



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

**EXPRESIÓN Y REGULACIÓN DIFERENCIAL POR T2 Y T3 DE GENES ASOCIADOS A LA
FUNCIÓN TIROIDEA EN EL CEREBELO DE TILAPIA**

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:
BIÓL. GUADALUPE YASMIN HERNÁNDEZ LINARES

DIRECTORA DE TESIS
DRA. AUREA OROZCO RIVAS
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

JURIQUILLA, QUERÉTARO, FEBRERO DEL 2021



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.

La presente tesis se realizó en el Laboratorio de Receptores Nucleares y Neurobiología (D03) del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la tutela de la Dra. Aurea Orozco Rivas y financiado con el apoyo del proyecto PAPIIT: 204920. Además se agradece la asistencia técnica de la M en C Patricia Villalobos Aguilera.

Agradecimientos institucionales:

A la Universidad Nacional Autónoma de México y al Instituto de Neurobiología, esta tesis se realizó en el laboratorio de Receptores Nucleares y Neurobiología, bajo la supervisión de la Dra. Aurea Orozco Rivas.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico (No. de beca 288935).

A los miembros del jurado para mi examen profesional: el Dr. Jean-Louis Joseph Marie Charli Casalonga, a la Dra. Rocío Brenda Anguiano Serrano, al Dr. Abraham Jotssel Cisneros Mejorado, a la Dra. Gabriela Morali de la Brena y la Dra. Aurea Orozco Rivas. Por sus aportaciones a la mejora del presente trabajo.

A la M. en C. Patricia Villalobos Aguilera y al Dr. Carlos Lozano Flores por su gran apoyo técnico en el laboratorio.

A la Dra. Nuri Aranda López, la M. en C. Leonor Casanova Rico y Ma. del Carmen Mendoza López por su instrucción y apoyo en la realización de trámites por parte de la Unidad de Enseñanza del Instituto de Neurobiología y el programa del Posgrado en Ciencias Biomédicas.

A la Ing. Elsa Nydia Hernández-Rios por su disposición y apoyo técnico para el uso del equipo de la Unidad de Microscopia, a Maarten Cornelis Antheny por apoyo en la unidad de Histología.

A la M. en C. Adriana González Gallardo por su apoyo en el uso de equipos en la unidad de Proteogenómica

A la Dra. Alejandra Castilla y el MVZ. Martín García por su apoyo técnico y servicio de para el cuidado de los animales del bioterio.

Al Ing. Ramón Martínez Olvera por su apoyo en los sistemas de cómputo y a la Lic. Ma. Lourdes Lara Ayala por su disposición y apoyo para las video conferencias y enlaces durante las clases y los tutorales.

Dedicatoria

A mi familia: mi padre Pedro Hernández Valdivia, mi madre Ma. Guadalupe Linares Navarrete, a mis hermanos Elizabeth, Cesar, Pedro, a mi sobrino Nael y a Lady. Gracias por todo su cariño y su apoyo incondicional durante este largo viaje.

A mis amigas Valentina y Paula, por hacer de los momentos difíciles una historia más para contar, mientras disfrutamos del camino.

A mis compañeros y amigos que con su infinito cariño, hicieron que esta tesis se concretara Aurora, Iván, Paty y Mario.

A la doctora Aurea Orozco, por no perder la esperanza en los casos difíciles, por toda la paciencia y las enseñanzas que me ha brindado durante estos años. Agradezco la oportunidad de que me haya permitido integrarme a su equipo de trabajo.

A los compañeros que conocí en el laboratorio D-03: Arturo, Pame, Gaby, Miguel, por todo su apoyo al llegar a este laboratorio.

¡A todos ustedes, muchas gracias!



ÍNDICE

I. Lista de abreviaturas.....	1
II. Resumen.....	3
III. Abstract.....	4
1. Introducción.....	5
2. Antecedentes.....	7
2.1 Hormonas Tiroideas.....	7
2.1.1 Síntesis y secreción.....	8
2.1.2 Transporte transmembranal.....	9
2.1.3 Transporte sistémico.....	9
2.1.4 Transporte en el sistema nervioso central	10
Familia OATPC.....	10
Familia MCT.....	11
Familia LAT.....	12
2.1.5 Alteración de los THTTs y su efecto en CNS.....	15
2.1.6 Activación e Inactivación de las THs a nivel celular.....	16
2.1.7 Mecanismo de Acción Genómico.....	18
3,5-T2 como ligando bioactivo.....	19
Las hormonas Tiroideas y el desarrollo del CNS.....	20
2.2 El cerebelo en peces.....	21
2.2.1 Morfología cerebelar	21
2.2.2 Tipos neuronales	23
2.2.3 Circuitos cerebelares en teléosteos.....	24
2.2.4 Neurogénesis en adultos	25
3. Planteamiento del problema.....	28
4. Hipótesis y objetivos	29
5. Materiales y Métodos.....	30
5.1 Material biológico.....	30
5.2 Cultivos Organotípicos de Cerebelo.....	30
5.3 Extracción de RNA.....	31
5.4 RT-qPCR.....	31
5.5 Tinción de Nissl.....	32

5.6	Hibridación <i>in-situ</i> Fluorescente.....	33
5.6.1	Síntesis de la sonda.....	33
5.6.2	Hibridación.....	34
5.7	Imágenes de fluorescencia.....	34
5.8	Imágenes en confocal.....	34
5.9	Análisis mediante fluorescencia total.....	34
5.10	Análisis estadísticos.....	35
6. Resultados		36
6.1	Histología del cerebro de tilapia, de la región cerebelar.....	36
6.2	Patrón de expresión cerebelar de los genes involucrados en la función tiroidea en respuesta a distintas concentraciones de T2 y T3.....	37
6.3	Localización de la expresión cerebelar de los genes involucrados en la función tiroidea.....	39
6.4	Evaluación de los efectos de las hormonas T2 y/o T3 sobre la expresión de genes asociados a la función tiroidea en el cerebelo.....	42
7. Discusión		45
8. Conclusiones		50
9. Referencias bibliográficas		51
10. Índice de tablas y figuras		60
11. Artículo publicado		61

I. Lista de abreviaturas

THs	Hormonas tiroideas
CNS	Sistema nervioso central
T2	3,5-diyodotironina
T3	3,3',5-triyodotirnonina
rT3	Triyodotironina reversa (inactiva) 3, 3', 5'-triyodotironina
TRs	Receptor de hormonas tiroideas
HHT	Eje hipotálamo – hipófisis - tiroides
Ds	Desyodasas de yodotironinas
TRH	Hormona liberadora de tirotropina
TSH	Hormona estimulante de la tiroides
TG	Tiroglobulina
NIS	Cotransportador Na ⁺ /I ⁻
TPO	Peroxidasa tiroidea
THTT	Transportadores transmembranales de THs
THDPs	Proteínas de distribución específica unidas a THs
TTR	Transtirenina
TBG	Globulina que se une a la tiroxina
BBB	Barrera hematoencefálica
B-CSF-B	Barrera sangre-líquido cefalorraquídeo
MCT	Transportadores de monocarboxilato
OATP	Polipéptido transportador de aniones orgánicos
LAT	Transportadores de aminoácidos tipo -L
OPCs	Células precursoras de oligodendrocitos
ML	Lámina molecular
PCL	Lámina de las células de Purkinje
GCL	Lámina de las células granulares
EGL	Lámina externa granular
DCNs	Núcleos cerebelosos profundos
ECs	Células euidendroides
GCs	Células granulares
Go	Células de Golgi

Ba	Células de canasta
Lu	Células Lugano
UBC	Células unipolares
GABA	Ácido gama-aminobutirico
IO	Oliva inferior
ELL	Línea lateral electrosensorial
Va	Válvula cerebelar
CCe	Cuerpo cerebelar
LCa	Lóbulo caudalis
EG	Eminencia granular
DCN	Núcleo cerebelar profundo
LTD	Inhibición a largo plazo
URL	Labio rómbico superior
VZ	Zona ventricular cerebelar

Nomenclatura en Teléosteos

Gen	Transcrito	Proteína	
<i>thraa</i>	t-thraa, l-thraa, s-thraa	Thraa	Receptor de la TH alfa tipo a
<i>thrab</i>	thrab	Thrab	Receptor de la TH alfa tipo ab
<i>thrb</i>	l-thrb, s-thrb, sl-thrb*	Thrb-1	Receptor de la TH beta 1
<i>dio1</i>	dio1	Dio1	Desiodasa tipo 1
<i>dio2</i>	dio2	Dio2	Desiodasa tipo 2
<i>dio3</i>	dio3	Dio3	Desiodasa tipo 3
<i>mct8</i>	mct8	Mct8	Transportador de monocarboxilatos tipo 8
<i>oatp1c1</i>	oatp1c1	Oatp1c1	Transportador de aniones organicos 1 tipo c1

Nomenclatura de proteínas en Humano

THR α	Receptor de la TH alfa tipo a
THR α b	Receptor de la TH alfa tipo ab
THR β 1	Receptor de la TH beta 1
DIO1	Desiodasa tipo 1
DIO2	Desiodasa tipo 2
DIO3	Desiodasa tipo 3
MCT8	Transportador de monocarboxilatos tipo 8
OATP1C1	Transportador de aniones organicos 1 tipo c1

II. Resumen

Las hormonas tiroideas (THs) son esenciales para el crecimiento y desarrollo del sistema nervioso central (CNS) en vertebrados. Diversos estudios muestran que los genes asociados a la función tiroidea son autoregulados a la alta o a la baja por T3 en diversos tejidos. En nuestro grupo de investigación previamente se describió que tanto T3 como 3,5-diiodotironina (T2) son hormonas bioactivas y que esta última es capaz de regular *in vivo* la expresión de genes asociados a la función tiroidea en hígado y diversas regiones del CNS (tálamo y cerebelo) utilizando tilapias (*Oreochromis niloticus*) machos, juveniles.

En teléosteos, el cerebelo contiene nichos o dominios progenitores de células neurales y gliales que permanecen funcionales a lo largo de la vida del organismo. Actualmente no hay estudios que demuestren el efecto de T2 en esta importante estructura del CNS. En la presente tesis se ahonda en la función bioactiva de T2 y T3 en el cerebelo de tilapia analizando *in situ* la expresión de genes involucrados en la señalización de THs a nivel de 1) transportadores de THs (mct8, oatp1c1), 2) desyodasas (dio2, dio3) y 3) receptores nucleares (thraa, l-thrb1) utilizando cultivos organotípicos de cerebelo y las técnicas de FISH y RT-qPCR. Encontramos que con la excepción de thraa, cuya expresión se localiza en la lámina de las células de Purkinje, todos los transcritos se expresan principalmente en la crista cerebelar. Otros sitios de expresión fueron la lámina molecular, la gris central y la lámina molecular del cuerpo cerebelar. Además, se analizaron los efectos de T2 y T3 en la regulación de la expresión del mRNA en los 6 genes de interés. Encontramos que el tratamiento con T2 reguló a la baja la expresión de todos los genes analizados, menos el de dio3, siendo mct8 el más responsivo a esta hormona. El tratamiento con T3 reguló a la baja la expresión de mct8, thraa y dio2, pero no ejerció efectos sobre la expresión de oatp1c1, l-thrb1 y dio3.

En conjunto, los resultados demuestran que en el cerebelo de la tilapia juvenil ambas hormonas, T2 y T3 son capaces de modular la expresión de genes TH-dependientes que son clave para la función tiroidea, sugiriendo un rol fisiológico dentro del CNS.

II. Abstract

Thyroid hormones (THs) are essential for the growth and development of the central nervous system (CNS) in vertebrates. Several studies show that the genes associated with thyroid function are self-regulated up or down by T3 in various tissues. Our research group it was previously described that both T3 and 3,5-diiodothyronine (T2) are bioactive hormones and that the latter is capable of regulating the expression of genes associated with thyroid function in the liver and some regions of the CNS (thalamus and cerebellum) using juvenile male tilapia (*Oreochromis niloticus*).

In teleost, the cerebellum contains niches or neural progenitor domains of neural and glial cells that remained functional throughout the life of the organism. Currently there are not studies that demonstrate the effect of T2 on this important structure of the CNS. This thesis delves into the bioactive function of T2 and T3 in the tilapia cerebellum, analyzing in situ the expression of genes involved in THs signaling at the level of 1) THs transporters (*mct8*, *oatp1c1*), 2) deiodinases (*dio2*, *dio3*) and 3) nuclear receptors (*thraa*, *l-thrb*) using the organotypic cultures of cerebellum, FISH and RT-qPCR techniques. We found that with the exception of *thraa*, whose expression is localized in the lamina of Purkinje cells, all transcripts are expressed mainly in the crista cerebellar. Other sites of expression were the molecular lamina, the central gray, and the molecular lamina of the cerebellar body. Furthermore, the effects of T2 and T3 on the regulation of mRNA expression in the 6 genes of interest were analyzed. We found that treatment with T2 down-regulated the expression of all genes analyzed, except for *dio3*, with *mct8* being the most responsive to this hormone. Treatment with T3 down-regulated the expression of *mct8*, *thraa* and *dio2*, but had no effect on the expression of *oatp1c1*, *l-thrb* and *dio3*.

Taken together, the results show that in the cerebellum of juvenile tilapia, both hormones, T2 and T3, are capable of modulating the expression of TH-dependent genes that are key to thyroid function, suggesting a physiological role into the CNS.

1. Introducción

Las hormonas tiroideas (THs) son esenciales para el desarrollo del sistema nervioso central (CNS) en etapas tempranas de la ontogenia de todos los vertebrados (Bernal et al., 2015; Darras et al., 2015; Préau et al., 2015), así como para la función del organismo en etapas juveniles y adultas.

Se reconoce que los mecanismos de acción de las THs son principalmente genómicos. Para que estos mecanismos ocurran, se requiere de un camino relativamente complejo que inicia con la síntesis y secreción de las THs en la glándula tiroides y su posterior secreción y transporte sistémico a los órganos blanco. Una vez ahí, deben ocurrir al menos tres eventos funcionales de gran importancia: 1) la facilitación del movimiento transmembranal de THs, mediado por transportadores específicos; 2) la activación e inactivación específica de la prohormona tiroxina (T4) para producir a la 3,5,3'-triyodotironina (T3), TH bioactiva o la 3,3',5'-triyodotironina (rT3), una TH inactiva, y 3) la unión de la T3 a los receptores nucleares de hormonas tiroideas (Refetoff & Dumitrescu, 2007). De esta forma, las THs desencadenan una serie de eventos moleculares que conllevan a la regulación de genes involucrados, entre otros procesos, al correcto desarrollo y funcionamiento del CNS.

Dentro del CNS, el cerebelo es una estructura de reciente adquisición evolutiva que inició en los vertebrados y que fue diversificando su estructura morfológica y funcional. En teléosteos es una estructura monofoliada, pero en otros vertebrados puede ser una estructura aplanada o multifoliada. No obstante, la citoarquitectura del cerebelo está altamente conservada en todas las especies (Hibi et al., 2017). Se sabe que tal estructura está asociada al desarrollo de funciones complejas a nivel motor, sensorial, cognitivo y propioceptivo (Ito et al., 2007; Rodríguez et al., 2005; Zada et al., 2014). En este contexto, las THs son fundamentales principalmente durante el desarrollo embrionario de esta estructura, participando en procesos como la neurogénesis, diferenciación laminar, arborización neuronal y mielinización (Zada, et al., 2014; Kapoor et al. 2015). De manera interesante, el papel que juegan las THs en estos procesos biológicos están muy conservados en todos los vertebrados; sin embargo, cada especie tiene sus propias

características fisiológicas que dependen de las ventanas de sensibilidad a las THs durante su ontogenia (Darras et al., 2015). Dado que las THs son reguladores neuroendocrinos, el desbalance en su concentración, o en cualquiera de los elementos que conforman su mecanismo de acción, pueden participar en el desarrollo de neuropatías como la esclerosis múltiple, síndromes como el Allan Herndon-Dudley, el desorden del espectro autista, entre otros, que limitan la correcta función cognitiva y/o la coordinación motora (Zada et al., 2017).

Estudios recientes en nuestro y otros grupos de trabajo han descrito que en teléosteos y mamíferos, la 3,5-T2 (T2) es una forma bioactiva que al igual que la T3 (reconocida como bioactiva), es capaz de inducir la expresión de genes tiroideo-dependientes (Olvera et al., 2017; Lietzow et al., 2016). Los efectos de la T2 están mediados por una isoforma larga del receptor de THs (TRs), el Thrb, al menos en teleósteos (Mendoza et al., 2013). Además, recientemente se ha reportado que T3 y T2, son capaces de reclutar diferentes combinaciones de co-reguladores TR-específicos al complejo transcripcional, lo que sugiere que la T2 funciona como un ligando alternativo de TRs (Hernández-Puga et al., 2017) y que ambas THs pudieran participar en vías de señalización distintas en el CNS (Olvera et al., 2017).

En este contexto, el presente trabajo pretende dar un panorama morfofuncional de la expresión de genes involucrados en la función tiroidea y dilucidar si son genes TH-dependientes a nivel del CNS específicamente en el cerebelo.

2.- Antecedentes

2.1 Hormonas Tiroideas

Las THs o yodotironinas son mensajeros químicos del sistema endocrino derivados de residuos de tirosina que presentan una estructura bifenólica, donde el anillo interno conserva los grupos amino y carboxilo (cadena β -alanina) y el anillo externo se une al interno mediante un enlace tipo éter (Mondal et al., 2016). Los átomos de yodo pueden situarse en el carbono 3, 5 del anillo interno y 3', 5' del anillo externo del núcleo de la tironina y la localización específica de los átomos de yodo genera la estructura molecular de las diferentes THs **Tabla 1**.

Tabla 1. Estructura general de yodoaminoácidos y principales miembros de la familia de las yodotironinas.

Núcleo de la tironina:						
Nombre común	Símbolo	Sitio				Nombre sistemático
		R ₃	R _{3'}	R ₅	R _{5'}	
Tiroxina	T4	I	I	I	I	3,3',5,5' – Tetra-yodo-L-tironina
Triyodotironina	T3	I	I	I	H	3,3',5 – Tri-yodo-L-tironina
Triyodotironina reversa	rT3	I	I	H	I	3,3',5' – Tri-yodo-L-tironina
3,5 – Tironina	3,5 - T2	I	H	I	H	3,5 – Di-yodo-L-tironina
3,3 – Tironina	3,3' - T2	I	I	H	H	3,3' – Di-yodo-L-tironina
3',5' – Tironina	3',5' - T2	H	I	H	I	3',5' – Di-yodo-L-tironina

Conformada por dos anillos, el anillo interno (IR) en amarillo y el anillo externo' (OR) en azul, R es el elemento sustituyente localizado en la posición 3 y 5 del anillo interno y externo', donde el elemento yodo (I) puede ser sustituido por un hidrógeno (H).

2.1.1 Síntesis y Secreción

La síntesis, almacenamiento y secreción de las THs son reguladas por el eje hipotálamo-hipófisis-tiroides (HHT). El hipotálamo es una estructura que forma parte del CNS localizada en el diencefalo, siendo una estructura de integración que entre otras funciones, estimula la activación del eje HHT, mediante el sistema porta-hipofisiario utilizando a la hormona liberadora de tiotropina (TRH) a la adenohipófisis, estimulando a las células tirotropas para la secreción de tiotropina u hormona estimulante de la tiroides (TSH), al torrente sanguíneo. La TSH al llegar a la glándula tiroides, activa la síntesis y secreción de dos THs, la 3,5,3',5'-tetrayodotironina, también llamada tiroxina T4 que funciona como prohormona de la hormona bioactiva 3,5,3'-triyodotironina o T3. El resto de las yodotironinas tanto circulantes como intracelulares no se producen en la glándula tiroides, sino que se forman en el órgano blanco por la acción de un grupo de selenoenzimas llamadas desyodasas de yodotironinas (Ds) (Mondal et al., 2016; Fröhlich & Wahl, 2018) (ver I.III "Activación e Inactivación de las THs a nivel celular").

La biosíntesis de la tiroxina comprende una serie de eventos que ocurren en los folículos tiroideos, los cuales son considerados la unidad funcional de la glándula tiroides. Estos folículos están formados por una monocapa de células foliculares llamadas tirocitos, los cuales están organizados en una estructura tridimensional que forma un ovoide y el interior de éste, contiene una sustancia llamada coloide donde se encuentra la tiroglobulina (TG) (Carvalho & Dupuy, 2017). El exterior del folículo está delimitado por la membrana plasmática basolateral de los tirocitos y está en contacto con una gran red de capilares sanguíneos. En esa región, el yodo (I-) es capturado activamente por el cotransportador simporte sodio/yodo (NIS) que se localiza en la membrana basal del tirocito. Este yodo se transporta hacia la membrana apical y es transportado mediante un transportador de Cl- llamado pendrina al coloide, en donde ocurre la oxidación del yodo y la yodación de los residuos tirosilo de la TG por medio de la peroxidasa tiroidea (TPO).

La TG yodada es almacenada en el coloide y posteriormente internalizada al tirocito por endocitosis, formando vacuolas de digestión en donde la TG se hidroliza por la acción de proteasas para liberar a la T4 y a la T3 que se excretan al sistema circulatorio, mientras que

los residuos yodados se reciclan en el tirocito (Mondal et al., 2016). Todo el proceso de la biosíntesis y secreción de las THs, esta regulado por la TSH. En conjunto todos los componentes del eje HHT se regulan a través de la retroalimentación negativa por las THs circulantes (Vergauwen et al., 2018).

