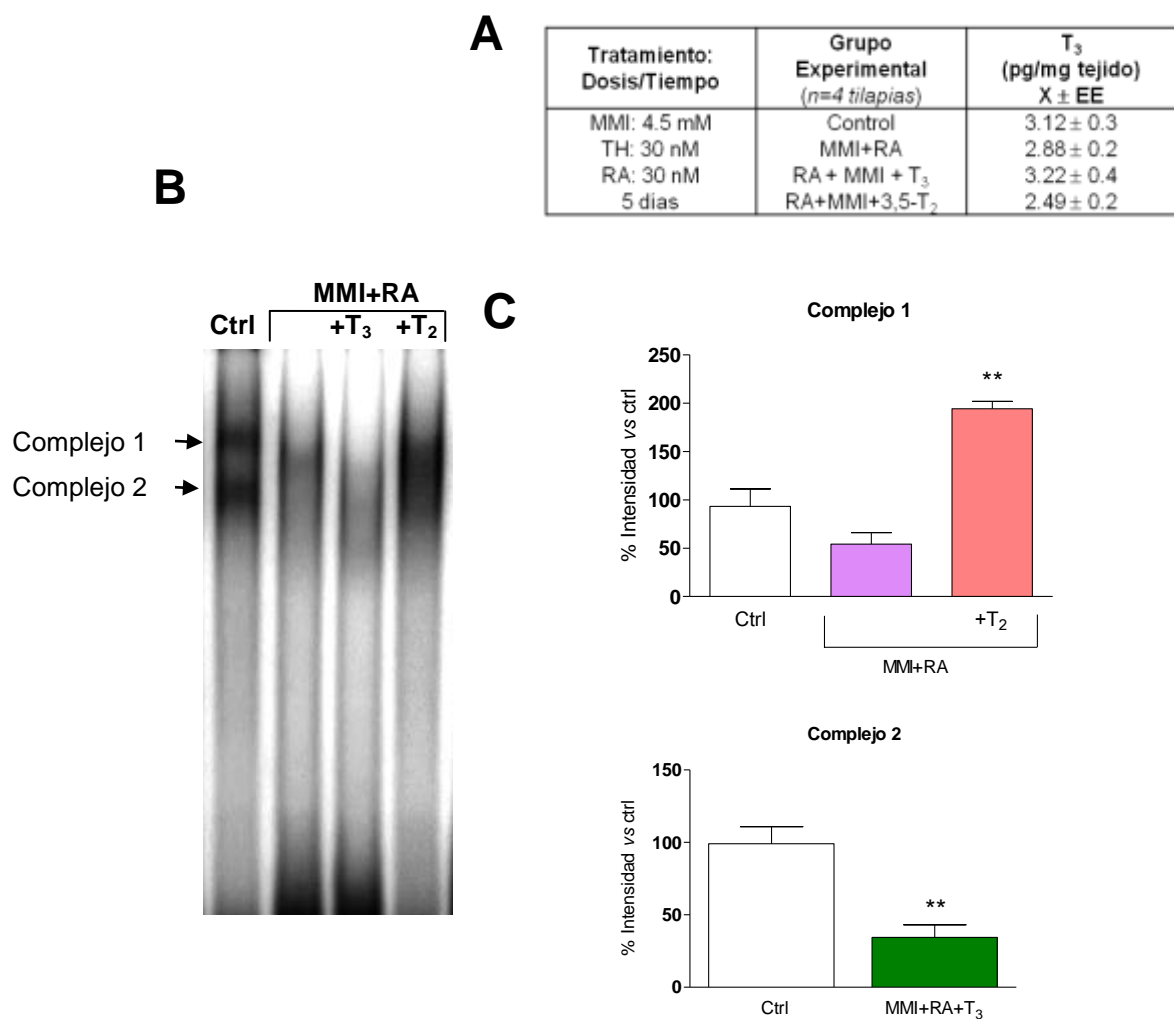


Figura 10. Efecto del hipotiroidismo + reemplazo con T₃ o T₂ + RA sobre la interacción TR-TRE DR4. A. Concentraciones hepáticas de T₃ de los diferentes grupos y el tratamiento (dosis/tiempo). B. EMSA representativo de extractos nucleares de tilapias hipotiroideas reemplazadas con T₃ o T₂ + RA. Las flechas indican los complejos formados. C. Análisis densitométrico de los complejos formados con los diferentes grupos experimentales. Los valores representan las medias ± DS, n=3 (**p<0.001 con respecto al control).

En conjunto, nuestros resultados sugieren que existe una interacción preferencial de las TH con isoformas específicas del TRβ1, siendo esta interacción T₂-TRβ1 largo y T₃-TRβ1 corto. Además, los estudios *in vivo* mostraron que el estado tiroideo influye de manera importante en la interacción de los TR con el elemento de respuesta, así como en la interacción de estos con otros receptores nucleares como el RXR y los complejos

de correguladores. La concentración del ligando es un factor importante para la interacción con su receptor y subsecuentemente la interacción con otras moléculas como el DNA.

Por último es importante mencionar que la mayoría de los efectos observados en presencia de T_2 *in vivo* son similares a los observados con T_3 . Esto apoya la noción de que la T_2 es bioactiva y que sus efectos tiromiméticos son a través de la vía nuclear.

Este trabajo es pionero en el tema de estudio y la información acerca de los mecanismos de acción de las TH en teleósteos es escasa. Así, estos resultados son estimulantes ya que nos acercan más a conocer el mecanismo de acción de la T_2 , así como su participación en la red de comunicación celular dada por mensajeros endócrinos.

CONCLUSIONES

- * Existe una preferencia de interacción de las distintas isoformas TR β 1 con la TH presente, siendo la interacción de la isoforma larga preferente para T₂.
- * El tratamiento con TH *in vivo* favorece la formación de complejos TR-TRE de distinto peso y la presencia de RA induce cambios en la intensidad y formación de distintos complejos TR-TRE, sugiriendo una interacción diferencial con las distintas isoformas de TR, así como con complejos de correguladores.

REFERENCIAS

- Babin P. 1992. Binding of thyroxine and 3,5,3'-triiodothyronine to trout plasma lipoproteins. *Am J Physiol* 262, E712-E720.
- Ball S, Sokolov J, Chin W. 1997. 3,5-Diiodothyronine (T2) has selective Thyromimetic effects in vivo and in vitro. *J Mol Endo* 19,137-147.
- Baur A, Bauer K, Jarry H, Köhrle J. 1997. 3,5-Diiodo-L-thyronine stimulates type 1 5'-deiodinase activity in rat anterior pituitary in vivo and in reaggregate cultures and GH3 cells in vitro. *Endocrinology* 138, 3242-3248.
- Castillo A, Sánchez-Martínez R, Moreno L, Martínez-Iglesias O, Palacios D, Aranda A. 2004. A permissive retinoid x receptor/thyroid hormone receptor heterodimer allows stimulation of prolactin gene transcription by thyroid hormone and 9-cis-retinoic acid. *Mol Cell Biol* 24, 502-513.
- Cheng S-Y. 2005. Isoform-dependent actions of thyroid hormone nuclear receptors: Lesson form knockin mutant mice. *Steroid* 70, 450-454.
- Cheng, S-Y, Leonard J, Davis P. 2010. Molecular aspects of Thyroid Hormone Actions. *Endocr Rev* 31, 139-170.
- Davis P, Leonard J, Davis F. 2008. Mechanisms of nongenomic actions of thyroid hormone. *Front Neuroendocri* 29, 211-218.
- Denver R, Hopkins P, McCormick S, Propper C, Riddiford L, Sower S, Wingfield J. 2009. Comparative endocrinology in the 21st century. *Integ Comp Bio* 49, 339-348.
- Dvrotá V. 1998. Downregulation of thyroid hormone receptor subtype mRNA levels by retinoic acid in cultured cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 242, 593-596.
- Evans D, Claiborne J. 2006. The physiology of fishes. CRC Press Editorials USA, pp. 237.
- Force W, Spindler R. 1994. 3,5,3'-L-Triiodothyronine(Thyroid Hormone)-induced Protein-DNA Interactions in the Thyroid Hormone Response Elements and Cell Type-specific Elements of the Rat Growth Hormone Gene Revealed by *in vivo* Dimethyl Sulfate Footprinting *J Biol Chem* 269,9682-9886.
- Fozzatti L, Lu C, Kim D-W, Cheng S-Y. 2011. Differential recruitment of nuclear coregulators directs the isoform-dependent action of mutant thyroid hormone receptors. *Mol Endo* 25, 908-921.
- García-G C, Jeziorski M, Valverde-R C, Orozco A. 2004. Effects of iodothyronines on hepatic outer-ring deiodinating pathway in killifish. *Gen Comp Endo* 135, 201-209.

García-G C, López-Bojórquez L, 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 β 1 in the killifish. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 293, 877-883.