2.1.2 Transporte transmembranal

En los años previos a 1978, se creía que las THs pasaban a través de la membrana celular por un proceso de difusión pasiva debido a la naturaleza lipofílica de estas hormonas (Bernal 2015). Actualmente se reconoce que las THs requieren de proteínas transmembranales transportadoras (THTT) que mediante un proceso activo (saturable, dependiente de energía, y estéreo-específico) se facilita la entrada de estas hormonas, ya sea al torrente sanguíneo o del torrente sanguíneo/líquido-cefaloraquídeo o a sus células blanco (Solís et al., 2011; Schweizer & Bayer, 2014).

2.1.3 Transporte sistémico

Una vez en circulación, las THs son transportadas a su órgano blanco por las proteínas de distribución específica unidas a THs (THDPs): albúmina, transtiretina (TTR) y la globulina que se une a la tiroxina (TBG), ésta última es capaz de unir al 99.97% de T4 y 99.70% de T3 en sangre (McLean et al. 2017). Cada una de estas THDPs presenta características intrínsecas particulares, son sintetizadas en diferentes sitios y tienen una diferente afinidad por las THs como se muestra en la siguiente **Tabla 2**.

Tabla 2. Características generales de las proteínas de distribución específica unidas a THs (THDPs).

THDPs	Afinidad M ⁻¹		TH unida %	Tamaño kDa	Vida ½ días	Sitio de Síntesis	
	T4	T3					
Albúmina	↓	7x10 ⁻⁵	1x10 ⁻⁵	10%	68	15	Hígado
TTR	‡	7x10 ⁷	1x10 ⁷	15%	60	2	Hígado, Plexo coroideo placenta, saco vical, intestino, páncreas epitelio pigmentado retinal y ciliar, meninges y neuronas.
TBG	↑	1x10 ¹⁰	5x10 ⁸	75%	54	5	Hígado

Afinidad baja (↓), media (‡) o alta (↑). El porcentaje de TH unida en sangre ha sido mostrado en algunos vertebrados incluyendo peces, anfibios, reptiles, aves y mamíferos (McLean et al., 2017).

Las THs son acarreadas y distribuidas por las THDPs para llegar a sus órganos blanco, incluido el cerebro, en cuyo caso las THs entran vía directa por la barrera hematoencefálica (BBB por sus siglas en inglés Blood Brain Barrier) o vía indirecta a través de la barrera sangre-líquido cefalorraquídeo (B-CSF-B, por sus siglas en inglés blood-CSF-barrier). La única THDPs encontrada en el cerebro es la TTR (**Tabla 2**).

2.1.4 Transporte en sistema nervioso central

Una vez que las THs se encuentran en el cerebro, su ingreso a las diferentes células del CNS es facilitada a través de transportadores transmembranales de THs (THTT). Existen diversas proteínas con la capacidad de transportar THs, entre los que se encuentran a la familia de los transportadores de monocarboxilato (MCT, por sus siglas en inglés de monocarboxylate transporter), la familia del polipéptido transportador de aniones orgánicos (OATP, por sus siglas en inglés de organic anion-transporting polypeptide), la familia de los transportadores de aminoácidos tipo L (LAT por sus siglas en inglés de L-type amino acid transporter) y la familia del polipéptido co-transportador de Na⁺ (NTCP, por sus siglas en inglés de Na⁺/taurocholate cotransporting polypeptide). La expresión y la selectividad transportadora de los miembros de una y otra familia difieren significativamente, siendo además tejido-específica (Friesema et al., 2005) lo que nos centra a estudiar solo la familia MCT, OATP y LAT debido a que son los únicos que se expresan en el CNS de diferentes especies.

Familia OATPC

La gran familia de transportadores OATP comprende más de 80 miembros en al menos 13 especies diferentes (Hagenbuch 2007). Son proteínas de entre 652 - 848 aminoácidos, y están constituidos por 12 dominios transmembranales. Basándose en la identidad de su secuencia de aminoácidos, éstos pueden ser clasificados en familias (1-6) y subfamilias (A-D). Son varios los miembros de esta familia que además de sus sustratos pueden transportar THs (OATP1A2, OATP1B1, OATP1B3, OATP1C1, OATP3A1, OATP4A1, OATP5A1); sin embargo, sólo la familia 1C presenta una alta afinidad por transportar a estas hormonas (**Tabla 3**).

OATP1C1 es una proteína de 712 aminoácidos, codificada en el gen SLCO1C1 que presenta 12 dominios transmembranales y fue inicialmente detectada en las células de Leydig en el testículo. Posteriormente este transportador se encontró localizado en las células endoteliales de la BBB y el plexo coroideo en mamíferos. Comparado con otros integrantes de la familia OATP, es el único con alta afinidad a TH (**Tabla 3**) (Hagenbuch 2007).

Familia MCT

La familia de proteínas transportadoras MCT incluye al menos 14 miembros, de los cuales a la mayoría se les denomina transportadores “huérfanos”, al no conocerse información acerca de sus ligandos específicos (Visser et al., 2011). Los transportadores MCT 1–14, participan en el flujo de sustratos energéticos (lactato, piruvato, cuerpos cetónicos) en diferentes tejidos. Exceptuando a MCT8 y MCT10, la función de las proteínas restantes aún no se conoce con certeza. Inicialmente MCT10 se identificó como un transportador de aminoácidos, facilitando el ingreso y egreso celular de aminoácidos aromáticos como triptófano, fenilalanina, tirosina y 3,4-dihidroxifenilalanina o DOPA, la selectividad que presenta a THs es mayor para T3 que para T4. La distribución de MCT10 es amplia e incluye principalmente el intestino, riñón, hígado, músculo esquelético, corazón y placenta.

MCT8 es una proteína codificada por el gen SLC16A2 conformada por 613 aminoácidos que presenta 12 dominios transmembranales, transporta bidireccionalmente yodotironinas a través de la membrana plasmática. MCT8, ha sido denominado un transportador específico de THs ya que presenta una selectividad $T3 > T4 > rT3 \sim T2$ en un intervalo de concentración micromolar (Visser et al., 2008). Al medir el porcentaje de inhibición por competencia de MCT8 utilizando [¹²⁵I] T3, se mostró una preferencia por THs distinta: $T3 > 3,3'-T2 > rT3 > T4 > 3,5-T2$ (Kinne et al, 2010). Los autores concluyeron que MCT8 requiere de un átomo de yodo en la tercera posición de ambos anillos aromáticos para activar el transporte y mostraron que con la mutación en Arg 445 (hélice 8) o Asp 498 (hélice 10) por Ala, elimina la actividad transportadora de T3. El MCT8 no transporta lactato y otros sustratos energéticos, y a diferencia de MCT10, tampoco transporta aminoácidos.

La expresión tisular de MCT8 es más amplia, incluyendo diversas regiones del CNS como la corteza, el hipocampo, el hipotálamo, el estriado, la hipófisis, así como en riñón, corazón, suprarrenal y tiroides (Solís et al. 2011; Visser et al., 2011). El mRNA de MCT8 se expresa predominantemente en el plexo coroideo de los ventrículos y en las regiones neocorticales y allocorticales.

Familia LAT

En la familia de transportadores de aminoácidos, hay dos sistemas, el sistema T que transporta preferencialmente triptófano y el sistema L que transporta preferencialmente leucina. Dos diferentes sistemas de transporte tipo L fueron identificados en astrocitos (L1 y L2), pero solo el sistema L1 mostró alta afinidad a T3. LAT1 fue inicialmente implicado en la entrada de THs dentro de astrocitos de rata. En estudios usando diferentes líneas celulares de mamíferos, LAT1 mostró afinidad a $T4 > rT3 > T3$ (Taylor & Ritchie, 2007). Este transportador se expresa en placenta, capilares, tejido adiposo y cerebro. Si bien se ha mostrado que diversas mutaciones en MCT8 pueden generar alteraciones graves en humanos, como el síndrome Allan-Herndon-Dudley (AHDH) (Schwartz & Stevenson, 2007), en investigaciones que emplean modelos murinos no se han encontrado alteraciones similares puesto que se ha observado que tales mutaciones promueven la participación del transportador de LAT1 como método de compensación, de modo que se evita las alteraciones de los mecanismos de transporte de las THs (Heuer, 2007).

Así, la participación de estos THTTs a nivel del CNS sigue siendo un tema relevante pero aún poco comprendido; cada transportador presenta una afinidad y preferencia por THs específica, como se menciona en la Tabla 3. Además, y aún cuando se ha observado la expresión de algunos de estos THTTs en tipos celulares específicos dentro del CNS (Figura 1), la comprensión cabal del ingreso y egreso celular de las THs no ha sido del todo esclarecido, por lo que los estudios en modelos vertebrados ayudan a establecer y dilucidar el mecanismo de transporte de las THs y el efecto en caso de deficiencia de algún componente de este mecanismo.

Tabla 3. Transportadores de las hormonas tiroideas presentes en el CNS y su Km.

THTT	T4 K _m [μM]	T3 K _m [μM]	rT3 K _m [μM]	Sitio de expresión	Referencia
OATP1C1	0.0904 0.18	--	0.1277	Células endoteliales, plexo coroideo.	(Hagenbuch, 2007; Sugiyama, 2004)
MCT8	4.7	4.0	2.2	Corteza, hipocampo, hipotálamo, paraventricular, estriado, células ependimales del 3er ventrículo, hipófisis.	(Kinne et al., 2010; Heuer, 2007; Friesema et al., 2005)
LAT1	100-600 7.9	0.8-2 0.8	-- 12.5	Cerebro, capilares.	(Taylor & Ritchie, 2007; Friesema et al., 2001)

THTT= transportadores de hormonas tiroideas, Km (constante de Michaelis).

En los vertebrados estudiados, con la excepción del ratón, el transporte de THs en el CNS se ajusta a un modelo donde T4 y T3 atraviesan la BBB y las células endoteliales por medio de los transportadores OATP1C1 y MCT8 y, posiblemente un transportador desconocido aún (Vancamp & Darras, 2017). Dentro de los astrocitos, la T4 es metabolizada por la D2 para generar T3 (ver sección I.III “Activación e inactivación de las THs”) y ésta es captada por células precursoras de oligodendrocitos (OPCs), neuronas, oligodendrocitos y células precursoras neuronales (NPCs) por medio del transportador MCT8.

Una vez que la T3 está dentro de las neuronas, ésta puede activar mediante mecanismos genómicos la transcripción de genes necesarios para promover procesos como neurogénesis, oligodendrogénesis, mielogénesis, crecimiento axonal y sinaptogénesis, entre otros, o ser metabolizada por D3 para transformarla a 3,3'-T2 una forma inactiva. En humano y el pez, no se ha reportado la expresión de LAT1 (**Figura 1**).

En teléosteos, el proceso general del transporte de THs mediada por los THTTs, implica al menos los siguientes pasos: 1) la T4 (y una cantidad menor de T3) se transporta a través de la barrera hematoencefálica a través de OATP1C1 y MCT8; 2) la T4 es incorporada por los astrocitos por un transportador aún desconocido; 3) en los astrocitos, D2 convierte T4 en T3; 4) la T3 biológicamente activa es liberada de los astrocitos por otro transportador no

identificado; 5) el MCT8 facilita la captación neuronal de T3; 6) la T3 ejerce su acción genómica uniéndose a su receptor nuclear (ver sección I.IV “Mecanismo de acción”).

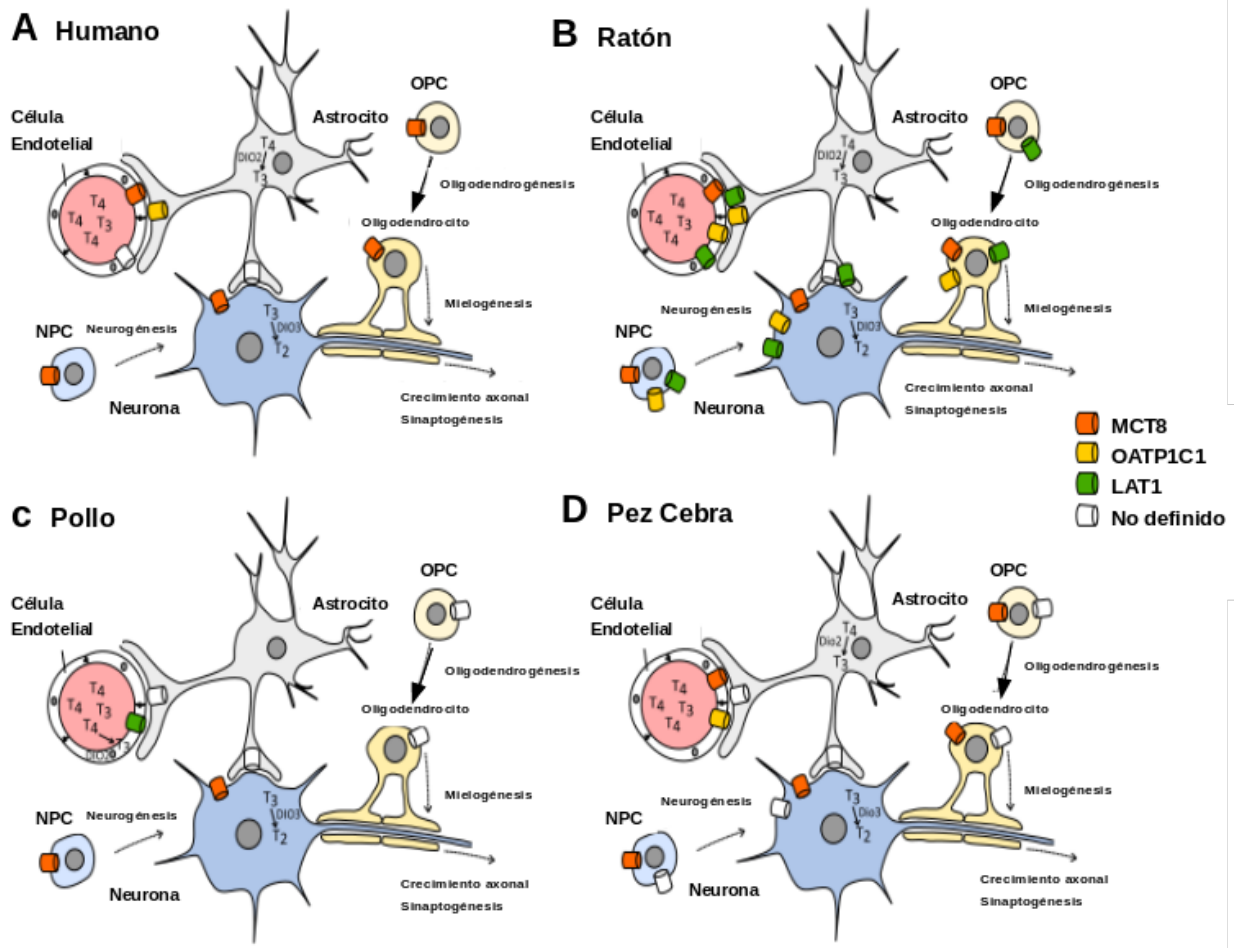


Figura 1 Esquemas representativos de la expresión de los THTTs en el CNS en diferentes vertebrados A) *Homo sapiens*, B) *Mus musculus*, C) *Gallus gallus* y D) *Danio rerio*. (Modificada de Vancamp & Darras, 2017)

2.1.5 Alteración de los THTTs y su Efecto en el CNS

La importancia biológica por la alteración en la expresión de alguno de estos THTTs, se vinculan principalmente a alteraciones en el desarrollo cerebral. Mutaciones en el gen MCT8 pueden generar el síndrome de retraso psicomotor ligado al cromosoma X, descrito en 1944 como el síndrome Allan-Herndon-Dudley (AHDS) (Schwartz & Stevenson, 2007), que

genera niveles circulantes de THs muy peculiares, T3 alta, T4 baja y TSH normal (Friesema et al., 2005; Visser et al., 2008). De esta forma se logró describir la existencia de una estricta regulación espacio-temporal de la TH durante el desarrollo del cerebro, la cual está controlada localmente por unidades funcionales de astrocitos y neuronas. Las concentraciones de THs locales demasiado bajas o altas pueden conducir a una señalización anormal de estos mensajeros endócrinos y eventualmente resultar en un desarrollo cerebral anormal.

Así, mientras que es bien sabido que mutaciones en MCT8 generan alteraciones graves en humanos, éstas no se replican en modelos murinos (Refetoff & Dumitrescu, 2007). El ratón es el vertebrado que muestra una mayor diversidad de THTTs en los diferentes tipos celulares que se encuentran en el CNS (Figura 1), explicando la falta de un fenotipo neurológico manifiesto en ratones *knock-out* para este transportador. Sin embargo, en ratones doble *knock-out* para MCT8 y OATP1C1, el transporte de THs sí se ve gravemente afectado, lo que implica que en esta especie el transporte de THs en el CNS depende más de otros transportadores como OATP1C1. También se ha propuesto que LAT1 puede actuar de forma emergente en roedores, regulando el paso de T4 y T3, evitando alteraciones en la homeostasis de las THs. En el modelo del pez cebra *knock-out* para Mct8, se encontraron alteraciones en el desarrollo endocrinológico y neurológico similar a los pacientes AHDS (Zada et al., 2017) mostrando que los peces son un modelo viable para el estudio de las alteraciones genéticas que afectan a los THTTs de forma similar a los humanos. Estos peces deficientes del transportador Mct8 mediante técnicas de marcaje, trazado y optogenética, mostraron efectos adversos en el CNS, principalmente la disminución en: la densidad sináptica, en la arborización neuronal, en la mielinización y en la actividad neuronal (Jung et al., 2010; Vatine et al., 2013; Zada et al., 2017).

2.1.6 Activación e Inactivación de las THs a nivel celular

Como ya se mencionó, la glándula tiroides sintetiza y secreta principalmente T4, la cual se considera una pro-hormona ya que es activada o inactivada a través de un proceso enzimático finamente regulado y que ocurre en prácticamente todas las células del organismo, denominado desyodación. De esta manera, la desyodación del anillo externo de

la T4 resulta en la formación de T3, la cual presenta mayor afinidad que la T4 por los receptores de hormonas tiroideas, y por lo tanto se ha considerado como la responsable de la mayoría de los efectos biológicos de las THs (Revisado en: Gereben et al., 2008).

La desyodación de las yodotironinas está catalizada por una familia de selenoproteínas denominadas genéricamente desyodasas (Ds). Estas enzimas contienen el aminoácido modificado selenio-cisteína en su sitio activo. Se conocen 3 isotipos enzimáticos D1, D2 y D3 que comparten similitudes estructurales; todas ellas son homodímeros que conforman proteínas integrales de membrana de entre 29 y 33 kDa, y sus genes presentan una alta homología, especialmente en la secuencia que corresponde al sitio activo (Bianco et al., 2002; Gereben et al., 2008; Orozco & Valverde, 2005).

Los tres isotipos son proteínas integrales de membrana cuya ubicación subcelular (D1 y D3 en membrana plasmática, D2 en retículo endoplásmico), les permite regular de manera precisa la biodisponibilidad intracelular de yodotironinas activas e inactivas (Gereben et al., 2008), sin embargo, difieren en sus características bioquímicas (**Figura 2**) y en su distribución tisular. Así, la D1 es una enzima que desyoda a la T4 en ambos anillos, externo e interno, formando, T3 o rT3, es decir, la D1 es capaz tanto de activar como de inactivar a la T4. Esta enzima se expresa principalmente en órganos con un gasto energético elevado como el hígado, el riñón y la propia glándula tiroidea. La D2 únicamente desyoda el anillo externo (3', 5') de la yodotironina, es decir, es una enzima que exclusivamente activa a la T4, produciendo T3. Su expresión basal es muy baja y ocurre principalmente en el sistema nervioso central y la hipófisis. La D3 es una enzima que únicamente desyoda el anillo interno (3, 5) de la yodotironina, es decir, a la T4 la convierte en rT3, y a la T3 en 3,3'-T2. La D3 se expresa principalmente en piel, placenta y en periodos críticos del desarrollo (Bianco et al., 2002; Zevenbergen et al., 2015).

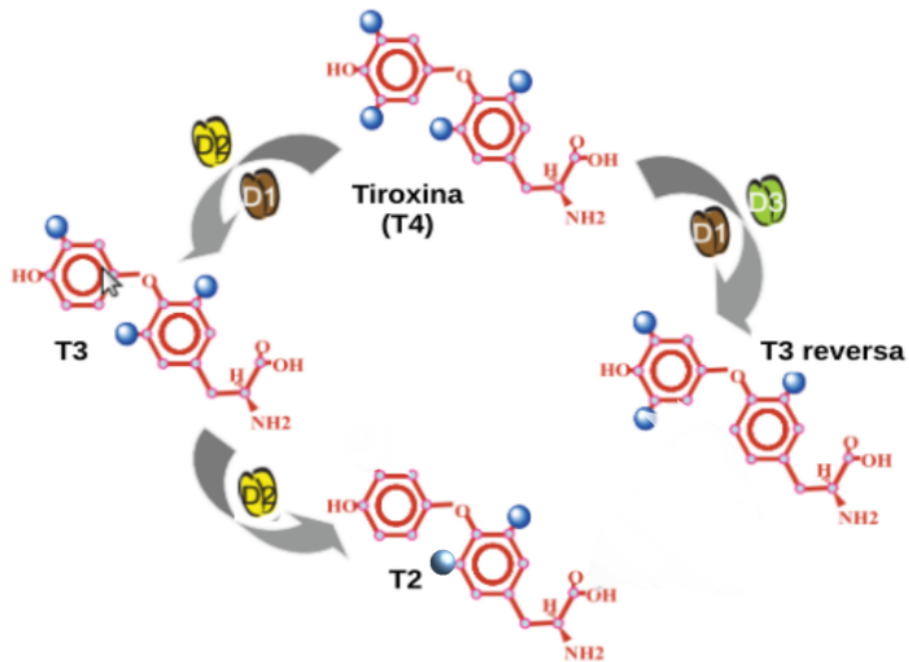


Figura 2. Esquema del metabolismo de las THs. En el esquema se indica el metabolismo mediado por las desyodasas D1, D2 y D3, para la formación de las THs. La T4 puede ser desiodada en su OR por D1 o D2, para formar a T3, o desiodada en IR por D1 o D3 para formar la TH inactiva rT3, (Modificada de Gereben et al., 2008).