Goglia A. 2005. Biological Effects of 3,5-Diiodothyronine (T_2). *Biochemistry (Moscow)* 70, 162-172.

Ghosh M, Das S. 2007. Increased beta(2)-adrenergic receptor activity by thyroid hormone possibly leads to differentiation and maturation of astrocytes in culture. *Cell Mol Neurobiol* 27, 1007-1021.

Horst C, Rokos H, Setz H. 1989. Rapid stimulation of hepatic oxygen consumption by 3,5-diiodo-L-thyronine. *Biochem J* 261, 945-950.

Ikeda M, Rhee M, Chin W. 1994. Thyroid hormone receptor monomer, homodimer, and heterodimer (with retinoid-X receptor) contact different nucleotide sequences in thyroid hormone response elements. *Endocrinology* 135, 1628-1638.

Kogai T, Liu Y-Y, Ritcher L, Mody K, Kogechika H, Brent G. 2010. Retinoic Acid Induces Expression of the Thyroid Hormone Transporter, Monocarboxylate Transporter 8 (Mct8). *J Biol Chem* 285, 27279-27288.

Larsen P, Kronenberg H, Melded S, Polonsky K. 2003. Williams Textbook of Endocrinology. USA: Saunders editorial. 10th edition.

Latham K, Ring J, Baxter J. 1976. Solubilized nuclear "receptors" for the thyroid hormones. Physical characteristics and binding properties, evidence for multiple forms. *J Biol Chem* 10, 7388-7397.

Lazar M, Berrodin T, Harding H. 1991. Differential DNA binding by monomeric, homodimeric, and potentially heteromeric forms of the thyroid hormone receptor. *Mol Cell Biol* 11, 5005-5015.

Lazar M. 1993. Thyroid Hormone Receptors: Multiple Forms, Multiple Possibilities. *Endo Rev* 14:184-193.

Lee J, Lee Y, Jung D, Lee S. 2004. Transcriptional coregulators of the nuclear receptor superfamily: coactivators and corepressors. Review. *Cell. Mol Life Sci.* 58, 289-297.

Levin A, Sturzenbecker L, Kazmer S, Bosakowski T, Huselton C *et al.* 1992. 9-cis Retinoic acid stereoisomer binds and activates the nuclear receptor RXRa. *Nature* 355, 359-361.

Li D, Li T, Wang F, Tian H, Samuels H. 2002. Functional evidence for retinoid X receptor (RXR) as a non-silent partner in the thyroid hormone receptor/RXR heterodimer. *Mol Cell Biol* 22,5782-5792.

Losi G, Garzon G, Puia G. 2008. Nongenomic regulation of glutamatergic neurotransmission in hippocampus by thyroid hormones. *Neuroscience* 151, 155-163.

Mangelsdorf D, Evans R. 1995. The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell* 83, 841-850.

Magnus-Levi A. 1895. Über den respiratorischen gaswechsel unter dem einfluss der thyroidea sowie unter verschiedenen pathologischen zustanden. *Berlin Klein Wochschr.* 32, 650-652.

Marchand O, Safi R, Escriva H, Van Rompaey E, Prunet P, Laudet V. 2001. Molecular cloning and characterization of thyroid hormone receptors in teleost fish. *J Mol Endo* 26, 51-65.

Mendoza-Cisneros A, Villalobos P, Valverde-R C, Orozco A (2011). 3,5-T₂ AND T₃ ACTIVATE DIFFERENT ISOFORMS OF THE THYROID HORMONE RECEPTOR β 1 IN *Fundulus heteroclitus*. *Front. Endocrin.* Conference Abstract: NASCE 2011: The inaugural meeting of the North American Society for Comparative Endocrinology. doi: 10.3389/conf.fendo.2011.04.00084.

Moreno M, Lombardi A, Lomardi P, Goglia F, Lanni A. 1998. Effect of 3,5-diiodo-L-thyronine on thyroid stimulating hormone and growth hormone serum levels in hypothyroid rats. *Life Scie* 62, 2369-2377.

Moreno M, Lombardi A, Beneduce L, Silvestri E, Pinna G, Goglia F, Lanni A. 2002. Are the Effects of T₃ on Resting Metabolic Rate in Euthyroid Rats Entirely Caused by T₃ Itself?. *Endocrinology* 143, 504–510.

Morley J, Melmed S, Reed A, Kasson B, Levin S, Pekary A, Hershman J. 1980. Effect of vitamin A on the hypothalamo–pituitary–thyroid axis. *Am J Physiol* 238, E174–E179.