La desyodación juega un papel crucial pues a través de este mecanismo se regula el estado tiroideo intracelular. Es importante resaltar que de las tres enzimas, la D2 y la D3 tienen un mayor impacto funcional. La D3 inactiva a la T4 y a la T3, por lo que se le ha atribuido una función protectora ante un exceso de hormona activa, mientras que la D2 favorece la generación de T3, subsecuentemente esta hormona ingresa al núcleo en donde se une a los TRs. Estas dos enzimas están finamente reguladas por el estado tiroideo, por lo tanto, cambios discretos en las concentraciones intracelulares de THs modifican tanto la actividad de las proteínas como la expresión de sus mRNAs (Gereben et al., 2008). Por otro lado, la desyodación secuencial del anillo externo de la T3 da lugar a la 3,5-T2 (T2), TH que también ha mostrado ser bioactiva (Moreno et al., 2017; García et al., 2007; Mendoza et al., 2013) y que es, como se describirá más adelante, una molécula central de estudio en la presente tesis.

2.1.7 Mecanismos de acción genómico

Como se mencionó anteriormente, las THs regulan la expresión de genes en todos los vertebrados a través de la unión a los receptores de hormonas tiroideas (TRs), que forman parte de la superfamilia de los receptores nucleares. Los TRs son unas proteínas de 400-500 aminoácidos que se encuentra formando heterodímeros con el receptor a ácido retinoico (RXRs) y que funcionan como factores de transcripción dependientes del ligando. Los TRs se localizan en el núcleo celular y presentan una organización estructural altamente conservada. La estructura base de los receptores nucleares consiste en seis dominios homólogos designados de la A a la F, partiendo del N-terminal al C-terminal de la proteína. El dominio N-terminal (NTD, dominio-A/B) presenta una estructura muy variada y contiene un dominio de transactivación constitutiva independiente de ligando, conocido como función de activación 1 (AF1); el dominio de unión al DNA (DBD, dominio-C), el cual es altamente conservado; la región bisagra (dominio-D) la cual confiere flexibilidad espacial a los receptores y une al DBD con la segunda región más conservada entre los receptores nucleares que es el dominio de unión al ligando (LBD, dominio-E). El LBD contiene la función de activación 2 (AF2) dependiente de ligando (Aagaard et al., 2011).

El heterodímero RXR-TR, regula la transcripción génica a través del reconocimiento y unión a una secuencia específica de DNA conocida como región promotora o TRE (T3-responsive element). Esta unión TR-TRE es el primer ensamble necesario para la regulación positiva o negativa de la transcripción génica. En el modelo clásico, en ausencia de ligando se reclutan proteínas correpresoras que compactan la hebra de cromatina que impiden la unión de la maquinaria de transcripción al DNA. Una vez que la TH se une a su receptor, este sufre un cambio de conformación causando el desplazamiento de los correpresores, lo que permite la unión de coactivadores, promoviendo la remodelación de la cromatina hacia un estado laxo que facilita la unión de la maquinaria de transcripción, culminando en la síntesis de proteína *de novo* (Grøntved et al., 2015).

Actualmente se conocen dos genes independientes que codifican para los TRs en vertebrados THRA y THRB, cuya transcripción resulta en diferentes isoformas α y β . El gen THRA expresa dos isoformas principales: TR α 1 y TR α 2, las cuales difieren en la región carboxilo-terminal. Al contener un fragmento de aminoácidos adicional en el LBD, el TR α 2 es

incapaz de unir T3, razón por la cual ejerce una función de dominante negativo al ocupar los elementos de respuesta en el promotor del gen blanco y así bloquear la transcripción. El gen TRHB también expresa dos isoformas principales, TR β 1 y TR β 2, las cuales difieren entre sí en la región amino-terminal pero ambas isoformas son capaces de unir THs (Vella & Hollenberg, 2017). Estas isoformas presentan una distribución tejido-específica, siendo TR β 1 principalmente expresada en riñón, hígado, cerebro y corazón, mientras que TR β 2 en hipotálamo, hipófisis y en CNS en etapas tempranas del desarrollo (Grøntved et al., 2015).

En teleósteos se encuentra además una copia extra del gen THRA (*thraa*) denominada *thrab*, mientras que solo se encuentra una para THRB (*thrb*); en términos generales, la estructura molecular de los distintos TRs se conserva en las diferentes especies de teleósteos (Holzer et al., 2017; Orozco et al., 2017). Hasta el momento se reconoce que en estos vertebrados el gen *thraa* expresa tres isoformas principales: tra-t, s-tra1 y l-tra1, mientras que el gen *thrab* únicamente expresa al trab (Marelli et al., 2017). Las isoformas del gen *thrb* han sido las más estudiadas a nivel funcional en teleósteos. Se han descrito al menos tres isoformas distintas s-trb1 (isoforma corta), l-trb1 (isoforma larga) y l-trb1+ (isoforma súper larga) . La diferencia entre estas isoformas es la presencia (*l-trb1*, *l-thrb1+*) o no (*s-trb1*) de un inserto de 9 aminoácidos (*l-thrb1*) y 29 aminoácidos (*l-thrb1+*) en el dominio de unión a ligando (Lazcano et al., 2019). Los ensayos iniciales para investigar la funcionalidad de estas dos isoformas demostraron que la isoforma larga tiene la misma afinidad hacia la T3 que la corta. Además, su expresión es tejido-específica (Mendoza et al., 2013).

3,5-T2 como ligando bioactivo

Hasta hace poco a la 3,5-diyodotironina (T2) se le consideraba una hormona inactiva a nivel nuclear, esto debido a su baja afinidad por los TRs en mamíferos. Ahora se reconoce que esta molécula tiene efectos a nivel génico en teleósteos (Mendoza et al., 2013; Navarrete-Ramírez et al., 2013; Hernández-Puga et al., 2017; Olvera et al., 2017), diversos trabajos en este laboratorio han mostrado que T2 tiene efectos en el crecimiento, en la regulación de la expresión de TRs específicos, en el reclutamiento de co-reguladores

específicos, además de la regulación específica de genes a nivel del CNS. Adicionalmente, se ha reportado que T2 en modelo murino regula la expresión de genes sensibles a TH e incluso en el humano (Lietzow et al., 2016; Bernal 2017).

Trabajos generados en nuestro grupo de investigación, ha mostrado que en la tilapia: 1) ambas hormonas, T3 y T2 al administrarse de forma exógena en un modelo de hipotiroidismo, con capaces de reestablecer a niveles fisiológicos la expresión de varios genes regulados clásicamente por THs (García et al., 2007); 2) la T2 al igual que la T3 estimulan el crecimiento y regulan diferencialmente la expresión de isoformas l-trb1 y s-trb1, respectivamente, sugiriendo que los efectos de ambas tironinas podrían estar mediados por las diferentes isoformas del receptor TR β 1 (Navarrete-Ramírez et al., 2013); 3) la T2 se une y transactiva únicamente al l-trb1, mientras que T3 se une preferencialmente al s-trb1, 4) la unión de T2 y T3 con sus respectivos receptores crea un cambio conformacional específico en el receptor, permitiendo la interacción con poblaciones de co-reguladores diferentes (Jab1-L-TR β 1-T2) (Hernández-Puga et al., 2017) y 5) la T2 al igual que la T3, puede desencadenar la regulación específica de genes a nivel del CNS (Olvera et al., 2017).

En conjunto, estos estudios sugieren que la T2 funciona como un ligando alternativo al menos del l-trb1 y que el binomio l-trb1 + T2 genera complejos funcionales específicos, teniendo al final un impacto plástico en la regulación de la expresión genética y en los diversos efectos tejido-específicos de las THs. Estos hallazgos permiten explicar, al menos en parte, la pleyotropía funcional de las THs.

Las Hormonas Tiroideas y el Desarrollo del CNS

Las THs son de crucial importancia en múltiples acciones fisiológicas en todos los vertebrados, desde peces hasta los humanos (Vancamp & Darras, 2017). Es de vital trascendencia la acción de las THs durante periodos críticos del desarrollo. De hecho, el hipotiroidismo congénito o neonatal puede inducir consecuencias adversas como retardo en el crecimiento somático y en el sistema nervioso (Zupanc et al., 2012; Zhang et al., 2015; 2016), afectando procesos como la diferenciación y migración celular, la neurogénesis y la mielinización axonal, entre muchos otros (Koibuchi & Chin, 2000; Zada et al., 2014; Zhang et al., 2015; Delbaere et al., 2017).

En el caso de la mielinización, las THs son indispensables para la diferenciación terminal de las células precursoras de oligodendrocitos (OPCs) a oligodendrocitos mielinizantes. De hecho, la ausencia de T3 induce el arresto del ciclo celular e inhibe la transcripción de genes pro-diferenciación (Lee & Petratos, 2016). Diversos estudios también han mostrado que se requiere de una fina modulación de THs para el desarrollo y mantenimiento de la citoarquitectura mielínica (Zhang et al., 2015; Anderson 2008). El hecho de que la desregulación de la mielinización en el desarrollo del organismo puede desencadenar patologías como la esclerosis múltiple (Moscarello et al., 1994), ha favorecido el estudio del uso de THs en tratamientos terapéuticos para los tratamientos de ésta y de otras afecciones debidas a desregulaciones intrínsecas en los niveles de estas hormonas (Fröhlich & Wahl, 2018).

2.2 El cerebelo en peces

2.2.1 Morfología cerebelar

El cerebelo es una región del CNS que surgió en los vertebrados, y participa en funciones de coordinación motora y aprendizaje motor, además de participar en el procesamiento cognitivo y funciones emocionales (Ito et al., 2007) o propioceptivas en peces (Rodríguez et al., 2005).

La estructura básica del cerebelo es altamente conservada en los vertebrados y durante la evolución, este adquirió diversidad en su morfología (**Figura 3**), observándose como una estructura pequeña en ciclostomados; una doble estructura doblada en tiburones; estructuras monofoliadas en teléosteos; estructuras planas en ranas; estructuras curvadas en lagartijas, o estructuras multifoliadas en aves y mamíferos (Hibi et al., 2017).

En la mayoría de los teléosteos, el cerebelo está conformado por la válvula (Va), el cuerpo cerebelar (CCe) que es una estructura monofoliada con una citoarquitectura trilaminar constituida por la lámina molecular (ML), la lámina de las células de Purkinje (PCL) y la lámina de las células granulares (GCL), y finalmente por la aurícula que consta del lóbulo caudalis (LCa) y la eminencia granularis (EG).

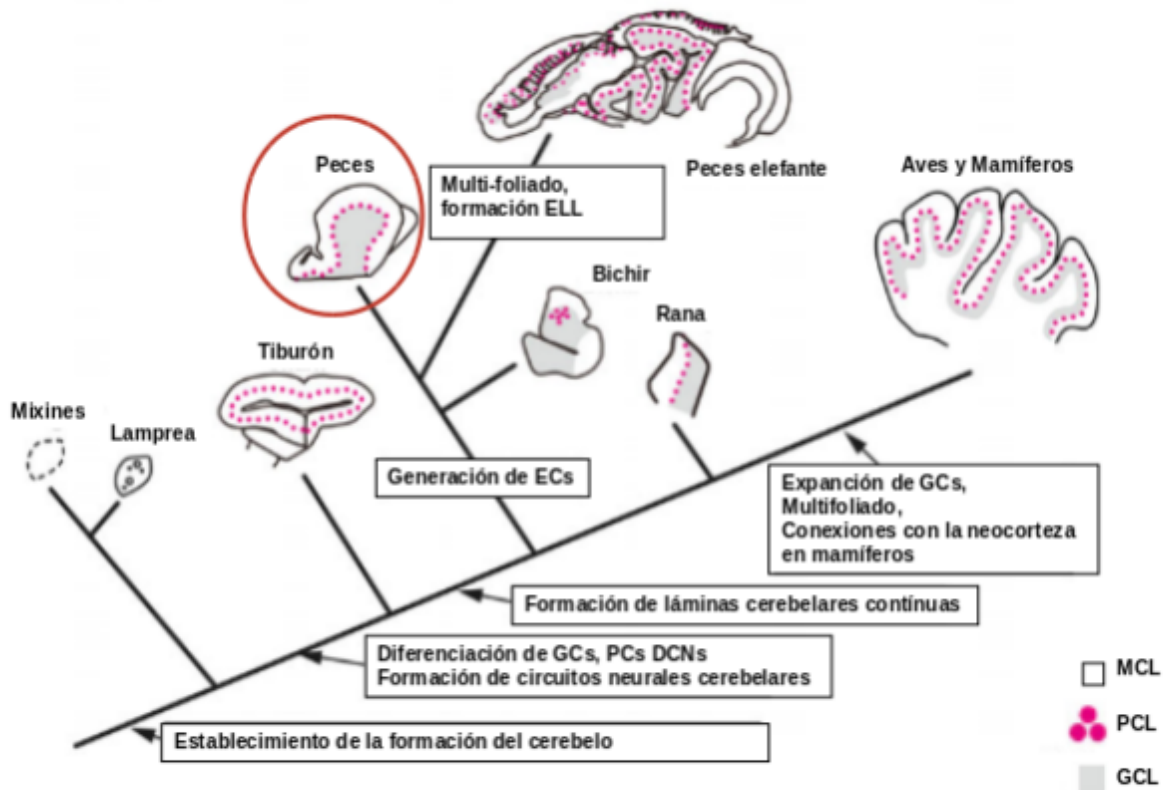


Figura 3. Diversidad morfológica del cerebelo en diferentes especies. En recuadros se marcan los cambios en la estructura del cerebelo durante la evolución de los vertebrados. Se observan en los cortes coronales la localización de las láminas cerebelares: lámina molecular (ML), lámina cerebelar de células de Purkinje (PCL) y lámina cerebelar de células granulares (GCL). Se marca con un círculo rojo el cerebro de teléosteos, modificada de Hibi et al., 2017. DCNs = núcleos cerebelosos profundos, Ecs = células euridendroides, ELL = línea lateral electrosensorial.

2.2.2 Tipos neuronales

Existen diferentes tipos de neuronas en el cerebelo de los peces que pueden ser organizadas en dos grandes grupos, de acuerdo con su función como neurona excitatoria o inhibitoria (Hibi et al., 2017; Takeuchi et al., 2015). Las neuronas excitatorias son glutamatérgicas y dentro de este grupo se encuentran las células granulares (GC) y las células euridendroides (EC). Las neuronas inhibitorias utilizan el ácido gama-aminobutírico (GABA) y/o la glicina como neurotransmisor y este grupo incluye a las células de Purkinje (PC) y las interneuronas como las células de Golgi (Go) y las células estrelladas (SC). Todas

estas células se encuentran en una disposición específica dentro de las tres láminas que conforman al cerebelo de los teléosteos ML, PCL y GCL, como se muestra en la **Figura 4**.

De forma interesante, solo los teléosteos y los peces de aletas radiadas presentan neuronas de proyección llamadas células euridendroides (EC) que reciben axones de las PC (Figura 4). Las EC envían proyecciones a las neuronas del tegmento (núcleo rojo), similar a la función de las células núcleo cerebelar profundo (DCN) en otras especies, por lo que se les ha denominado como funcionalmente equivalentes. Sin embargo, las EC reciben axones de las GCs y envía proyecciones fuera del cerebelo; es por esta razón que se marcó una diferencia entre los circuitos neurales que involucran a las neuronas de proyección cerebelosa entre peces y otros vertebrados (**Figura 4**). Aunque no se conoce la historia evolutiva de esta diversidad celular, se ha especulado que tiene repercusión en el desarrollo estructural y en la función motora (Bae et al., 2009).

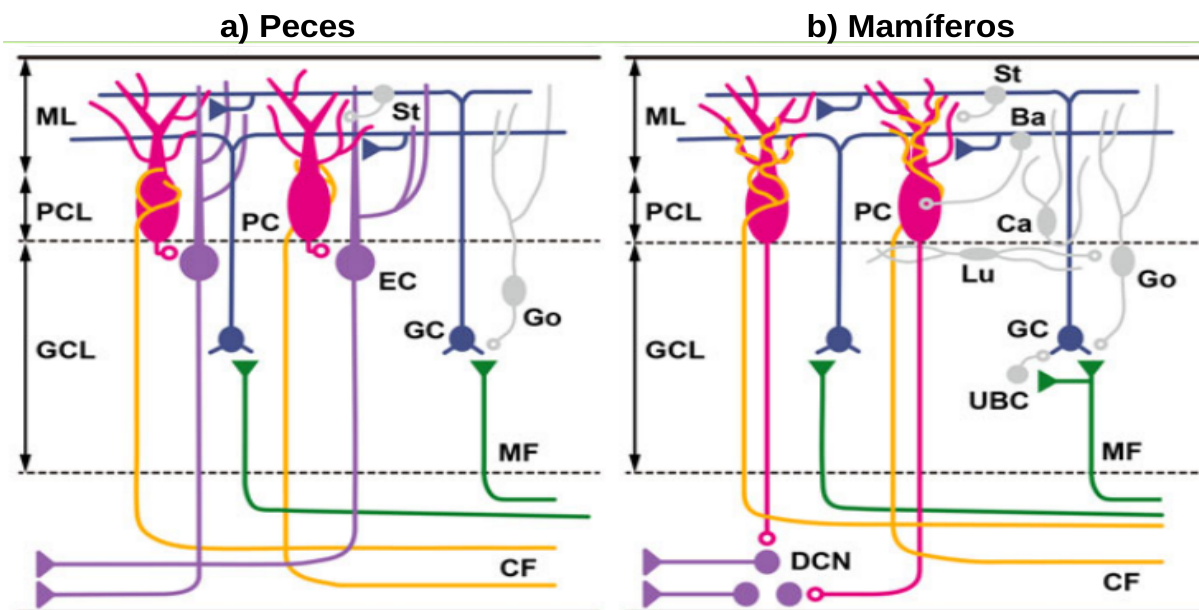


Figura 4. Esquema representativo de los tipos celulares, sus conexiones y la localización espacial dentro del cerebelo. En modelo de a) peces y b) mamíferos. ML=lámina molecular, PCL=lámina de células de Pukinje, GCL=lámina de células granulares, MF=fibras musgosas, CF= fibras trepadoras, St = célula estrellada, PC= célula de Purkinje, EC=células euridendroides, GC= células granulares, Go= células de Golgi, Ba= células de canasta, Ca=célula a, Lu= célula Lugaro, UBC=células unipolares, DCN =núcleo cerebelar profundo (Modificada de Hibi et al., 2017).

2.2.3 Circuitos cerebelares en telósteos

La estructura del circuito neural en el cerebelo que participa en funciones motoras y de coordinación, está muy conservado en los vertebrados; sin embargo, algunas estructuras cerebelares y tipos neurales son específicas para cada especie. Todas estas células se encuentran en una disposición específica dentro de las tres láminas que conforman al cerebelo de los telósteos ML, PCL y GCL (**Figura 5**).

El circuito en teleósteos se puede describir de la siguiente forma: las neuronas cerebelares glutamatérgicas reciben aferencias de núcleos precerebelares o sitios extracerebelares. Estos axones aferentes son clasificados en dos grupos: 1) Aferentes de núcleos precerebrales, pretectal, sensoriales, octavolateral, óptico accesorio y la médula espinal (Bae et al., 2009; Biechl et al., 2016), llamadas fibras musgosas que hacen contacto con células GCs y Go y 2) Aferentes de la oliva inferior (IO) en el cerebro medio posterior, llamadas fibras trepadoras que inervan a las CPs (**Figura 5**).

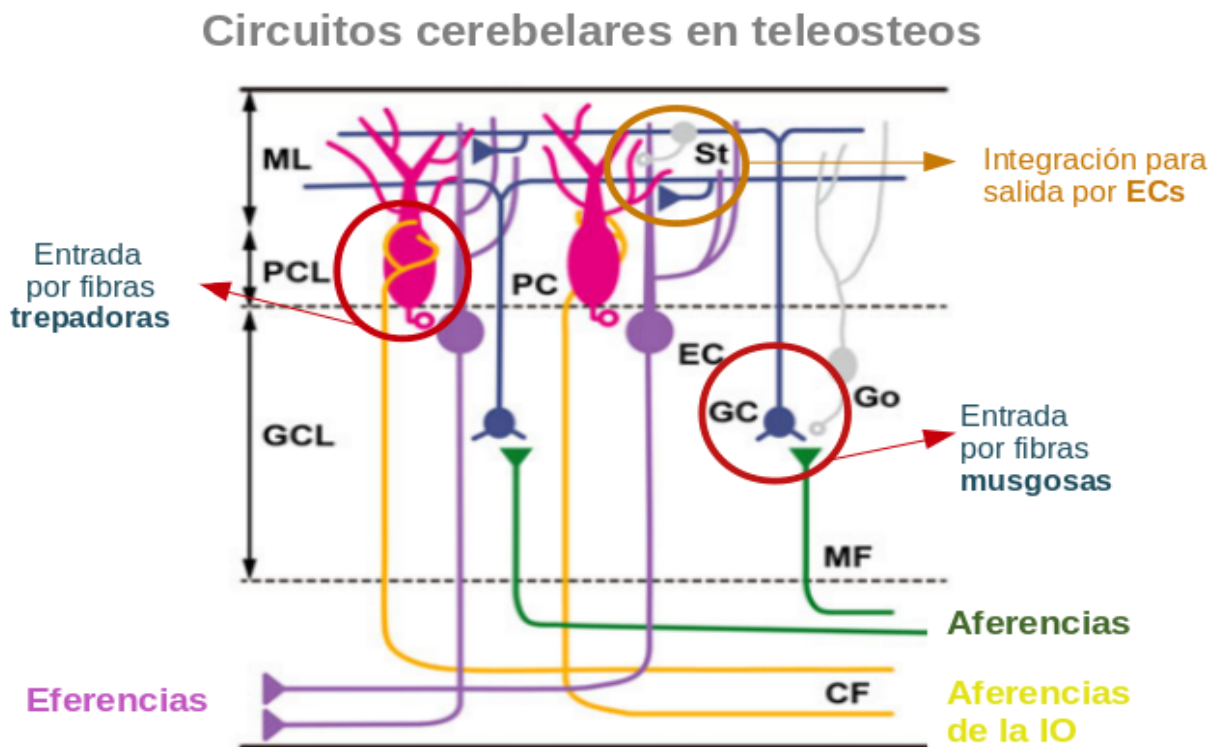


Figura 5. Esquema general de los circuitos de entrada, integración y salida de información en el cerebelo. (Modificada de Hibi et al., 2017)

Las GCs pueden hacer contacto con las Go y PCs mediante las fibras paralelas como otro punto de regulación o integración de información y las SCs son interneuronas que participan en la regulación de la información de las PCs. La actividad neural de las fibras trepadoras suprime la transmisión sináptica de los axones de las GCs por un mecanismo llamado inhibición a largo plazo (LTD), que es importante para la integración de información motora. Las ECs reciben información de las demás neuronas para enviar eferencias a otras regiones del cerebro como el tálamo ventral, el pretectum, el núcleo ruber y el núcleo oculomotor (Biechl et al., 2016; Imura et al., 2017).

2.2.4 Neurogénesis en adultos

Como resultado de distintos análisis comparativos, ahora se sabe que la generación continua de nuevas neuronas y células gliales en el cerebro adulto es una característica primitiva de todos los vertebrados; sin embargo durante el transcurso de la evolución, tanto el potencial neurogénico en estructuras cerebrales que forman parte de la vía motora, como la neurogénesis de células sensoriales se redujo o se perdió paralela y gradualmente. En teléosteos se encuentran aún varias zonas proliferativas concentradas en el telencéfalo, el diencefalo, el mesencéfalo y el cerebelo. Todas estas áreas son de suma importancia para mantener la neurogénesis, diferenciación celular y mielinización, aún en estadios adultos (Zupanc et al., 1996; Teles et al., 2012a; Hibi et al., 2017). En tilapia, se describió que dentro de las zonas de proliferación cerebelar (el cuerpo cerebelar y la válvula cerebelar) (Teles et al., 2012; Kaslin et al., 2013), las células nacen en la lámina molecular y migran a la lámina de células granulares (Hibi et al., 2017) (**Figura 6**). Se piensa que el mantenimiento de estas zonas proliferativas a lo largo de la vida del pez, es debida a la constante demanda para la generación de nuevas neuronas involucradas en el control de elementos motores y el procesamiento de información sensorial (Teles et al., 2012a).

En teléosteos, las neuronas del cerebelo son generadas a partir de dos dominios progenitores neurales: el labio rómbico superior (URL) y la zona ventricular cerebelar (VZ) (Kaslin et al., 2013) (**Figura 6**). El URL está localizado en la parte dorso-caudal del primordio cerebelar y los progenitores neurales en esta zona expresan el gen proneural *atoh1* (*tipo a, b y c*) que da origen a las neuronas excitatorias glutamatérgicas (Biechl et al., 2016). El VZ se

localiza en la raíz dorsal del cuarto ventrículo y ventral al URL y los progenitores neurales en esta zona expresan los genes *ptf1a* y *olig2*. *ptf1a* origina las neuronas inhibitorias GABAérgicas y las células gliales, mientras que la expresión de *olig2* promueve el origen de las células euridendroides CE, que son células de naturaleza excitatoria glutamatérgica (**Tabla 4**).

En muchos mamíferos la generación neuronal en EGL se mantiene en el periodo post-natal, pero se pierde en la pubertad (Sánchez-Villagra & Sultan, 2002). En el cerebelo del pez cebra, las GCs son continuamente generadas por la expresión del progenitor neural *atoh1* durante la vida del individuo en el ML y migran hacia la GCL (Zupanc, 2006; Biechl et al., 2016), mientras que el gen *ptf1a* promueve la generación de células gliales e interneuronas GABAérgicas generadas en el VZ, pareciera tener una ventana de mayor expresión durante los estadios larvales (1 mes post-fertilización), pues se ha reportado una menor expresión en estadios adultos (Kaslin et al., 2013).

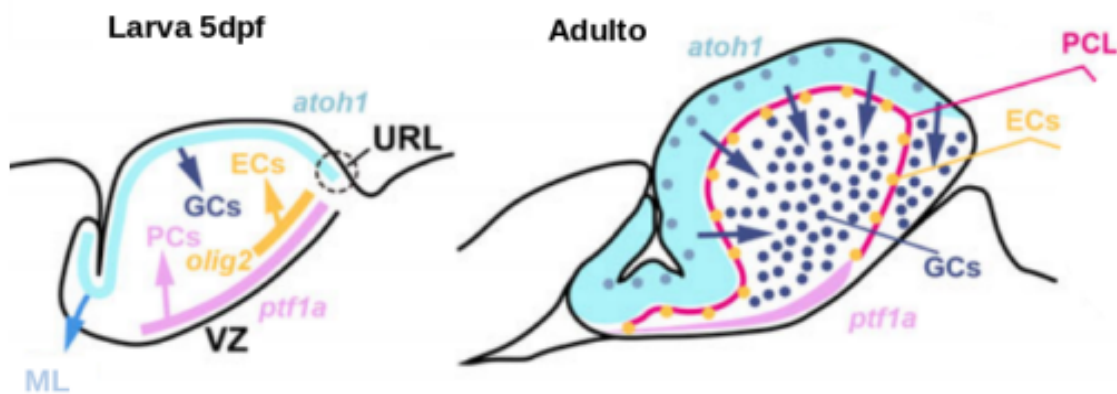


Figura 6. Neurogénesis en el cerebelo de peces. Esquema de cortes sagitales de cerebelo del pez cebra en estadio larval de 5dpf y en estadio adulto. Se encuentran localizadas las zonas de proliferación celular URL y VZ, con la expresión de genes proneurales, *atoh1* en azul, *olig2* en amarillo y *ptf1a* en rosa y señala la localización de las principales células que conforman al cerebelo PCL, ECs y GCs. ML= Lámina molecular. (Modificada de Hibi et al., 2017).

Tabla 4. Tipos celulares localizadas en el cerebelo y sus características.

Células	GCs UBCs	PCs Go y SCs	ECs
Zona de origen	URL	VZ	VZ
<i>gen</i>	<i>atoh 1</i>	<i>pft1a</i>	<i>olig2</i>
Tipo	Glutamatérgica exitatoria	Gabaérgicas inhibitoria	Glutamatérgicas exitatoria
Aferencias	Fibras musgosas	Fibras trepadoras	Axones de PC
Función	Integra información de aferencias extracerebelares	Integra la información de las CG	Integra la información de las CP y envía eferencias al cerebro

3. Planteamiento del problema

El cerebelo de los teléosteos presenta nichos de células progenitoras que no están presentes en el cerebelo de los mamíferos y estos permanecen funcionales a lo largo de la vida del organismo. Estudios en distintos modelos vertebrados han demostrado que la T3 es fundamental para que los procesos de migración, diferenciación y mielinización neuronal se desarrollen correctamente en los nichos del CNS. Por otro lado, en el laboratorio se ha demostrado que la T2 es una hormona bioactiva al menos en el hígado, capaz de unirse y activar isoformas específicas de receptores de hormonas tiroideas y de regular genes de manera distinta a la T3; sin embargo, no existe información al respecto en el CNS.

En esta tesis se estudió la participación de las vías de señalización mediadas por T2 y T3 en el cerebelo de tilapia juvenil y se describió si estas regulan los genes asociados a la función tiroidea (su transporte, metabolismo y mecanismo de acción). Estos estudios permiten sentar las bases para analizar con mayor profundidad procesos de neurogénesis y mielinización mediados por hormonas tiroideas.

Además, los hallazgos de esta tesis permiten profundizar en el conocimiento básico que apoya la idea de que en los sistemas tiroideos se genera más de una hormona activa que ejerce sus efectos a través de una vía de señalización distinta y que regula una población de genes particular y tejido específico. Esta posibilidad permitiría en parte explicar los efectos pleiotrópicos de las THs.

4. Hipótesis y Objetivos

Hipótesis

La variación en la disponibilidad de hormonas bioactivas como T2 y T3 en el cerebelo, regula de forma diferencial a uno o varios efectores de la actividad fisiológica de las THs en el CNS.

Objetivo general

Determinar la distribución y patrón de expresión de los elementos que participan en la señalización tiroidea tales como transportadores, desyodasas y receptores nucleares en el cerebelo de tilapia y analizar si estos elementos son regulados por T2 y T3.

Objetivos específicos:

- i. Determinar la localización de la expresión de los elementos involucrados en la función tiroidea dentro de la anatomía cerebelar.
- ii. Evaluar si la T2 y/o la T3 regulan la expresión de genes asociados a la función tiroidea en el cerebelo.

5. Materiales y Métodos

5.1 Material biológico

Se utilizaron tilapias (*Oreochromis niloticus*) machos, juveniles de ~4–6 g (16 semanas post-eclosión). Todas las tilapias utilizadas en este proyecto fueron donadas por la Unidad de Cuarentena de Tilapia y Pezgado de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, México. Los peces se mantuvieron en el bioterio del instituto, en tanques de 10 L de agua, con aireación controlada, temperatura de 25 °C y un fotoperiodo de 12:12 h. La alimentación de los peces se realizó una vez al día con una dieta comercial de (Sera Marin, Sera, Germany). Todos los animales de experimentación fueron tratados de acuerdo con los protocolos, procedimientos de uso y eutanasia animal revisados y aprobados por el comité de bioética del Instituto de Neurobiología.

5.2 Cultivos Organotípicos de Cerebelo

Los cultivos se realizaron conforme al protocolo previamente descrito para el hígado de tilapia (Navarrete-Ramírez et al., 2013), con las siguientes modificaciones: se disectaron cerebelos intactos de las tilapias no tratadas, puestos en un medio estabilizador frío que contenía 50 % de HBSS [Hank's Balanced Salt Solution (Gibco)], 50 % de MEM [Minimum Eagle's Medium (Gibco)], 10 mM HEPES y 8 mM de Glucosa (pH 7.2) por 20 min. Posteriormente los cerebelos fueron colocados en grupos de cuatro en insertos de membrana semiporosa (Millipore, Herts, UK. Tamaño de poro 0.4 µm) y estos en platos de cultivo de seis pozos con 2 ml de medio de cultivo con 50 % de MEM, 10 mM HEPES y 35 % de HBSS suplementado con 10 % de suero de caballo, 8 mM de glucosa y 5 % de penicilina-streptomina (Gibco). Se separaron en grupos experimentales, utilizándose tres insertos con 4 cerebelos cada uno por grupo.

Los tejidos se mantuvieron en una incubadora a 18-20 °C con 5 % de CO₂ por 48 h para estabilizarlos y verificar su viabilidad. Posterior a esto, el medio de cultivo fue sustituido por medio de cultivo suplementado con vehículo NaOH (0.01 N) para el grupo control y T2 o T3 en diferentes concentraciones (0.1, 1, 10, y 100 nM) previamente solubilizadas en

vehículo para cada grupo experimental; todos los tejidos fueron incubados por 24 h. Posterior al tratamiento se procedió a congelar los tejidos para la RT-qPCR o FISH.

5.3 Extracción de RNA

El RNA total fue extraído utilizando el método de TRIzol (Invitrogen), utilizando ~ 50 mg de tejido por grupo. La pureza e integridad del RNA total fue revisada con un gel de agarosa (1 %) y la concentración de RNA fue medida con un espectrofotómetro Nano-Drop ND-1000 UV-Visa a 260 nm (Nano Drop Technologies).

5.4 RT-qPCR

Se obtuvo el DNA complementario (cDNA) por transcripción reversa (RT) utilizando 2 µg del RNA total, la enzima transcriptasa reversa (Gibco, BRL) y un oligo (dT) para todos los grupos experimentales. En el caso del mRNA de la D2 y debido a que este transcrito contiene más de 3 Kb de extensión en su región 3' no traducida, se utilizó un oligonucleótido anti-sentido específico complementario a una región del extremo 3' cercana al codón de término del mRNA de la secuencia de esta desyodasa (TTCAGAGCTCATCTACTATCGT).

El PCR en tiempo real para cada grupo se realizó por duplicado utilizando dos genes de referencia: β -Actina y la enzima conjugada a ubiquitina E2Z (UBCE). Se midió la expresión de genes que participan en el transporte de la TH [mct8, oatp1c1], en la activación/inactivación de la TH [dio2, dio3], y en la señalización transcripcional [l-thrb1, thraa] utilizando una curva de concentración previamente estandarizada para cada gen. Para todos los genes se utilizó 1 µL de cDNA, 6 µL del reactivo SYBR Green Real-Time PCR Master Mix y 500 nM de los oligonucleótidos específicos sentido y antisentido (**Tabla 5**), en un volumen final de 12 µL. El protocolo usado para todos los genes fue 10" a 95 °C, 10" a 60 °C, 10" a 72 °C por 40 ciclos. La detección y análisis de datos se realizó con un aparato Step One Real-Time PCR System (Applied Biosystems®) y el software del equipo, según las instrucciones del fabricante.

El análisis incluyó una curva de disociación para descartar la formación de productos inespecíficos. Los resultados se normalizaron con respecto a la curva estandarizada de los

dos genes de referencia y se graficó expresando el número de moléculas por μg de RNA total.

Tabla 5. Características de los oligonucleótidos utilizados para la qPCR.

Nombre	abr	Referencia	Oligo F / R en 5'-3'	Amplicon (bp)	Valor R
Receptor de hormonas tiroideas alfa	<i>thraa</i>	AF302 248.1	GCA GGA CTC TAA CCC ATC A GTC ATG CTC TTC ACC GAA CA	96	0.97820
Receptor de hormonas tiroideas beta, isoforma larga	<i>l-thrb1</i>	NM_001311334.1	GTG AAG GAA GCT AAG CCT GA CAC AAG GCA GCT CAC AGA AC	172	0.95870
Desyodasa tipo II	<i>dio2</i>	XM_005477716.2	GAA ACT TGG CTG TGA GGC TCA TCA ATG TAC ACT AAC AGG	240	0.95450
Desyodasa tipo III	<i>dio3</i>	NM_001279439.2	GCA TCG CTG TTT GGA AGA CAG TCT CAA AGT AGG CTC CGT ACG	125	0.93650
Polipéptido transportador de aniones orgánicos tipo 1c1	<i>oatp1c1</i>	XM_005451774.2	GAC CAC TGC TGG TTG TCA G GTG TGA TGG AGC TCT TCA TG	202	0.93890
Transportador monocarboxilado tipo 8	<i>mct8</i>	XM_005467565.2	GCT AAC GTT CAA GCC TCT GC ACT CGG TAT GTG ACG ATG TG	180	0.98920
Actina citoplasmática 2	<i>Actb</i>	XM_003455949	ACT TCG AGC AGG AGA TGG GGT GGT TTC GTG GAT TCC	170	0.98970
Enzima conjugada a ubiquitina E2 Z	<i>ube2z</i>	XM_003460024	CTC TCA AAT CAA TGC CAC TTC C CCC TGG TGG AGG TTC CTT GT	130	0.99360

5.5 Tinción de Nissl

Se utilizaron los cerebelos intactos previamente fijados en PFA (4 %), criopreservados en sacarosa (30 %) mantenidos a 4° C, y posteriormente embebidos en parafina (realizado en la unidad de histología). Con los bloques de parafina se obtuvieron cortes sagitales de 10 μm que fueron teñidos mediante un tren de rehidratación gradual con xileno y etanol (100 %, 96 %, 80 % and 70 %) por 5 min y puestos en solución de violeta de cresilo (0.5 %) por 30 seg, lavados en agua destilada y deshidratados con el tren inverso de etanol y xileno por 5 min para finalmente aplicar medio de montaje entellan y ponerles el cubreobjetos para su posterior revisión histológica.

5.6 Hibridación *in-situ* Fluorescente (FISH)

Posterior a la aplicación de los tratamientos, los cerebelos fueron congelados en isopentano y embebidos en OCT (previamente descrito). Utilizando un criostato (Leica-CM1850) para obtener cortes sagitales de 30 μ m y ser montados en portaobjetos SuperFrost Plus (VWR). Los cortes obtenidos fueron utilizados para delimitar estructuras histológicas y para la obtención de imágenes que permitieron la visualización de la expresión de los genes de interés por FISH.

5.6.1 Síntesis de las sondas de mRNA

Se sintetizó toda la región codificante de los genes *thraa*, *dio2* y *dio3*, así como 1 Kb de la región que codifica *l-thrb1*, *oatp1c1* y *mct8* usando oligonucleótidos específicos para su amplificación (**Tabla 6**). Los fragmentos amplificados fueron insertados dentro de un vector pCR 4-TOPO (Invitrogen) y se linearizaron usando enzimas de corte para los sitios T3 y T7; posteriormente se marcaron con el DIG RNA labelling kit (ROCHE).

La determinación de una señal positiva y negativa depende del sentido en que se encuentre la sonda, ya que el marco de lectura del mRNA es siempre 5' --> 3', por ello, la sonda "sentido" (5'--> 3') es el control negativo, ya que corresponde a la secuencia en la misma dirección de lectura del mRNA correspondiente, mientras que la sonda "anti-sentido" (3'--> 5') es el experimental positivo, ya que al ser la secuencia complementara al mRNA de interés, hibridará con éste, generando el marcaje.

Tabla 6. Características de las sondas.

Gen	Tamaño de fragmento (bp)	Posición 5'-3'en el transcrito	Enzimas para la linearización antisentido/sentido
<i>mct8</i>	1131	307 - 1438	Not I – Spe I
<i>oatp1c1</i>	1207	1468 - 2675	Not I – Spe I
<i>dio2</i>	738	17 - 755	Not I – Pme I
<i>dio3</i>	801	129 - 930	Not I – Spe I
<i>l-thrb1</i>	1161	1 - 1161	Not I – Pme I
<i>thraa</i>	1133	58 - 1191	Not I – Spe I

5.6.2 Hibridación

Las laminillas con el tejido cerebelar fueron hibridadas de acuerdo al protocolo descrito previamente por (Carasatorre et al., 2015), utilizando un Anti-DIG-POD (1:800) (ROCHE) diluido en TSA. Utilizamos Tyramide-Cy3 (TSA-Cy3; 1:75) para revelar la fluorescencia y finalmente para contrastar, utilizamos una tinción rápida con DAPI (1:400 en TBS) (ROCHE). Montamos las laminillas con medio 1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octane (DABCO 33-LV; Sigma-Aldrich) para optimizar la visualización del fluoróforo.

5.7 Imágenes de fluorescencia

La observación y adquisición de imágenes se realizó utilizando un microscopio Imager ZI (ZEISS), con cámara acoplada AxioCam MRm (ZEISS-60N-C). Las imágenes fueron obtenidas en un formato de mosaico 2D de 12 x 14 imágenes, guardadas en formato .jpg en AxioVision LE 4.8.1 software 2009. El ajuste de las imágenes se realizó con el programa Inkscape (Vector Graphics Editor).

5.8 Imágenes en confocal

La fluorescencia de Cy3 (AB-514; EM-570) fue detectada usando un microscopio confocal Carl Zeiss – LSM 780 y el software ZEN. Utilizamos para la detección de DAPI un láser Coherent-XR multiphoton a 350 nm. Las imágenes 3D fueron obtenidas en forma Tile Scan de 10 a 18 μm en un eje Z (1.58 pixeles), con una resolución de imagen de 1024 \times 1024 pixeles. El procesamiento y análisis de las imágenes se realizó mediante el paquete de Fiji (version: 2.0.0-rc-66/1.52b; <http://imagej.net/contributors>) Image J.

5.9 Análisis mediante Fluorescencia total

La intensidad de la fluorescencia total fue calculada con la siguiente fórmula: (Int.den. del canal rojo o azul) – (el área total * promedio del fondo). Los valores de la densidad integrada se obtuvieron usando las herramientas de Fiji calculando por separado cada canal [red (TSA-Cy3) y azul (DAPI)]. El total de fluorescencia fue obtenida como el porcentaje de TSA- Cy3 con respecto a DAPI.

5.10 Análisis estadísticos

Los resultados fueron graficados y analizados con el software GraphPad Prism 7 usando un test no-paramétrico Kruskal-Wallis acoplado a un test post-hoc Dunn's (control vs tratamiento). Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas con un valor $p < 0.05$.