Nakano K, Marsushita A, Sasaki S, Misawa H, Nishiyama K, Kashiwabara Y, Nakamura H. 2004. Thyroid-hormone-dependent negative regulation of thyrotropin B gene by thyroid hormone receptors: study with a new experimental system using CV1 cells. *Biochem J* 378, 549-557.

Orozco A, Silva E, 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, Valverde-R C. 1998. Salinity modifies hepatic outer-ring deiodinating activity in *Fundulus heteroclitus*. *Trends Comp Endo Neur Ann N.Y. Acad Sci* 839, 409-411.

Orozco A, Linser P, Valverde-R C. 2000. Kinetic characterization of outer-ring deiodinase activity (ORD) in the liver, gill and retina of the killifish *Fundulus heteroclitus*. *Comp Biochem Physiol Part B.* 136, 283-290.

Orozco A, Villalobos P, Jeziorski M, Valverde-R C. 2003. The liver of *Fundulus heteroclitus* expresses deiodinase type 1 mRNA. *Gen Comp Endocrinol* 130, 70-77.

Orozco A, Valverde-R C. 2005. Thyroid Hormone Deiodination in Fish. *Thyroid* 15, 799-813.

Pan T, Jow M, Privalsky M. 2010. DNA recognition by thyroid hormone and retinoic acid receptors: 3,4,5 rule modified. *Mol Cell Endo* 319, 88-98.

Power, D, Llewellyn L, Faustino M, Nowell M, Sweeney G y col. 2001. Thyroid hormones in growth and development if fish. *Comp Bio Phys Part C* 130, 44-459.

Suzuki S, Miyamoto T, Opsahl A, Sakurai A y DeGroot L. 1994. Two thyroid hormone response elements are present in the promoter of the human thyroid hormone receptor beta 1. *Mol Endo* 8, 305-314.

Takeda T, Nagassawa T, Miyamoto T, Miremura K, Hashizume K, Degroot L. 2000. Quantitative analysis of DNA binding affinity and dimerization properties of wild type and mutant thyroid hormone receptor beta 1. *Thyroid* 1, 11-18.

Tagami T, Yamamoto H, Moriyama K, Sawai K, Ushui T, Shimatsu A, Naruse M. 2009. The retinoid X receptor binding to the thyroid hormone receptor: relationship with cofactor binding and transcriptional activity. *J Mol Endo* 42,415-428.

Tan Y, Costa R, Koversdi I, Reichel R. 2001. Adenovirus-Mediated Increase of HNF-3 Levels Stimulates Expression of Transthyretin and Sonic Hedgehog, Which Is Associated With F9 Cell Differentiation Toward the Visceral Endoderm Lineage. *Gen Exp* 9, 237-248.

Tata J. 1963. Inhibition of the biological action of thyroid hormones by actinomycin D and uromycin. *Nature* 197, 1167-1168.

Valverde-R C, Walburga C, Lafleur Jr, Orozco A, St. Germain D. 1997. Cloning and Expression of a 5'-Iodothyronine Deiodinase from the liver of *Fundulus heteroclitus*. *Endocrinology* 138,642-648.

Visser W, Friesema E, Visser T. 2010. Minireview: Thyroid hormone transporters: The knowns and the unknowns. *Mol Endo*. 25, 1-14.

Wan Y-J, Wang L, Wu T-C. 1994. The expression of retinoid X receptor gene is regulated by *all-trans*- and *9-cis*-retinoic acid in F9 teratocarcinoma cells. *Exp Cell Res* 210, 56-61.

Wang Y, Chirgadze N, Briggs S, Khan S, Jensen E, Burris T. 2006. A second binding site for hydroxytamoxifen within the coactivator-binding groove of estrogen receptor. *Proc Nat Acad Sci* 123, 9908–9911.

Yen P. 2001. Physiological and Molecular Basis of Thyroid Hormone Action. *Physiol Rev*

81, 1097-1126.