6. Resultados

6.1 Histología

Inicialmente realizamos cortes tanto coronales como sagitales de 30 μm a los cuales aplicamos la tinción básica de Nissl. Esta tinción se utiliza para teñir estructuras celulares (núcleo y citoplasma) y con ello lograr delimitar las estructuras que conforman al cerebelo. Usamos el Atlas de *Oreochromis mossambicus* (Simões et al., 2012) para localizar, delimitar y nombrar dichas estructuras **Figura 7**.

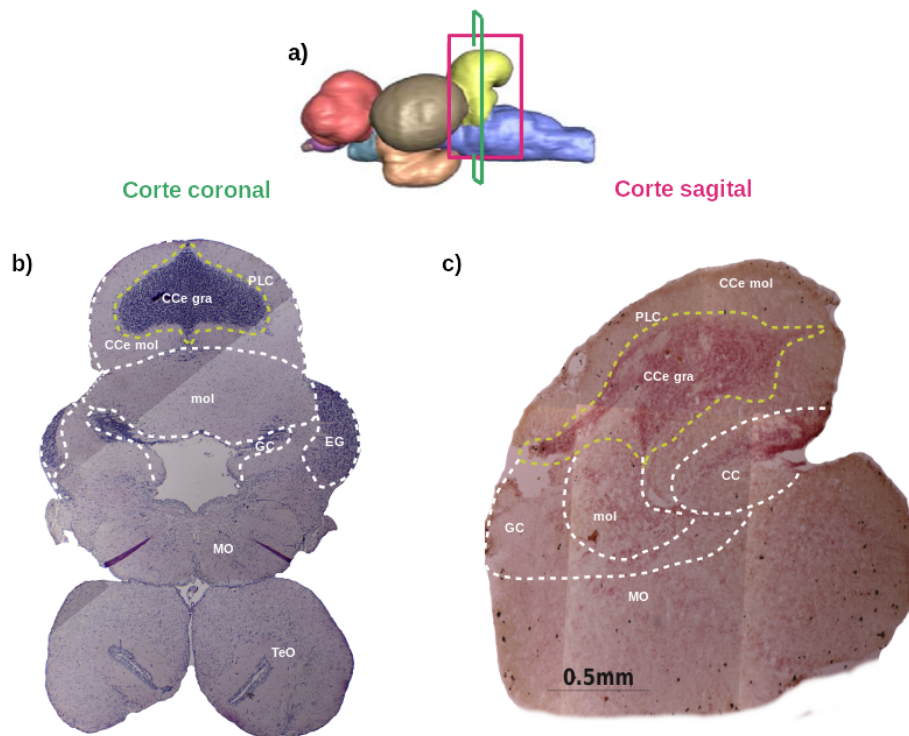
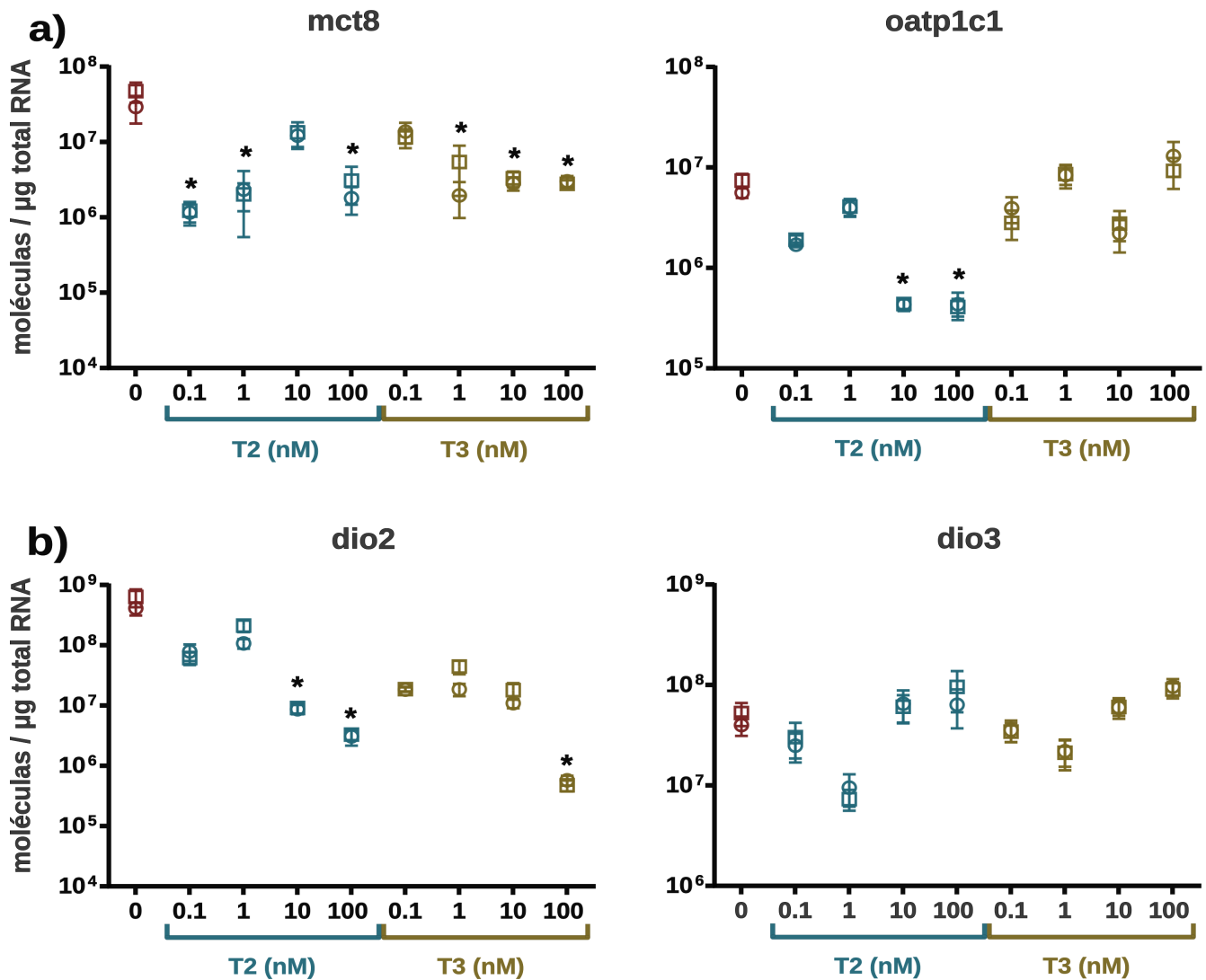


Figura 7. Histología del cerebelo de la tilapia juvenil. a) Esquema de una vista lateral del cerebro (modificada de Simões et al., 2012), marcando el corte coronal (verde) y sagital (rosa); b) corte coronal y c) corte sagital, ambos de 30 μm con tinción de Nissl delimitando con línea punteada cada estructura (CCe gra: lámina granular del cuerpo cerebelar; PLC: lámina de las células de Purkinje; CCe mol: lámina molecular del cuerpo cerebelar; mol: lámina molecular; CC: cresta cerebelar; GC: gris central; MO: médula oblongada; TeO: tectum óptico).

De esta forma, determinamos que los cortes sagitales nos permitían visualizar un mayor número de estructuras en un solo corte y así una mejor comprensión visual de la misma estructura.

6.2 Patrón de expresión cerebelar de los genes involucrados en la función tiroidea en respuesta a distintas concentraciones de T2 y T3

Como se indicó en la sección “experimentos *ex-vivo*”, se utilizaron cultivos organotípicos de cerebelo a los que se les aplicó vehículo NaOH (0.01 N) (grupo control) o T2 o T3 en diferentes concentraciones (0.1, 1, 10, y 100 nM) (grupos experimentales). Todos los tejidos fueron incubados por 24 h a 18° C. Posterior al tratamiento se procedió a extraer el RNA total para cuantificar la expresión de los genes de interés mediante la técnica de la RT-qPCR (**Figura 8**).



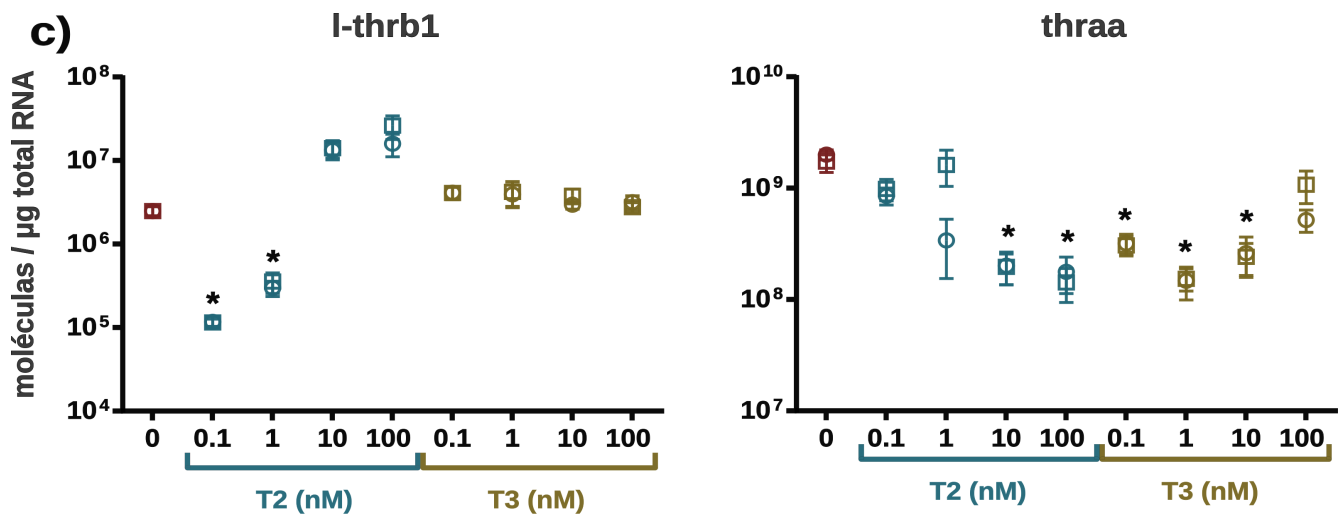


Figura 8. Patrón de expresión cerebelar de los genes involucrados en la función tiroidea en respuesta a distintas concentraciones de T2 y T3. Cultivos de cerebelos de tilapia (se utilizaron 4 cerebelos por grupo y 3 grupos de cerebelos por cada tratamiento). Se muestra el grupo control (rojo) y los grupos tratados con [0.1, 1, 10 o 100 nM de T2 (azul) o T3 (café)]. Se muestran los promedios con error estándar de los resultados de la RT-qPCR, normalizados con dos genes de referencia: ubce en cuadros y Actb en círculos. a) muestra el grupo de transportadores, mct8 y oatp1c1; b) muestra el grupo de desyodasas dio2 y dio3; c) muestra el grupo de los receptores de hormonas tiroideas l-thrb1 y thraa. Comparando al grupo ctl con cada grupo experimental, los grupos que fueron significativamente diferentes se marcan con un * = $p < 0.05$.

Los resultados obtenidos muestran que con la administración de [0.1, 1, 10 o 100 nM] de T2 y de T3, la expresión del mRNA es regulada a la baja para casi todos los genes de interés. Para los transportadores de THs, mct8 es regulado a la baja con todas las concentraciones usadas de T2 y T3, el oatp1c1 es regulado a la baja solo a altas concentraciones (10 y 100 nM) de T2, y no es responsivo a T3. Los resultados de las desyodasas muestran que dio2 fue regulado a la baja por altas concentraciones (10 y 100 nM) de T2 y (100 nM) de T3, mientras que dio3 no es responsivo a T2 ni a T3. Para los receptores de THs, l-thrb1 muestra una respuesta dual a T2, a concentraciones de 0.1 y 1 nM es regulado a la baja, pero a 10 y 100 nM es regulado a la alta, mientras que no es responsivo a T3. Los receptores a THs, thraa fue regulado a la baja por 10 y 100 nM de T2 y a todas las concentraciones de T3.

Apartir de estos resultados, se determinó que 10 nM es la concentración donde la mayoría de los genes muestra una respuesta ante la administración de ambas hormonas. Y se utilizó esta concentración para los experimentos de FISH.

6.3 Localización de la expresión cerebelar de los genes involucrados en la función tiroidea

Para dilucidar la expresión y localización del mRNA de los genes de interés que corresponden a transportadores (mct8, oatp1c1), desyodasas (dio2, dio3) y receptores de hormonas tiroideas (thraa, l-thrb1), utilizamos la técnica de Hibridación fluorescente *in-situ* (FISH, por sus siglas en inglés), en cortes sagitales de 30 μm de cerebelos del grupo control en donde probamos la sonda sentido (negativo) y anti-sentido (positivo) para cada gen (Figura 9).

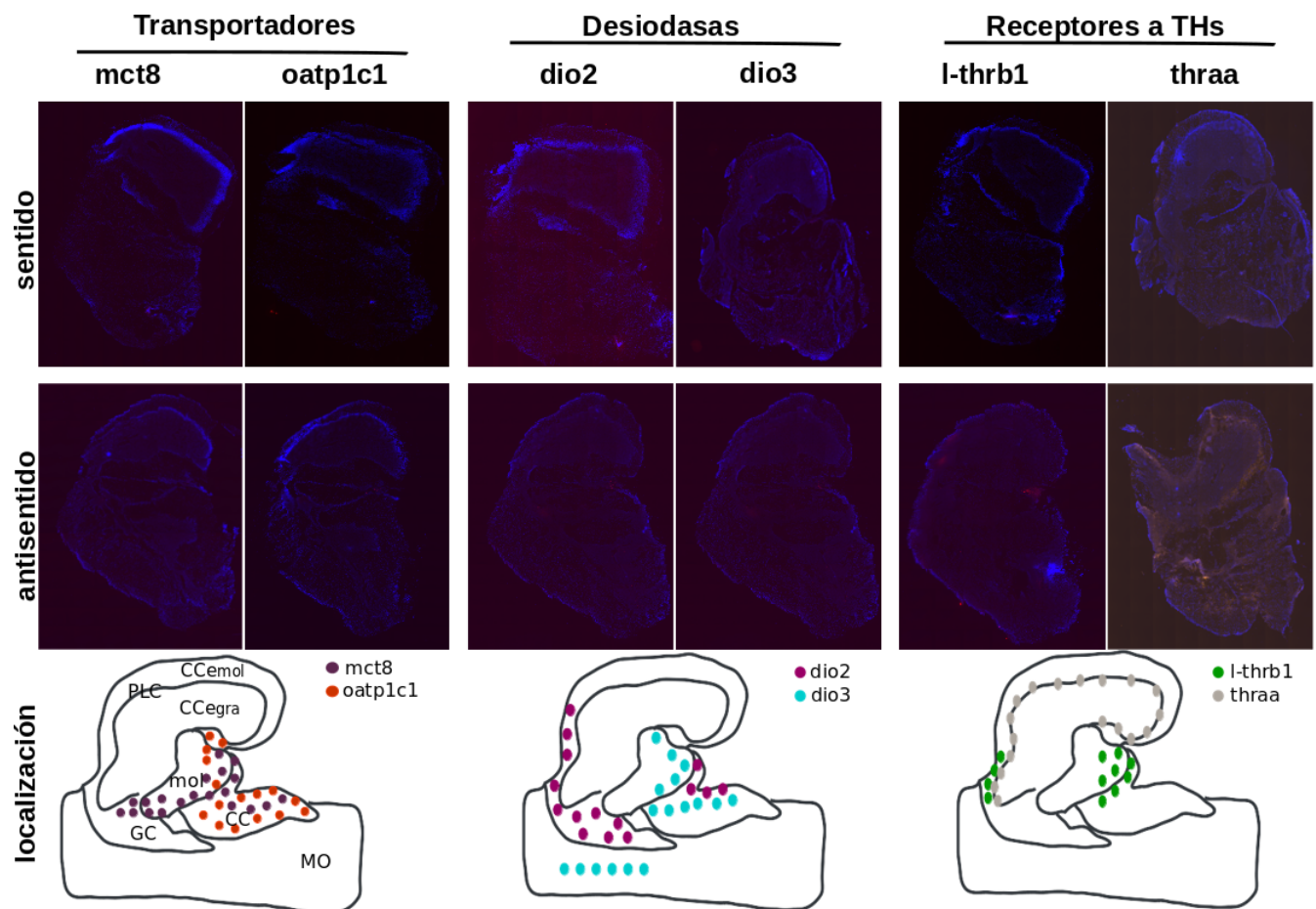


Figura 9. Determinación de la especificidad de las sondas para FISH. Se muestran los ensayos con FISH, utilizando las sondas sentido (negativo) y anti-sentido (positivo) para cada gen. Se observa la expresión de mRNA (rojo) y de los núcleos celulares marcados con DAPI (azul). Imágenes en mosaico 2D de 12 x 14 imágenes.

La obtención de estas imágenes en forma de mosaico nos facilitó visualizar el corte en su totalidad para localizar panorámicamente la zona de expresión de los diferentes genes. En todos los casos, nuestro control negativo solo mostró señal de fondo y para facilitar la comprensión de la localización o co-localización de la expresión del mRNA de grupos de genes con función de transportadores, desyodasas y receptores, se generó un esquema de localización cerebelar (**Figura 9**).

Para dar una mejor resolución del marcaje por FISH y poder realizar una cuantificación de la fluorescencia, se obtuvieron imágenes de microscopía confocal, con las cuales se pudo resolver que el marcaje del mRNA de todos los genes se dio a nivel citoplasmático ya que no identificamos co-localización con el DAPI como se muestra en la **Figura 10**. Utilizando estas imágenes se pudo definir la abundancia de la expresión del mRNA por gen en cada estructura cerebelar como se muestra en la **Tabla 7**, dicha tabla se generó después de cuantificar con imageJ las células marcadas en las imágenes de fluorescencia en mosaico.

Tabla 7. Abundancia del mRNA de los genes de interés en cada estructura del cerebelo de la tilapia.

Estructura	Ab	mct8	oatp1c1	dio2	dio3	l-thrb1	thraa
crista cerebelar	CC	+++	+++	++	++	++	-
lámina molecular	mol	++	++	++	++	-	-
lámina de las células de Purkinje	PLC	-	-	-	-	-	+++
gris central	GC	++	-	+++	-	++	-
lámina molecular del cuerpo cerebelar	CCe mol	-	-	+	-	+	-
lámina granular del cuerpo cerebelar	CCe gra	-	-	-	-	-	-
médula oblongata	MO	-	-	-	++	-	-

[(+) baja, (++) media, (+++) alta, (-) ausencia], Ab = abreviatura.

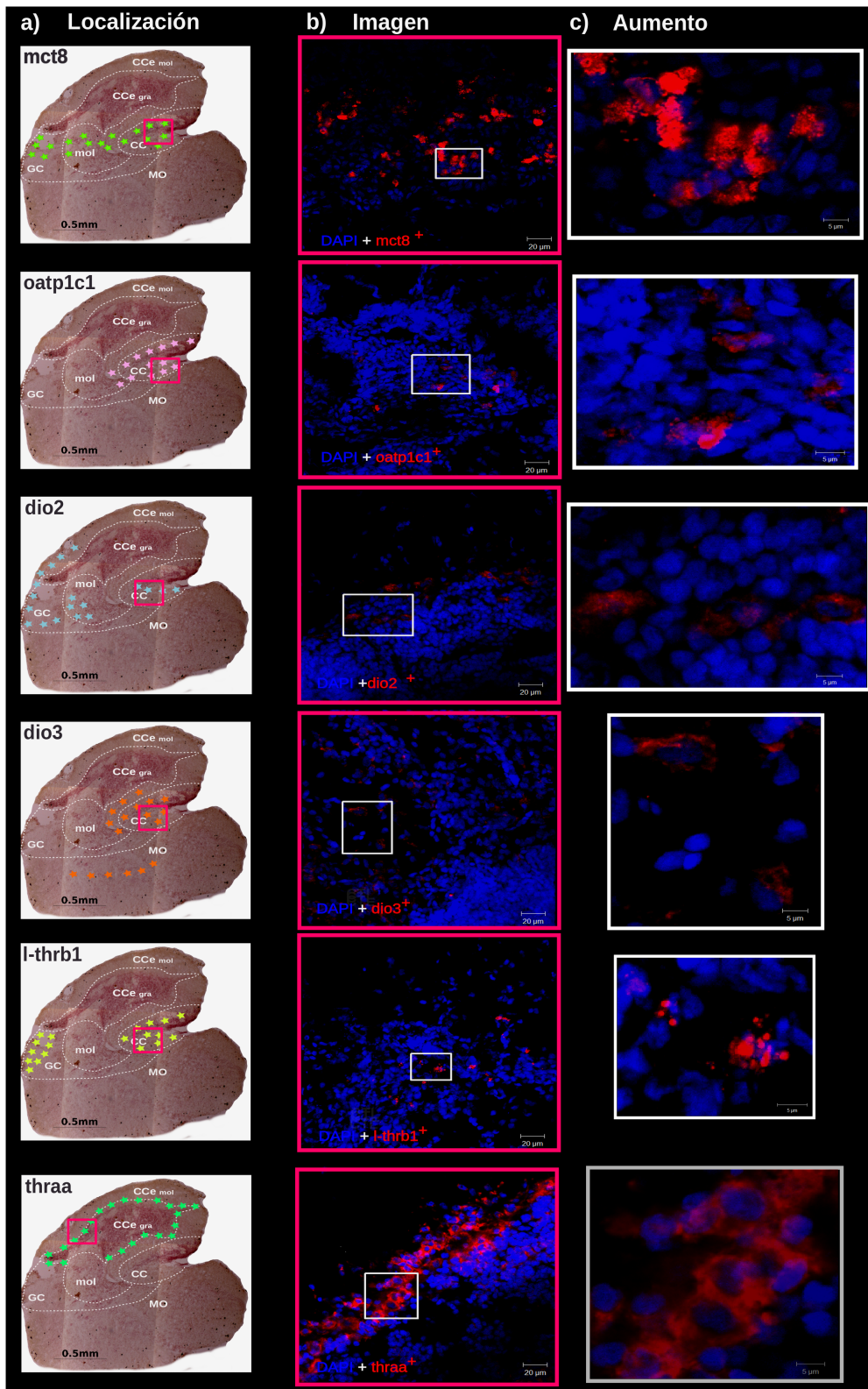


Figura 10. Localización de la expresión del mRNA de los genes involucrados en la función tiroidea por FISH. Cortes sagitales de cerebelo de tilapia que muestran a) la

expresión del mRNA de los genes de interés usando el fluoróforo Cy3 (rojo), los núcleos celulares fueron teñidos con DAPI (azul), b) imágenes en aumento de la sección señalada y c) localización en fotomicrografías, marcando con estrellas el sitio de expresión del mRNA de cada gen.

6.4 Evaluación de los efectos de las hormonas T2 y/o T3 sobre la expresión de genes asociados a la función tiroidea en el cerebelo.

Para realizar esta evaluación, se midió la expresión del mRNA de los genes de interés, de forma cuantitativa por porcentaje de fluorescencia mediante la técnica de FISH y se comparó con los resultados obtenidos previamente en número de moléculas por microgramo total de mRNA usando la RT-qPCR (**Figura 11**), en ausencia y presencia de 10 nM de T2 o 10 nM de T3. Esta figura permite observar que ambas técnicas mostraron comportamientos muy similares en cuanto a la regulación de los genes de interés por la administración de las hormonas. Únicamente en el caso del receptor *thraa* en presencia de T2, no se observó la misma tendencia por ambas técnicas; los resultados mediante FISH no muestran cambios, mientras que los resultados por la RT-qPCR muestran una regulación negativa de este gen por T2. En el caso de los transportadores, *mct8* es regulado a la baja por T3, pero solo muestra una tendencia a disminuir su expresión en presencia de T2; *oatp1c1* está regulado a la baja por T2 y no es regulado en presencia de T3.

Las desyodasas *dio2* fue regulado a la baja por ambas hormonas; sorprendentemente *dio3* en cerebelo no muestra regulación por ninguna de las dos hormonas. En cuanto a los receptores a THs, *l-thrb1* fue regulado a la alta solo por T2 y con *thraa* encontramos resultados discordantes, sin embargo, podemos decir que al menos por la RT-qPCR, este gen está regulado a la baja por T2 y ambas técnicas confirman que está regulado a la baja por T3. Estos datos se encuentran resumidos en la (**Tabla 8**). Resulta sorprendente que la *dio3* no esté regulada por estas hormonas en el cerebelo, y que hay genes regulados específicamente por T2 como *oatp1c1* y *l-thrb1* o de forma más específica por T3 como *mct8* y *thraa* y finalmente genes regulados por ambas hormonas como *dio2*.

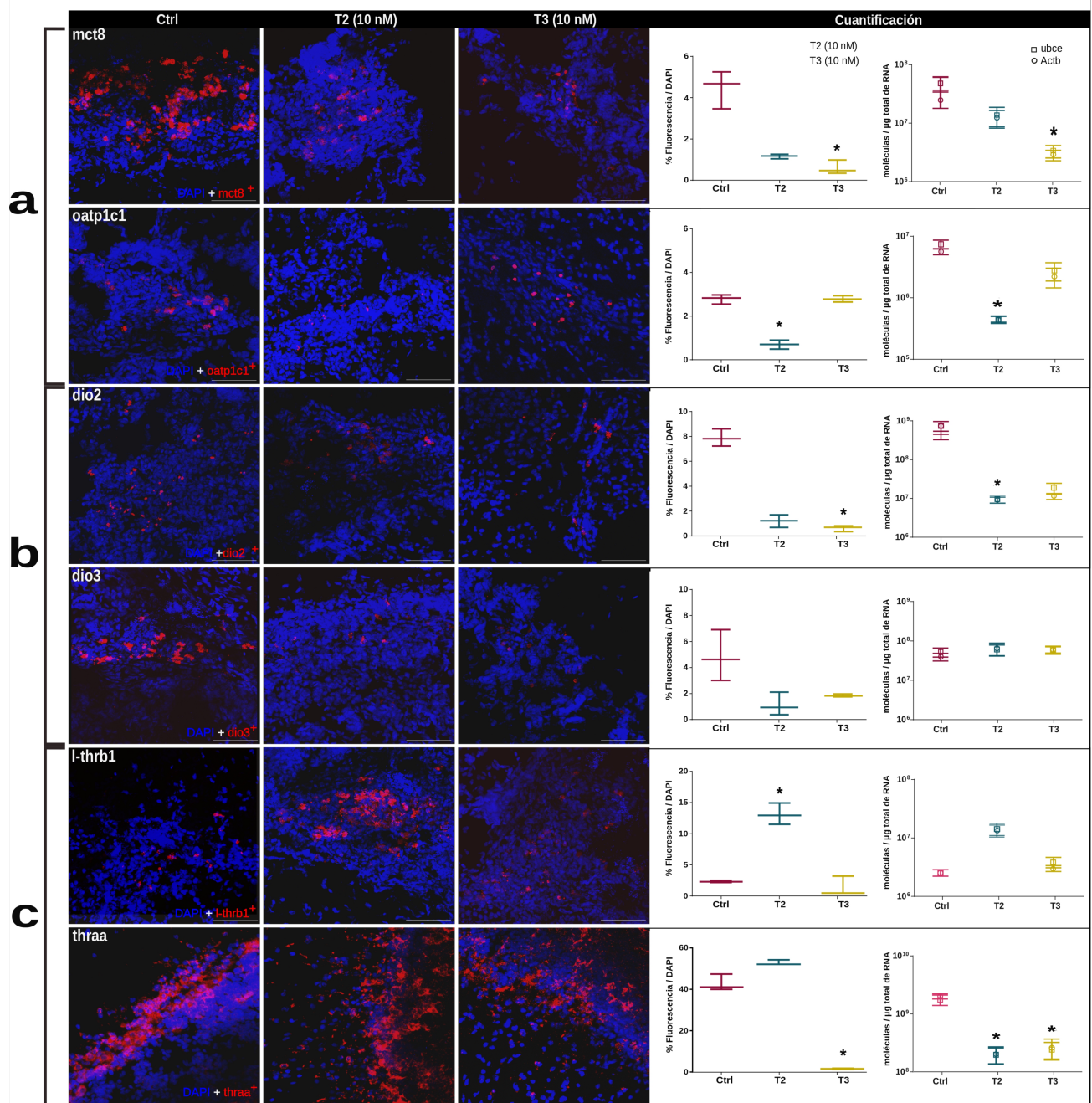


Figura 11. Regulación de la expresión génica mediada por T2 y T3 en el cerebelo de tilapia. En experimentos ex-vivo se cuantificó el mRNA por la técnica de FISH y RT-qPCR. Se agrupó en a) transportadores de THs b) desyodasas y c) receptores de THs. Se muestran en el panel izquierdo imágenes de microscopía confocal tomadas en zonas semejantes de cortes sagitales en situación control o tratados con 10 nM de T2 o T3. Observamos en azul la tinción con DAPI y en rojo el marcaje del mRNA para cada gen. La barra de escala representa 50 μ m. En el panel derecho se muestran las gráficas de cuantificación del mRNA para cada gen por la técnica de FISH en porcentaje de fluorescencia y por la técnica de la RT-qPCR en moléculas por μ g de mRNA total. Para todas las gráficas (* = $p < 0.05$).

Tabla 8. Regulación de la expresión de mRNA por T2 o T3.

	FISH		RT-qPCR	
	T2	T3	T2	T3
mct8	↓	↓	↓	↓
oatp1c1	↓	=	↓	=
dio2	↓	↓	↓	↓
Dio3	=	=	=	=
l-thrb1	↑	=	↑	=
thraa	=	↓	↓	↓

Se muestran los patrones de regulación de cada gen, secundarios a la administración de 10 nM de T2 o T3, medido por la técnica de FISH y RT-qPCR. Regulación a la alta (↑), a la baja (↓) o sin regulación (=). Se marca en rojo los datos que no mostraron la misma tendencia por ambas técnicas.

7. Discusión

En el presente estudio mostramos los efectos de dos THs bioactivas en teléosteos, T3 y T2 sobre la localización y expresión del mRNA de los genes que participan en la función tiroidea del cerebelo en las tilapias juveniles, entre los cuales están los transportadores *oatp1c1* y *mct8*; las desyodasas *dio2* y *dio3*, y los receptores de THs *thraa* y *l-thrb1*. Mientras que es bien conocido que el estado tiroideo es el regulador principal de todos los genes mencionados (Muzzio et al., 2014), no existen a la fecha estudios en donde se relacione la localización de todos estos mensajeros en el cerebelo, ni tampoco su regulación por éstas dos THs bioactivas.

La localización de la expresión de los genes, con la excepción de *thraa* fue predominantemente en la crista cerebelar, que se encuentra en la zona ventro-posterior del cerebelo. Esta región en específico tiene gran relevancia funcional ya que forma parte del tracto cerebelo vestibular (Bae et al., 2009), siendo también, un sitio de irrigación de la vasculatura linfática y un punto de paso sistémico de las hormonas al CNS a través de la BBB (Bae et al., 2009; Okuda et al., 2012). Las diferencias observadas en la localización específica y los niveles de expresión de los genes analizados pueden reflejar un proceso dinámico asociado con escenarios fisiológicos particulares, robusteciendo la idea de que estos cumplen diferentes funciones en el CNS. En apoyo a los anterior, se sabe que en todos los vertebrados estos TRs se expresan en diferentes ventanas de tiempo durante el desarrollo del cerebro (Keijzer et al., 2007; Laudet, 2011; Delbaere et al., 2017).

La co-localización de *mct8* y *oatp1c1* con ambos isotipos de desyodasas y con el *l-thrb1*, muestra una concordancia con la propuesta general de la integración y la respuesta fisiológica de las THs: transporte intracelular, metabolismo (activación/inactivación) y regulación de la expresión de genes TH-dependientes. Sin embargo en otros modelos de vertebrados se ha reportado una localización diferencial de los elementos que participan en la señalización tiroidea. En el caso del pollo, *MCT8* se localiza en las PCs y en núcleos cerebelares, mientras que *MCT10* en las GCs; *LAT1* y *D2* en los capilares y *OATP1C1*, *LAT1* y *D3* en el labio rómbico del plexo coroideo (Delbaere et al., 2015). En ratón se ha mostrado

que la expresión de MCT8 y LAT2 se localiza principalmente en las PCs y en células precursoras granulares, en la corteza cerebelar y en la lámina externa granular (EGL); OATP1C1 en las células endoteliales de los capilares y en oligodendrocitos, MCT10 en oligodendrocitos y LAT1 en las células granulares maduras y células endoteliales de los capilares.

Observamos que la expresión de las desyodasas dio2 y dio3 en el cerebelo es amplia. dio2 se localizó en estructuras anteriores como la gris central y la lámina molecular del cuerpo cerebelar, y en estructuras caudales como la crista cerebelar donde co-localiza con dio3. La expresión de dio3 se identificó en la lámina molecular y la médula espinal. Estos resultados contrastan con la expresión de D2 y D3 en otros modelos. En cerebelo de rata y utilizando la técnica de ISH, se reportó la expresión de D2 en astrocitos y tanicitos de la lámina granular (Guadaño-Ferráz et al., 1997). Reportes en pollos muestran que D3 se localiza en el plexo coroideo (Delbaere et al., 2015) y en murinos en células neuronales (Koibuichi 2008).

Contrario a lo reportado en otros modelos de vertebrados, en tilapia encontramos que la expresión cerebelar de l-thrb1 y thraa no co-localizan. El thraa fue detectado únicamente en la PCL en donde se ubican las células euridentroides y células de Purkinje. Por la citoarquitectura de las células podemos pensar que son ECs; sin embargo, falta dilucidar la naturaleza química del tipo celular para conocer su posible papel efector dependiente del tipo celular. En contraste, la expresión de l-thrb1, además de localizarse en la crista cerebelar junto con todos los otros genes relacionados con la señalización tiroidea (mct8, oatp1c1, dio2 and dio3), también se localiza en la gris central, sugiriendo una función tironino-dependiente en la integración de información en esta estructura cerebelar.

Datos en el pez cebra muestran una amplia distribución de thraa y una localización restringida de thrb1 en ciertos núcleos cerebrales (Vancamp & Darras, 2017). Sin embargo, en murinos, la expresión de THR α es mayor en estadíos juveniles, mostrando que THR α se encuentra muy expresada en estadíos postnatales y va disminuyendo al llegar a estadíos adultos, contrario a THR β 1 que tiene una baja expresión en estadíos postnatales y va

aumentando al llegar a estadios adultos (Faustino & Ortiga-Carvalho, 2014) . Además, se ha reportado que Thra se expresa en procesos tempranos de la formación de OPCs, mientras que el Thrb se expresa de forma tardía y participa durante la maduración y diferenciación de estos precursores (Lee & Petratos, 2016).

En modelos murinos se han reportado ambos tipos de receptores en las células de Purkinje pero solo $THR\alpha$ ha mostrado ser crucial para la función de este tipo celular, participando en procesos celulares activados por T3 como son la diferenciación celular y el crecimiento dendrítico (Heuer & Mason 2003), mientras que en ratones $THR\alpha$ $-/-$ hipotiroideos reemplazados con T3, la activación de $THR\beta 1$ recupera la diferenciación de las PCs, pero no promueve la migración o el crecimiento dendrítico (Morte et al., 2002). Estos datos muestran que la localización y nivel de expresión diferencial de los TRs, cumplen funciones complementarias en el desarrollo, la mielinización y los procesos neurales del cerebelo.

En cuanto a la cuantificación de la expresión del mRNA de los genes ya mencionados, observamos que los valores obtenidos por las técnicas de la qPCR y FISH muestran patrones de expresión comparables, lo cual robustece la solidez de los datos obtenidos. Observamos una mayor expresión de *mct8* con respecto a la de *oatp1c1*. Estos datos son congruentes con el hecho de que *Mct8* se expresa en una mayor diversidad de células (neuronas, Ols, OPCs y células endoteliales), mientras que *Oatp1c1* al menos en el pez, se expresa solo en las células endoteliales (Vancamp & Darras, 2017). La regulación negativa de *mct8* por la exposición a ambas, T3 y T2 puede involucrar un mecanismo de retroalimentación negativo sensible al incremento de la hormona, muy parecido a lo reportado en el CNS en otros vertebrados (Muzzio et al., 2014). De forma notable, encontramos que *oatp1c1* fue regulado solo por concentraciones suprafisiológicas de T2, sugiriendo que esta TH podría ser un sustrato para este transportador en peces; sin embargo, datos concluyentes requerirían de determinar la afinidad de T2 por *Oatp1c1*, dado que se ha descrito que la afinidad de las THs por los distintos transportadores varía según la especie (Bernal 2015). Cabe mencionar que los efectos de altas concentraciones de T2

sobre la regulación de la expresión de *oatp1c1* también podrían ser secundarios a mecanismos inespecíficos o no genómicos desencadenados por el exceso de la TH.

Es bien sabido que son las mismas THs las principales reguladoras de la expresión de las desyodasas y que esta regulación se da tanto a nivel pre-, como post-transcripcional (Orozco et al., 2012). Sin embargo, y contrario a lo previamente reportado en el hígado (Navarrete-Ramírez et al., 2013), observamos que la expresión de *dio3* en el cerebelo no se modificó con la exposición a T3 o T2, reforzando la noción de que la regulación de estas desyodasas es tejido específica. La expresión de *dio2* si fue regulada a la baja por ambas THs, como se ha reportado en otros tejidos (Navarrete-Ramírez et al., 2013), demostrando su crucial importancia en la regulación de la biodisponibilidad celular de las THs.

En cuanto a la expresión de los TRs encontramos, como previamente se reporto en nuestro laboratorio (Mendoza et al., 2013; Navarrete-Ramírez et al., 2013; Orozco et al., 2012), que la expresión de *l-thrb1* está regulado por T2 y no por T3. Esto ha dado la pauta para proponer que T2 es un ligando alterno de este TR. Hemos propuesto que la transactivación de *L-Thrb1* mediada por T2 requiere del inserto de 9 aminoácidos que presenta esta isoforma. El hecho de que T2 regule positivamente la expresión de *l-thrb1* en el hígado y el cerebelo fortalece la hipótesis de que existen vías de señalización alternas a las mediadas por T3. Esta diversidad favorecería la pleyotropía funcional de las THs.

Mientras que la T3 claramente disminuye la expresión de *thraa*, este efecto no es tan evidente con el tratamiento con T2, ya que observamos discrepancias en los resultados obtenidos por las distintas técnicas. Se requieren más estudios para dilucidar esta discrepancia y definir si alguna de estas dos técnicas es más sensible para medir el mRNA. De forma notable, la expresión basal de *thraa* en el cerebelo es significativamente mayor que la de *l-thrb1*. Es plausible que la alta expresión de *thraa* está relacionada con su participación en procesos tempranos del desarrollo del CNS, como se ha descrito para otras especies (Lee & Petratos, 2016); la clara modulación por T3 ha sido descrita en modelos murinos donde T3 activa procesos de diferenciación y arborización dendrítica a través de su unión al $THR\alpha$ (Heuer & Mason, 2003).

Finalmente, el conocimiento de la localización de la expresión y de la regulación de estos genes es de crucial importancia ya que sienta las bases para estudios futuros encaminados a comprender los mecanismos de acción de las THs en sus distintas funciones dentro del CNS. En este contexto, se sabe que las THs participan en procesos de neurogénesis, mielinización, migración celular y establecimiento de las láminas cerebelares en vertebrados (Zada et al., 2016; Kaslin et al., 2013). La desregulación de alguno de los componentes del sistema tiroideo provoca daños profundos en estos procesos que pueden ser irreversibles. Para el correcto desarrollo y mantenimiento de estos procesos es fundamental la participación activa de todos los genes estudiados en esta tesis.

8. Conclusiones

Nuestros resultados muestran que en el tejido cerebelar de tilapia en estadio juvenil, la expresión de los genes que participan en la señalización de las THs se localizan en diferentes estructuras cerebelares y co-localizan en la crista cerebelar. Además, la administración de T3 o T2 regula la expresión de estos genes, sugiriendo que existe un proceso dinámico en cuanto a los roles de T3 y T2 en el CNS, asociados a escenarios fisiológicos particulares.

9. Referencias bibliográficas

- Aagaard, Mads M., Rasmus Siersbæk, & Susanne Mandrup. (2011). Molecular Basis for Gene-Specific Transactivation by Nuclear Receptors. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease* 1812 (8): 824–35. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2010.12.018>.
- Anderson, Grant W. (2008). Thyroid Hormone and Cerebellar Development. no. April: 60–74. <https://doi.org/10.1007/s12311-008-0021-4>.
- Bae, Young Ki, Shuichi Kani, Takashi Shimizu, Koji Tanabe, Hideaki Nojima, Yukiko Kimura, Shin ichi Higashijima, & Masahiko Hibi. (2009). Anatomy of Zebrafish Cerebellum and Screen for Mutations Affecting Its Development. *Developmental Biology* 330 (2): 406–26. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2009.04.013>.
- Bernal, Juan. (2017). Thyroid Hormone Regulated Genes in Cerebral Cortex Development. <https://doi.org/10.1530/JOE-16-0424>.
- Bernal, Juan, Ana Guadaño-Ferraz, & Beatriz Morte. (2015). Thyroid Hormone Transporters-Functions and Clinical Implications. *Nature Reviews Endocrinology* 11 (7): 406–17. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2015.66>.
- Bernal, Juan, . (2015). Thyroid Hormones in Brain Development and Function, 1–86.
- Bianco, Antonio C., Domenico Salvatore, Balázs Gereben, Marla J. Berry, & P. Reed Larsen. (2002). Biochemistry, Cellular and Molecular Biology, and Physiological Roles of the Iodothyronine Selenodeiodinases. *Endocrine Reviews*. <https://doi.org/10.1210/edrv.23.1.0455>.
- Biechl, Daniela, Alessandro Dorigo, Reinhard W Köster, Benedikt Grothe, & Mario F Wullimann. (2016). Eppure Si Muove: Evidence for an External Granular Layer and Possibly Transit Amplification in the Teleostean Cerebellum 10 (May): 1–22. <https://doi.org/10.3389/fnana.2016.00049>.
- Carasatorre, Mariana, Adrian Ochoa-Alvarez, Giovanna Velázquez-Campos, Carlos Lozano-Flores, Sofía Y. Díaz-Cintra, & Víctor Ramírez-Amaya. (2015). Hippocampal Synaptic Expansion Induced by Spatial Experience in Rats Correlates with Improved Information Processing in the Hippocampus. *PLoS ONE* 10 (8): 137944. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0132676>.
- Carvalho, Denise P., & Corinne Dupuy. (2017). Thyroid Hormone Biosynthesis and Release. *Molecular and Cellular Endocrinology* 458 (December): 6–15. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2017.01.038>.