Zhu X-G, McPhine P, Lin K-H, Cheng S-Y. 1997. The differential hormone-dependent transcriptional activation of thyroid hormone receptor isoforms is mediated by interplay of their domains. *J Biol Chem* 272, 9048-9054.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de las Hormonas Tiroideas	p.8
Figura 2. Estructura y organización funcional de los receptores nucleares	p.9
Figura 3. Estructura general de los principales TR y sus propiedades funcionales	p.10
Figura 4. Mecanismos moleculares de la acción de los TR	p.14
Figura 5. Mecanismos generales de la participación de los correguladores sobre la transcripción TH-dependiente	p.16
Figura 6. Efecto del tratamiento con TH sobre la interacción TR-TRE	p.26
Figura 7. Efecto del hipertiroidismo sobre la interacción TR-TRE DR4	p.30
Figura 8. Efecto del hipotiroidismo+TH sobre la interacción TR-TRE DR4	p.32
Figura 9. Efecto del hipertiroidismo+RA sobre la interacción TR-TRE	p.34
Figura 10. Efecto del hipotiroidismo+TH +RA sobre la interacción TR-TRE	p.36

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Proteínas correguladoras que interaccionan con el complejo TR-TRE p. 15

Tabla 2. Tratamientos con TH y RA p. 23

APÉNDICE 1

Fisiología Tiroidea en Teleósteos.

Dentro del estudio de la fisiología tiroidea los teleósteos son comúnmente empleados como modelo biológico en el laboratorio y su empleo ha permitido ampliar el conocimiento básico en este campo (García-G *et al.*, 2004, 2007; Valverde-R *et al.*, 1997, Orozco *et al.*, 1997, 1998; 2000, 2003). Son de gran importancia en estudios de endocrinología comparada enfocados en determinar cómo ha evolucionado el mecanismo de acción de las hormonas y sus vías de señalización para controlar diversos procesos del desarrollo, fisiológicos y conductuales; y cómo los sistemas hormonales subyacen la adaptación a diversos ambientes, el desarrollo de nuevas estrategias y la formación de nuevas especies (Denver *et al.*, 2009).

La glándula tiroidea de los peces está compuesta por cúmulos de folículos tiroideos distribuidos a lo largo de la faringe, a diferencia del resto de los vertebrados, en donde los folículos se encuentran agregados formando una sola estructura. Los folículos tiroideos están formados por los tirocitos, células epiteliales altamente especializadas en la captación y organificación del yodo, que se encuentran organizados en forma de estructuras esféricas en cuyo interior se almacena el coloide, rico en la glicoproteína tiroglobulina. La Tg es el sustrato proteico (proveedor de tirosinas) a partir del cual se sintetizan las TH.

La síntesis y secreción de TH se encuentra bajo el control del eje hipotálamo-hipófisis-tiroidea (H-H-T), regulado por asas de retroalimentación negativas; que implica la liberación al sistema porta del tripéptido hipotalámico TRH hacia los tirotrópicos hipofisarios para inducir la secreción de la tirotrópina o TSH, encargada de estimular la captación de yodo, síntesis y secreción de yodotironinas en la tiroidea (Larsen *et al.*, 2003). La glándula tiroidea de peces secreta principalmente T₄, por lo que la producción de TH bioactivas (T₃ y 3,5-T₂) se da a partir de la desyodación a nivel periférico en múltiples órganos como el hígado y riñón; y es considerado como el cuarto eslabón del eje H-H-T, que constituye la principal vía de regulación de los niveles circulantes e intracelulares de TH bioactiva. Los niveles de expresión de cada uno de los tipos de

desyodasa varía de acuerdo al tejido, de tal forma que la disponibilidad de TH depende de la expresión de las distintas desyodasas (Orozco y Valverde-R, 2005). La activación o inhibición del eje H-H-T está dado principalmente por los niveles de TH en circulación, mediante un asa de retroalimentación negativa: cuando aumentan las TH se inhibe la secreción de TSH y de manera contraria cuando disminuyen. Asimismo, la somatostatina inhibe el eje a nivel hipofisiario y el yodo bloquea los estímulos de la TSH a nivel de la tiroides.

Una vez que las TH son secretadas a circulación, debido a su naturaleza hidrofóbica, requieren ser transportadas hacia su órgano blanco en asociación a las proteínas plasmáticas albumina, pre-albumina y transtiretina, presentes en todos los vertebrados; así como a la globulina transportadora de tiroxina, cuya presencia se ha determinado únicamente en mamíferos, la cual une la mayor parte de TH. Todas ellas despliegan una afinidad diferencial por cada TH; en teleósteos, la albumina transporta la mayor proporción de T_4 (60%) con alta afinidad, mientras que la prealbumina y TTR transportan una menor proporción de T_4 (15-20%); aunque las lipoproteínas también juegan un papel importante en el transporte de TH (Babin, 1992). La asociación TH-proteína plasmática prolonga la vida media en circulación de la hormona y constituye una fuente de almacenamiento.

Para ejercer sus efectos las TH requieren entrar a la célula y unirse a los TR, hasta la fecha, se han identificado transportadores de solutos capaces de acarrear TH con distinta especificidad de sustrato, como: el transportador de monocarboxilatos y el transportador de aniones orgánicos 1C1 que poseen una alta especificidad por T_3 y T_4 , respectivamente, no obstante MCT8 también transporta T_2 y T_4 . Su expresión es órgano específica y varía entre especies (*revisado por Visser et al., 2010*).

En cuanto a los efectos biológicos de las TH, se sabe que participan en diferentes procesos durante la historia de vida de los peces; por ejemplo, en coordinación con la GH/IGF-1 regulan el crecimiento somático. Además, se sabe que las TH regulan la metamorfosis de larva a juvenil induciendo cambios morfológicos y fisiológicos sobre el sistema cardiovascular, musculo-esquelético y digestivo; que preparan a especies migratorias para la vida marina, proceso conocido como esmoltificación, en el que

actúan en conjunto con otros factores endocrinos como GH, IGF-1, cortisol , prolactina y señales medioambientales. De igual modo, las TH influyen sobre la maduración sexual y la osmoregulación, los cuales son mediados por acciones directas o sinérgicas con otras hormonas, así como por factores ambientales como temperatura, fotoperiodo y salinidad (Evans y Claiborne, 2006, Power *et al.*, 2001).

APÉNDICE 2

PROTOCOLOS

- A. Transfección transitoria mediante precipitación con fosfato de calcio.
1. Un día previo a la transfección cultivar a las células en una proporción 1:15 en una placa confluyente (100 mm).
 2. En un tubo eppendorff 1.5 mL colocar 10 µg de DNA plasmídico + 37 µl CaCl₂ 2 M + agua estéril hasta 300 µL. Mezclar con ayuda del vortex y centrifugar brevemente (tubo 1).
 3. En un tubo eppendorff 1.5 mL colocar 300 µL de buffer HBS 2X (tubo 2).
 4. Mezclar el contenido del tubo 1 en el tubo 2 y mantener en agitación, centrifugar brevemente.
 5. Incubar por 30 min a temperatura ambiente, al término de la incubación se deberá observar una solución ligeramente opaca debido a la formación de precipitado de cristales de calcio-DNA.
 6. Distribuir el precipitado en una placa de células (100 mm), agitar para mezclar el precipitado y el medio de cultivo.
 7. Incubar de 4-16 h bajo condiciones de cultivo estándar. Remover el medio. Lavar las células con PBS 1X (2 veces) y colocar 10 mL de medio de cultivo.

Buffer HBS 2X

50 mM HEPES pH 7.1

280 mM NaCl

1.5 mM Na₂HPO₄

ajustar a pH 7.1 y esterilizar con membrana de 0.22 µm y almacenar en alícuotas a -20°C.

B. Extracción de proteínas nucleares (Kit ProteoJet, Fermentas)

Para la extracción a partir de tejido colocar: 1) gotas de buffer de sacarosa sobre el tejido y pesar, 2) agregar 1:5 w/v de buffer de sacarosa y homogenizar el tejido con ayuda de un pistilo; 3) filtrar el homogenado y 4) centrifugar a 250 g x 5' a 4°C y remover el sobrenadante.

Para la extracción a partir de cultivo celular: 1) raspar las células con PBS frío y colocarlas en un tubo ependorff 1.5 mL; centrifugar por 5' a 250 g a 4°C y desechar el sobrenadante. Para ambas extracciones se procedió de la siguiente manera: 2) resuspender el pellet en 1:10 w/v de buffer de lisis celular, agitar (vortex) por 10' y dejar reposar por 2' a 4°C 4) centrifugar por 5' a 250 g, a 4°C para la obtención de núcleos y desechar el sobrenadante; 5) centrifugar por 10' a 11300 rpm a 4°C para eliminar desechos celulares y remover el sobrenadante. La integridad de los núcleos se determina mediante tinción con azul tripano; 6) resuspender el pellet en 20-200 µL de buffer hipotónico e incubar en una plataforma angular con agitación suave por 30' a 4°C; 7) centrifugar por 45' a 14000 rpm a 4°C y recuperar el sobrenadante que contiene la proteína nuclear. La concentración de proteínas se determina por el ensayo de Bradford. Las alícuotas de las proteínas obtenidas se almacenan a -70°C hasta su empleo.