- Darras, Veerle M., Anne M. Houbrechts, & Stijn L.J. Van Herck. (2015). Intracellular Thyroid Hormone Metabolism as a Local Regulator of Nuclear Thyroid Hormone Receptor-Mediated Impact on Vertebrate Development. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms* 1849 (2): 130–41. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2014.05.004>.
- Delbaere, J., Vancamp, P., Van Herck, S. L. J., Bourgeois, N. M. A., Green, M. J., Wingate, R. J. T., & Darras, V. M. (2017). MCT8 deficiency in Purkinje cells disrupts embryonic chicken cerebellar development. *Journal of Endocrinology*, 232(2), 259–272. <https://doi.org/10.1530/JOE-16-0323>
- Faustino, L. C., & Ortiga-Carvalho, T. M. (2014). Thyroid hormone role on cerebellar development and maintenance: a perspective based on transgenic mouse models. 5(May), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fendo.2014.00075>
- Friesema, E. C.H., R. Docter, E. P.C.M. Moerings, F. Verrey, E. P. Krenning, G. Hennemann, & T. J. Visser. (2001). Thyroid Hormone Transport by the Heterodimeric Human System L Amino Acid Transporter. *Endocrinology* 142 (10): 4339–48. <https://doi.org/10.1210/endo.142.10.8418>.
- Friesema, Edith C.H., Jurgen Jansen, Carmelina Milici, & Theo J. Visser. (2005). Thyroid Hormone Transporters. *Vitamins and Hormones* 70: 137–67. [https://doi.org/10.1016/S0083-6729\(05\)70005-4](https://doi.org/10.1016/S0083-6729(05)70005-4).
- Fröhlich, Eleonore, & Richard Wahl. (2018). *Frontiers in Neuroendocrinology The Forgotten Effects of Thyrotropin-Releasing Hormone: Metabolic Functions and Medical Applications*, no. April. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2018.06.006>.
- García-G, C., L. López-Bojorquez, J. Nuñez, C. Valverde-R, & A. Orozco. (2007). 3,5-Diiodothyronine in Vivo Maintains Euthyroidal Expression of Type 2 Iodothyronine Deiodinase, Growth Hormone, and Thyroid Hormone Receptor B1 in the Killifish. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology* 293 (2): 877–83. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00101.2007>.
- Gereben, Balázs, Ann Marie Zavacki, Scott Ribich, Brian W. Kim, Stephen A. Huang, Warner S. Simonides, Anikó Zeöld, & Antonio C. Bianco. (2008). Cellular and Molecular Basis of Deiodinase-Regulated Thyroid Hormone Signaling. *Endocrine Reviews* 29 (7): 898–938. <https://doi.org/10.1210/er.2008-0019>.
- Grøntved, Lars, Joshua J. Waterfall, Dong Wook Kim, Songjoon Baek, Myong Hee Sung, Li Zhao, Jeong Won Park, et al. (2015). Transcriptional Activation by the Thyroid Hormone Receptor through Ligand-Dependent Receptor Recruitment and Chromatin Remodelling. *Nature Communications* 6. <https://doi.org/10.1038/ncomms8048>.

- Guadano-Ferraz, A., Obregon, M. J., Germain, D. L. S., & Bernal, J. (1997). The type 2 iodothyronine deiodinase is expressed primarily in glial cells in the neonatal rat brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(19), 10391–10396. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.19.10391>
- Hagenbuch, Bruno. (2007). Cellular Entry of Thyroid Hormones by Organic Anion Transporting Polypeptides. *Best Practice and Research in Clinical Endocrinology and Metabolism* 21 (2): 209–21. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2007.03.004>.
- Hernández-Puga, Gabriela, Arturo Mendoza, & Alfonso León-del-río. (2017). Jab1 Is a T 2 -Dependent Coactivator or a T 3 -Dependent Corepressor of TRB1-Mediated Gene Regulation. <https://doi.org/10.1530/JOE-16-0485>.
- Heuer, Heike. (2007). The Importance of Thyroid Hormone Transporters for Brain Development and Function 21 (2): 265–76. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2007.03.003>.
- Heuer, H., & Mason, C. A. (2003). Thyroid Hormone Induces Cerebellar Purkinje Cell Dendritic Development via the Thyroid Hormone Receptor $\alpha 1$. *Journal of Neuroscience*, 23(33), 10604–10612. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.23-33-10604.2003>
- Hibi, Masahiko, Koji Matsuda, Miki Takeuchi, Takashi Shimizu, & Yasunori Murakami. (2017). Evolutionary Mechanisms That Generate Morphology and Neural-Circuit Diversity of the Cerebellum. *Development Growth and Differentiation* 59 (4): 228–43. <https://doi.org/10.1111/dgd.12349>.
- Holzer, Guillaume, Natacha Roux, & Vincent Laudet. (2017). Evolution of Ligands, Receptors and Metabolizing Enzymes of Thyroid Signaling. *Molecular and Cellular Endocrinology* 459: 5–13. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2017.03.021>.
- Imura, Kosuke, Naoyuki Yamamoto, Masami Yoshimoto, Masato Endo, Kengo Funakoshi, & Hironobu Ito. (2017). Fiber Connections of the Caudal Corpus Cerebelli, with Special Reference to the Intrinsic Circuitry, in a Teleost (*Oreochromis Niloticus*). *Brain, Behavior and Evolution* 89 (1): 15–32. <https://doi.org/10.1159/000455962>.
- Ito, Hironobu, Yuji Ishikawa, Masami Yoshimoto, & Naoyuki Yamamoto. (2007). Diversity of Brain Morphology in Teleosts: Brain and Ecological Niche. *Brain, Behavior and Evolution* 69 (2): 76–86. <https://doi.org/10.1159/000095196>.
- Jung, Seung Hyun, Suhyun Kim, Ah Young Chung, Hyun Taek Kim, Ju Hoon So, Jaeho Ryu, Hae Chul Park, & Cheol Hee Kim. (2010). Visualization of Myelination in GFP-Transgenic Zebrafish. *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists* 239 (2): 592–97. <https://doi.org/10.1002/dvdy.22166>.

- Kapoor, Richa, Sashaina E. Fanibunda, Lynette A. Desouza, Suman K. Guha, & Vidita A. Vaidya. (2015). Perspectives on Thyroid Hormone Action in Adult Neurogenesis. *Journal of Neurochemistry*. Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/jnc.13093>.
- Kaslin, Jan, Volker Kroehne, Francesca Benato, Francesco Argenton, & Michael Brand. (2013). Development and Specification of Cerebellar Stem and Progenitor Cells in Zebrafish: From Embryo to Adult Development and Specification of Cerebellar Stem and Progenitor Cells in Zebrafish: From Embryo to Adult. *Neural Development* 8 (1): 1. <https://doi.org/10.1186/1749-8104-8-9>.
- Keijzer, R., Blommaert, P., Labruyère, W., Vermeulen, J., Doulabi, B., Bakker, O., Tibboel, D., & Lamers, W. (2007). Expression of thyroid hormone receptors A and B in developing rat tissues; evidence for extensive posttranscriptional regulation. *Journal of Molecular Endocrinology*, 38(5), 523-535. Retrieved Mar 2, 2021, from <https://jme.bioscientifica.com/view/journals/jme/38/5/0380523.xml>
- Kinne, Anita, Gunnar Kleinau, Carolin S. Hoefig, Annette Grüters, Josef Köhrle, Gerd Krause, & Ulrich Schweizer. (2010). Essential Molecular Determinants for Thyroid Hormone Transport and First Structural Implications for Monocarboxylate Transporter 8. *Journal of Biological Chemistry* 285 (36): 28054–63. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.129577>.
- Kinne, Anita, Ralf Schüle, & Gerd Krause. (2011). Primary and Secondary Thyroid Hormone Transporters. *Thyroid Research* 4 (Suppl 1): S7. <https://doi.org/10.1186/1756-6614-4-S1-S7>.
- Koibuchi, Noriyuki, & William W. Chin. (2000). Thyroid Hormone Action and Brain Development. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 11 (4): 123–28. [https://doi.org/10.1016/S1043-2760\(00\)00238-1](https://doi.org/10.1016/S1043-2760(00)00238-1).
- Laudet, V. (2011). The origins and evolution of vertebrate metamorphosis. *Current Biology*, 21(18), R726–R737. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.07.030>
- Lazcano, Iván, Roberto Rodríguez-Ortiz, Patricia Villalobos, Ataúlfo Martínez-Torres, Juan Carlos Solís-Saíenz, & Aurea Orozco. (2019). Knock-down of Specific Thyroid Hormone Receptor Isoforms Impairs Body Plan Development in Zebrafish. *Frontiers in Endocrinology* 10 (MAR): 1–13. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00156>.
- Lee, Jae Young, & Steven Petratos. (2016). Thyroid Hormone Signaling in Oligodendrocytes: From Extracellular Transport to Intracellular Signal. *Molecular Neurobiology* 53 (9): 6568–83. <https://doi.org/10.1007/s12035-016-0013-1>.

- Lietzow, Julika, Janine Golchert, Georg Homuth, Uwe Völker, Wenke Jonas, & Josef Köhrle. (2016). 3,5-T₂ Alters Murine Genes Relevant for Xenobiotic, Steroid, and Thyroid Hormone Metabolism. *Journal of Molecular Endocrinology* 56 (4): 311–23. <https://doi.org/10.1530/JME-15-0159>.
- Marelli, Federica, Silvia Carra, Giuditta Rurale, Franco Cotelli, & Luca Persani. (2017). *In Vivo* Functional Consequences of Human *THRA* Variants Expressed in the Zebrafish. *Thyroid* 27 (2): 279–91. <https://doi.org/10.1089/thy.2016.0373>.
- McLean, Thomas R., Michelle M. Rank, Peter M. Smooker, & Samantha J. Richardson. (2017). Evolution of Thyroid Hormone Distributor Proteins. *Molecular and Cellular Endocrinology* 459: 43–52. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2017.02.038>.
- Mendoza, A., P. Navarrete-Ramírez, G. Hernández-Puga, P. Villalobos, G. Holzer, J. P. Renaud, V. Laudet, & A. Orozco. (2013). 3,5-T₂ Is an Alternative Ligand for the Thyroid Hormone Receptor B1. *Endocrinology* 154 (8): 2948–58. <https://doi.org/10.1210/en.2013-1030>.
- Mondal, Santanu, Karuppusamy Raja, Ulrich Schweizer, & Govindasamy Mugesh. (2016). Chemistry and Biology in the Biosynthesis and Action of Thyroid Hormones *Angewandte Reviews*, 2–27. <https://doi.org/10.1002/anie.201601116>.
- Moreno, Maria, Antonia Giacco, Celia Di Munno, & Fernando Goglia. (2017). Molecular and Cellular Endocrinology Direct and Rapid Effects of 3, 5-Diiodo-L-Thyronine (T₂). *Molecular and Cellular Endocrinology* 458: 121–26. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2017.02.012>.
- Morte, B., Manzano, J., Scanlan, T., Vennström, B., & Bernal, J. (2002). Deletion of the thyroid hormone receptor α 1 prevents the structural alterations of the cerebellum induced by hypothyroidism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(6), 3985–3989. <https://doi.org/10.1073/pnas.062413299>
- Moscarello, Mario A., D. Denise Wood, Cameron Ackerley, & Christos Boulias. (1994). Myelin in Multiple Sclerosis Is Developmentally Immature. *Journal of Clinical Investigation* 94 (1): 146–54. <https://doi.org/10.1172/JCI117300>.
- Müller, J., & Heuer, H. (2014). Expression pattern of thyroid hormone transporters in the postnatal mouse brain. *Frontiers in Endocrinology*, 5(JUN), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fendo.2014.00092>

- Muzzio, Amanda M., Pamela D. Noyes, Heather M. Stapleton, & Sean C. Lema. (2014). Tissue Distribution and Thyroid Hormone Effects on mRNA Abundance for Membrane Transporters Mct8, Mct10, and Organic Anion-Transporting Polypeptides (Oatps) in a Teleost Fish. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology* 167: 77–89. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2013.09.019>.
- Navarrete-Ramírez, Pamela, Maricela Luna, Carlos Valverde-R, & Aurea Orozco. (2013). 3,5-Di-Iodothyronine Stimulates Tilapia Growth Through an Alternate Isoform of Thyroid Hormone Receptor B1. *Journal of Molecular Endocrinology* 52 (1): 1–9. <https://doi.org/10.1530/JME-13-0145>.
- Okuda, K. S., J. W. Astin, J. P. Misa, M. V. Flores, K. E. Crosier, & P. S. Crosier. (2012). Lyve1 Expression Reveals Novel Lymphatic Vessels and New Mechanisms for Lymphatic Vessel Development in Zebrafish. *Development* 139 (13): 2381–91. <https://doi.org/10.1242/dev.077701>.
- Olvera, A, C J Martyniuk, N Buisine, L M Sachs, & A Orozco. (2017). Differential Transcriptome in Brain and Liver Uncovers Novel Roles for Thyroid Hormones in Tilapia, no. May: 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-14913-9>.
- Orozco, Aurea, Iván Lazcano, Gabriela Hernández-Puga, & Aurora Olvera. (2017). Non-Mammalian Models Reveal the Role of Alternative Ligands for Thyroid Hormone Receptors. *Molecular and Cellular Endocrinology* 459: 59–63. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2017.03.003>.
- Orozco, Aurea, & Carlos Valverde-R. (2005). Thyroid Hormone Deiodination in Fish. *Thyroid* 15 (8): 799–813. <https://doi.org/10.1089/thy.2005.15.799>.
- Orozco, Aurea, R. Carlos Valverde, Aurora Olvera, & G. Carlota García. (2012). Iodothyronine Deiodinases: A Functional and Evolutionary Perspective. *Journal of Endocrinology* 215 (2): 207–19. <https://doi.org/10.1530/JOE-12-0258>.
- Préau, Laetitia, Jean Baptiste Fini, Ghislaine Morvan-Dubois, & Barbara Demeneix. (2015). Thyroid Hormone Signaling during Early Neurogenesis and Its Significance as a Vulnerable Window for Endocrine Disruption. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.bbagrm.2014.06.015>.
- Refetoff, Samuel, & Alexandra M Dumitrescu. (2007). Syndromes of Reduced Sensitivity to Thyroid Hormone: Genetic Defects in Hormone Receptors , Cell Transporters and Deiodination 21 (2): 277–305. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2007.03.005>.
- Rodríguez, F., E. Durán, A. Gómez, F. M. Ocaña, E. Álvarez, F. Jiménez-Moya, C. Broglio, & C. Salas. (2005). Cognitive and Emotional Functions of the Teleost Fish Cerebellum. In *Brain Research Bulletin*, 66:365–70. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2004.11.026>.

- Sánchez-Villagra, Marcelo R., & Fahad Sultan. (2002). The Cerebellum at Birth in Therian Mammals, with Special Reference to Rodents. *Brain, Behavior and Evolution* 59 (3): 101–13. <https://doi.org/10.1159/000064158>.
- Schwartz, Charles E, & Roger E Stevenson. (2007). The MCT8 Thyroid Hormone Transporter and Allan – Herndon – Dudley Syndrome 21 (2): 307–21. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2007.03.009>.
- Schweizer, Ulrich, & Dorothea Bayer. (2014). Structure and Function of Thyroid, 143–53. <https://doi.org/10.1159/000367858>.
- Simões, José M., Magda C. Teles, Rui F. Oliveira, Annemie van der Linden, & Marleen Verhoye. (2012). A Three-Dimensional Stereotaxic MRI Brain Atlas of the Cichlid Fish *Oreochromis Mossambicus*. *PLoS ONE* 7 (9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044086>.
- Solís, Juan Carlos, Aurea Orozco, Carlota García, Ludivina Robles-osorio, & Carlos Valverde. (2011). Bioactividad de Las Hormonas Tiroideas . Importancia Clínica de Los Transportadores de Membrana , de Las Desyodasas y de Los Receptores Nucleares 63: 287–308.
- Sugiyama, Yuichi. (2004). Involvement of Multispecific Organic Anion Transporter , Oatp14 (Slc21a14), in the Transport of Thyroxine Across 145 (9): 4384–91. <https://doi.org/10.1210/en.2004-0058>.
- Takeuchi, Miki, Koji Matsuda, Shingo Yamaguchi, Kazuhide Asakawa, Nobuhiko Miyasaka, Pradeep Lal, Yoshihiro Yoshihara, et al. (2015). Establishment of Gal4 Transgenic Zebrafish Lines for Analysis of Development of Cerebellar Neural Circuitry. *Developmental Biology* 397 (1): 1–17. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2014.09.030>.
- Taylor, Peter M, & James W A Ritchie. (2007). Tissue Uptake of Thyroid Hormone by Amino Acid Transporters 21 (2): 237–51. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2007.03.002>.
- Teles, Magda C., Ruxandra F. Sîrbulescu, Ursula M. Wellbrock, Rui F. Oliveira, & Günther K.H. Zupanc. (2012a). Adult Neurogenesis in the Brain of the Mozambique Tilapia, *Oreochromis Mossambicus*. *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology* 198 (6): 427–49. <https://doi.org/10.1007/s00359-012-0721-6>.
- Vancamp, Pieter, & Veerle M Darras. (2017). General and Comparative Endocrinology From Zebrafish to Human: A Comparative Approach to Elucidate the Role of the Thyroid Hormone Transporter MCT8 during Brain Development. *General and Comparative Endocrinology*. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2017.11.023>.

- Vatine, Gad David, David Zada, Tali Lerer-goldshtein, Adi Tovin, Guy Malkinson, & Karina Yaniv. (2013). Zebrafish as a Model for Monocarboxyl Transporter 288 (1): 169–80. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.413831>.
- Vella, Kristen R., & Anthony N. Hollenberg. (2017). The Actions of Thyroid Hormone Signaling in the Nucleus. *Molecular and Cellular Endocrinology*. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2017.03.001>.
- Vergauwen, Lucia, Jenna E Cavallin, Gerald T Ankley, Chloé Bars, Isabelle J Gabriëls, Ellen D G Michiels, Krysta R Fitzpatrick, et al. (2018). General and Comparative Endocrinology Gene Transcription Ontogeny of Hypothalamic-Pituitary-Thyroid Axis Development in Early-Life Stage Fathead Minnow and Zebra Fi Sh. *General and Comparative Endocrinology*, no. March: 0–1. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2018.05.001>.
- Visser, W. Edward, Edith C. H. Friesema, & Theo J. Visser. (2011). Minireview: Thyroid Hormone Transporters: The Knowns and the Unknowns. *Molecular Endocrinology* 25 (1): 1–14. <https://doi.org/10.1210/me.2010-0095>.
- Visser, W. Edward, Edith C H Friesema, Jurgen Jansen, & Theo J. Visser. (2008). Thyroid Hormone Transport in and out of Cells. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 19 (2): 50–56. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2007.11.003>.
- Zada, David, Einat Blitz, & Lior Appelbaum. (2017). Zebrafish – An Emerging Model to Explore Thyroid Hormone Transporters and Psychomotor Retardation. *Molecular and Cellular Endocrinology* 459: 53–58. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2017.03.004>.
- Zada, David, Adi Tovin, Tali Lerer-Goldshtein, & Lior Appelbaum. (2016). Pharmacological Treatment and BBB-Targeted Genetic Therapy for MCT8-Dependent Hypomyelination in Zebrafish. *DMM Disease Models and Mechanisms* 9 (11): 1339–48. <https://doi.org/10.1242/dmm.027227>.
- Zada, David, Adi Tovin, Tali Lerer-goldshtein, Lior Appelbaum, Einat Blitz, Lior Appelbaum, P D F Studio, et al. (2016). Angiogenesis in Zebrafish. *Handbook of the Cerebellum and Cerebellar Disorders* 459 (1): 106–14. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-1333-8>.
- Zada, David, Adi Tovin, Tali Lerer-goldshtein, Gad David Vatine, & Lior Appelbaum. (2014). Altered Behavioral Performance and Live Imaging of Circuit-Specific Neural Deficiencies in a Zebrafish Model for Psychomotor Retardation 10 (9). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004615>.

- Zada, David, Adi Tovim, Tali Lerer-goldshtein, Gad David Vatine, Lior Appelbaum, Almira Vazdarjanova, John F Guzowski, et al. (2014). Molecular Aspects of Thyroid Hormone Transporters, Including MCT8, MCT10, and OATPs, and the Effects of Genetic Variation in These Transporters. *General and Comparative Endocrinology* 167 (2): 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2015.02.021>.
- Zevenbergen, Chantal, Simone Kersseboom, Veerle M. Darras, Theo J. Visser, Xuan Yao, Hongfeng Xia, Yu-cheng Yuan Wang, et al. (2015). HHS Public Access. *General and Comparative Endocrinology* 4 (1): 228–43. <https://doi.org/10.1111/dgd.12349>.
- Zhang, Mao, Ziyi Ma, Haochen Qin, & Zhongxiang Yao. (2016). Thyroid Hormone Potentially Benefits Multiple Sclerosis via Facilitating Remyelination. *Molecular Neurobiology* 53 (7): 4406–16. <https://doi.org/10.1007/s12035-015-9375-z>.
- Zhang, Mao, Xiao L. Zhan, Zi Y. Ma, Xing S. Chen, Qi Y. Cai, & Zhong X. Yao. (2015). Thyroid Hormone Alleviates Demyelination Induced by Cuprizone through Its Role in Remyelination during the Remission Period. *Experimental Biology and Medicine* 240 (9): 1183–96. <https://doi.org/10.1177/1535370214565975>.
- Zupanc, G. K.H. (2006). Neurogenesis and Neuronal Regeneration in the Adult Fish Brain. *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology* 192 (6): 649–70. <https://doi.org/10.1007/s00359-006-0104-y>.
- Zupanc, G. K H, Ingrid Horschke, Regina Ott, & Gesa B. Rascher. (1996). Postembryonic Development of the Cerebellum in Gymnotiform Fish. *Journal of Comparative Neurology* 370 (4): 443–64. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(19960708\)370:4<443::AID-CNE3>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19960708)370:4<443::AID-CNE3>3.0.CO;2-4).
- Zupanc, G.K.H., R.F. Sîrbulescu, & I. Ilieş. (2012). Radial Glia in the Cerebellum of Adult Teleost Fish: Implications for the Guidance of Migrating New Neurons. *Neuroscience* 210: 416–30. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROSCIENCE.2012.03.012>.

Índice de figuras y tablas

Figura 1	Esquemas representativos de la expresión de los THTTs en el CNS en diferentes vertebrados
Figura 2	Esquema del metabolismo de las THs
Figura 3	Diversidad morfológica del cerebelo en diferentes especies
Figura 4	Esquema representativo de los tipos celulares, sus conexiones y la localización espacial dentro del cerebelo
Figura 5	Esquema general de los circuitos de entrada, integración y salida de información en el cerebelo
Figura 6	Neurogénesis en el cerebelo de peces
Figura 7	Histología del cerebelo de la tilapia juvenil
Figura 8	Patrón de expresión cerebelar de los genes involucrados en la función tiroidea en respuesta a distintas concentraciones de T2 y T3
Figura 9	Determinación de la especificidad de las sondas para FISH
Figura 10	Localización de la expresión del mRNA de genes involucrados en la función tiroidea por FISH.
Figura 11	Regulación de la expresión génica mediada por T2 y T3 en el cerebelo de tilapia.
Tabla 1	Estructura general de yodoaminoácidos
Tabla 2	Características generales de las proteínas de distribución específica unidas a THs
Tabla 3	Transportadores de las THs presentes en CNS y su Km
Tabla 4	Tipos celulares localizadas en el cerebelo y sus características.
Tabla 5	Características de los oligonucleótidos utilizados para la qPCR
Tabla 6	Características de las sondas
Tabla 7	Abundancia [(+) baja, (++) media, (+++) alta, (-) ausencia], del mRNA de los genes de interés en cada estructura que conforma al cerebelo
Tabla 8	Regulación de la expresión de mRNA por T2 o T3

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

3,5-T2 and 3,3',5-T3 Regulate Cerebellar Thyroid Hormone Signalling and Myelin Molecular Dynamics in Tilapia

Y. Hernández-Linares, A. Olvera, P. Villalobos, C. Lozano-Flores, A. Varela-Echavarría, M. Luna & A. Orozco 

Received: 10 October 2018
Accepted: 27 April 2019
Published online: 14 May 2019

In contrast to mammalian adults, myelination in teleosts occurs throughout their lifespan and most of the progenitor cells are originated in the cerebellum. To understand the role that thyroid hormones (THs) play in juvenile cerebellar myelination in teleosts, we identified and localised the expression of genes involved in TH signalling (*mct8*, *oatp1c1*, *dio2*, *dio3*, *thraa* and *l-thrb1*) and analysed the effects of the two bioactive THs, T2 and T3, upon their regulation, as well as upon some structural components of the myelination process. *Ex vivo* approaches using organotypic cerebellar cultures followed by FISH and qPCR showed gene-specific localisation and regulation of TH signalling genes in the cerebellar nuclei. *In vivo* approaches using methimazole (MMI)-treated juvenile tilapias replaced with low doses of T3 and T2 showed by immunofluorescence that myelin fibres in the cerebellum are more abundant in the granular layer and that their visible size is reduced after MMI treatment but partially restored with TH replacement, suggesting that low doses of TH promote the re-myelination process in an altered condition. Together, our data support the idea that T2 and T3 promote myelination via different pathways and prompt T2 as a target for further analysis as a promising therapy for hypomyelination.

Thyroid hormones (THs) are key endocrine messengers that exert their actions mainly by binding to their nuclear receptors (TRs) to regulate gene expression. To this end, three functional events need to occur: (1) TH transport to the target cell, mediated by two proteins, the organic anion transporter polypeptide type C1 (OATP1C1) and the monocarboxylate transporter type 8 (MCT8)^{1–3}; (2) the tissue-specific activation/inactivation of the pro-hormone thyroxine (T4) to either the bioactive 3,3',5-triiodothyronine (T3) or the inactive rT3 catalysed by deiodinases D2 and D3, respectively⁴; and (3) the binding of T3 to the TR to regulate transcription of target genes⁵. Aside from T3, 3,5-diiiodothyronine (T2), a by-product of T3 outer-ring deiodination, is another relevant transcriptional modulator^{6–9}. Indeed, T2 has been shown to bind to and activate at least both the human TR β 1 and a long isoform of a teleostean TR β 1 (L-TR β 1), which contains a 9 amino acid insert within the ligand binding domain that is primarily activated by T2^{6–9}.

THs are crucial for myelination in all vertebrates¹⁰. Development, establishment and maintenance of myelin cytoarchitecture require a tight modulation of TH, and slight defects in the processes could affect the entire system, leading to severe neuropathy¹¹. In fact, THs and other thyroid axis components like TRH have been proposed as promising treatments for pathologies, such as multiple sclerosis, due to their effects upon remyelination^{12,13}. The cerebellum is a well-established centre of control and coordination of movements. THs are also key for mammalian cerebellar development, where perinatal hypothyroidism severely affects oligodendrocyte (OL) differentiation and myelination, synaptic connections among cerebellar neurons and the density of afferent neuronal fibres^{14,15}. Myelination in more advanced stages of vertebrate ontogeny have been poorly explored, partly because the oligodendrocyte progenitor cells (OPCs) in adults are highly restricted to certain proliferative zones, like the subventricular zone (SVZ) and subgranular zone (SGZ)¹⁶, as well as the cerebellum. In contrast, teleosts exhibit several proliferative zones within the central nervous system (CNS) throughout their lifespan¹⁷ and the localisation of stem cell niches is conserved among different species, with most progenitor cells originating from the

Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Querétaro, QC, Mexico. Y. Hernández-Linares and A. Olvera contributed equally. Correspondence and requests for materials should be addressed to A.O. (email: aureao@unam.mx)

cerebellum^{18,19}. Teleost continuous neurogenesis is explained by the persistence of the radial glia beyond early development²⁰. In particular, during the juvenile stage, a window of action for TH agonists and antagonists has been shown to compromise cerebellar physiological processes (connections, dendritic arborization, persistent myelination, among others)¹⁵. Thus, the juvenile teleost cerebellum is an excellent model system to study TH actions upon myelination processes in non-developing vertebrates²⁰.

The mechanisms of TH regulation in the cerebellum remain unclear; however, we recently described two different gene populations associated with myelination and development regulated either by T2 or T3 in juvenile tilapia cerebellum, suggesting that these two hormones could elicit specific and non-redundant functions in this tissue⁹. As an initial approach to understand the role that THs play in juvenile cerebellar myelination in teleosts, in the present work we identified and localised the expression of genes involved in TH signalling and analysed the effects of the two bioactive THs, T2 and T3, upon their regulation. In parallel, we explored the regulatory effect of these hormones on some structural components of the myelination process.

Results

T3 and T2 regulate the expression of genes associated with thyroid function in the cerebellum.

To investigate if the three sets of genes involved in TH action (transporters, deiodinases and receptors) were expressed in the teleost cerebellum, as well as their possible regulation by THs, organotypic cerebellum cultures were exposed to different T2 and T3 concentrations, and RT-qPCR analysis was used to quantify gene expression. Both TH transporters were expressed and down-regulated by THs (Supplementary Fig. S1a). However, while *mct8* expression was repressed in all TH concentrations tested, *oatp1c1* down-regulation was significant at high T2 concentrations. Surprisingly, *dio3* expression was not regulated by any treatment, but *dio2* was down-regulated by both T2 and T3 (Supplementary Fig. S1b). As previously observed, *l-thrb1* was only up-regulated by T2, while *thraa* was down-regulated by both hormones (Supplementary Fig. S1c). With these results we identified that the exposure of cerebellar organotypic cultures to 10 nM of either hormone elicited significant changes in the regulation of the analysed genes.

Expression of genes associated with thyroid function are differentially localised in the cerebellum.

Slices of cerebella exposed to 10 nM T2 and T3 were analysed by using the FISH technique to identify the expression of all three sets involved in TH action. Confocal images of sagittal sections allowed the identification of cerebellar nuclei-specific expression of the different genes. Results are shown in Fig. 1 and Supplementary Fig. S2. *mct8* is expressed in the grey central and co-localises with *oatp1c1* in the crista cerebellaris and molecular layer (Fig. 1a,f). Both deiodinases (*dio2* and *dio3*) are expressed in the crista cerebellaris; additionally, *dio2* expression was identified in the grey central and *dio3* in the molecular layer and medulla oblongata (Fig. 1b,f). TR genes did not co-localise; *l-thrb1* was expressed in grey central, molecular layer and crista cerebellaris, whereas *thraa* was abundantly expressed in the peripheral granular layer of the corpus cerebelli, where Purkinje cells are located (Fig. 1c,f). The analysis of the expression of the different genes after T3 or T2 treatments by FISH showed the same regulatory pattern as observed in the analysis by RT-qPCR (Fig. 1e). However, FISH allowed the observation of TH regulatory response after an acute treatment.

T3 and T2 regulate the expression of genes related to myelination in the cerebellum.

To assess the involvement of T3 and T2 in cerebellar myelination, we went back to the *in vivo* model and treated juvenile tilapias with MMI to partially block TH synthesis with or without co-administration of T2, T3 or a combination of T2 + T3 in sub-physiological and equimolar doses (1 nM) for 30 days. In contrast to the observations in cerebellar organotypic cultures (Supplementary Fig. S1), genes involved in TH signalling in the *in vivo* experiments were not significantly altered after 1 nM of TH treatment for one month (Supplementary Fig. S3). However, the expression of the genes *olig2* and *sox10*, as well as *mbp*, *p0* and *plp1b*, described as oligodendrocyte precursor cells (OPCs) and mature oligodendrocyte markers, respectively²¹, was modulated in a TH-specific manner by T3 and T2 (Fig. 2). Cerebellar expression of *plp1b* was up-regulated by T2 + T3; *p0* was up-regulated after MMI and MMI + T2, suggesting that only T3 restored control expression of this gene; T2 restored *mbp* expression when compared to MMI-treated groups; *sox10* expression was up-regulated by T3, and only T2 restored control expression of *olig2* after MMI treatment.

Two genes that participate in the mammalian myelination process were previously identified in the tilapia cerebellum transcriptome: *tankyrase* (*tnks*) and *GlialCAM*. These genes were differentially regulated by T2 and T3, respectively⁹. As seen in Fig. 2, under the experimental conditions used for the present work, *GlialCAM* expression was up-regulated after MMI treatment, and co-administration of T2, T3 or T2 + T3 restored mRNA levels to those of non-treated controls. *tnks* expression, however, was up-regulated only in the hypothyroid group co-treated with T2 + T3.

Thyroid status alters the diameter of myelin fibres in the cerebellum.

The tilapia cerebellum consists of 3 major layers: the granular layer, the Purkinje cell layer and the molecular layer, resembling a single folium of the convoluted mammalian cerebellum (Fig. 3a). As seen through two distinct myelin staining techniques (Fig. 3b,c), and further confirmed by immunofluorescence (Fig. 3d), myelin fibres are more abundant in the granular layer, where cell density is also higher. We measured myelin fibre diameters in the granular layer in order to analyse myelination in response to thyroid status (Fig. 3e–j). Myelin fibre diameters were reduced after one month of MMI treatment and partially restored with TH replacement, suggesting that TH treatment in low doses promotes re-myelination in an altered condition (Fig. 3j; Supplementary Video S7).

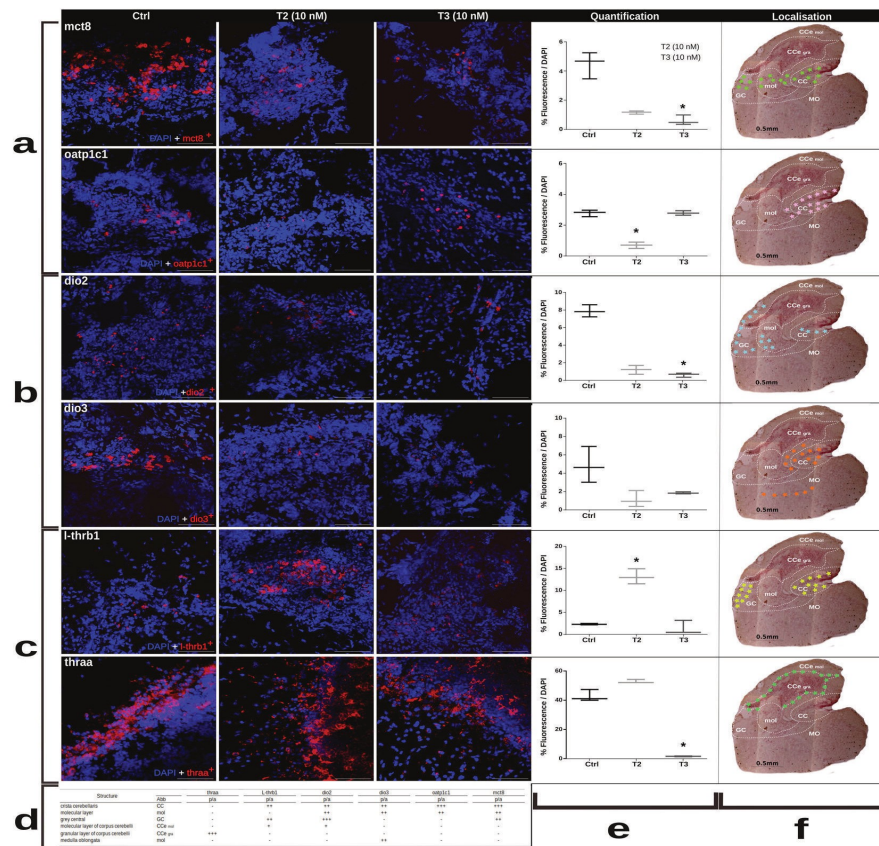


Figure 1. Fluorescent *in situ* hybridisation analysis. *Ex vivo* experiments for the quantification of mRNA expression in confocal images of sagittal sections of cerebellum in control and treated groups show the localisation of the probes for each gene. mRNA expression of the different genes was detected with Cy3 in red and the signal of DAPI in blue. The scale bar represented 50 μ m. (a) Transporters of THs, (b) diiodinases, (c) receptors of THs (d) table showing the abundance [low (+), medium (++) or high (+++)] or absence (-) of expression in each structure that conforms the cerebellum. (e) Quantification of total fluorescence normalised with DAPI. For all graphs * is $p < 0.05$ and (f). Photomicrographs of the same sections with Nissl staining showing in pointed lines the definition of the different nuclei that comprise the tilapia cerebellum. The zone of expression of each gene in the control groups is marked in colour stars.

Discussion

TH actions and effects during neurodevelopment are well known and conserved across different vertebrates; however, little is known about their role in adult neurogenesis²². In teleosts, a substantial percentage of mitotic cells within the proliferative zone are located in the cerebellum, and this proportion is maintained beyond early development and throughout adult life^{16,18}. Indeed, a clear proliferative zone has been identified in the teleostean cerebellum, preserving this structure the ability to generate and regenerate neurons and glial cells in juvenile and adult stages^{16,18}. In the present study, we questioned the effects of the two bioactive THs, T3 and T2, on cerebellar TH signalling, and their participation in juvenile myelination.

As far as we know, this work shows for the first time cerebellar mRNA expression as well as T3 and T2 regulation of TH transporters *oatp1c1* and *mct8*; diiodinases *dio2* and *dio3*, and TH receptors *thraa* and *l-thrb1*, supporting the involvement of these genes in cerebellar TH signalling. These genes showed a differential distribution, and all except *thraa* were prominently expressed in the crista cerebellaris, probably because of its strategic localisation as a transition nucleus between the medulla oblongata and corpus cerebelli, an important passageway for neuronal afferences and vascular irrigation^{21,23,24}.

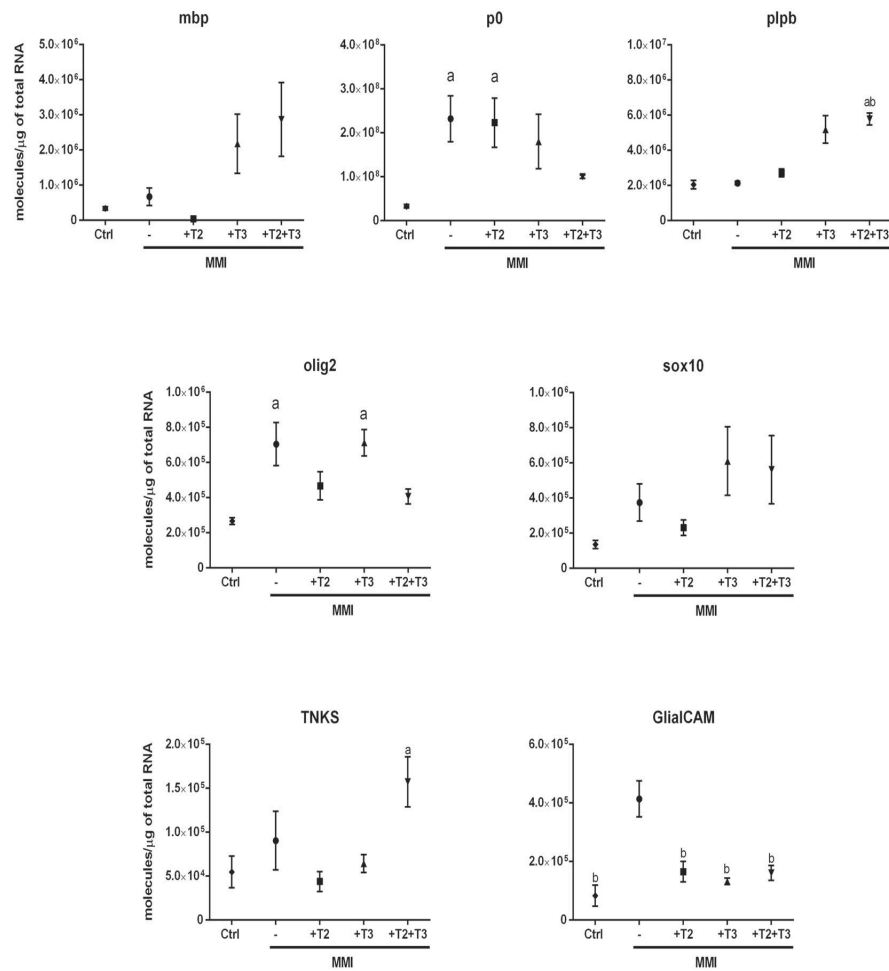


Figure 2. Cerebellar mRNA expression of mbp, p0, plpb, olig2, sox10, tnks and GlialCAM. Tilapia were exposed to 4.5 mM MMI with or without simultaneous addition of 1 nM T2, T3 or T2 + T3 for 30 days. Values are means \pm S.E.M. Significance is indicated $p < 0.05$ with respect to control group.

Genes regulated by the acute exposure to T3 or T2 showed similar mRNA expression patterns with both qPCR and FISH. Cerebellar *mct8* was more highly expressed than *oatp1c1*; this can be explained by the broader MCT8 cell type distribution (neurons, oligodendrocytes, precursors and endothelial cells), as compared to OATP1C1, which is only observed in endothelial cells in fish²⁵. The down-regulation exerted by THs on their transporters may be due to a negative feedback when sensing an increase in circulating hormones. Notably, we found that *oatp1c1* was only regulated by T2, allowing the hypothesis that this hormone could be a possible substrate for this transporter. Knock-down and knock-out models in mammals, birds and zebrafish have shown that *mct8* and *oatp1c1* expression and protein location are essential for proper neuronal and glial differentiation and migration to establish the cerebellar layers^{26,27}. *mct8* and *oatp1c1* transporters were identified in the crista cerebellaris and molecular nucleus located in the ventral-posterior cerebellar zone, and they are probably key for the systemic arrival and transit of hormones to the CNS through the blood-brain-barrier. Indeed, cerebellar irrigation in teleosts depends on the central arteries passing through the ventral-posterior zone^{21,23}.

The co-localisation of *mct8* and *oatp1c1* with both types of deiodinases agrees with the idea of the fine tuning of the TH signalling pathway in which intracellular TH transport, followed by TH activation/inactivation, is crucial for the balance of TH bioavailability. Contrary to previous reports on the liver, we showed that cerebellar *dio3* was not up-regulated by T2 or T3, indicating tissue-specific regulation within the CNS. *dio2*, however, was down-regulated by T2 and T3, as reported for all other tissues⁷, showing its fundamental role as a bioactive TH gatekeeper.

Interestingly, present results showed that cerebellar expression of *l-thrb1* and *thraa* did not co-localise. *thraa* expression was detected only in the periphery of the granular layer, where Purkinje and eurydendroid cells are localised. These cell types project to the molecular layer and to different nuclei within and beyond the cerebellum²⁴. The possible functional role of *thraa* in this cerebellar layer has yet to be explored. In contrast, *l-thrb1* expression was detected in the crista cerebellaris and grey central, co-localising with all other analysed thyroid signalling-related genes (*mct8*, *oatp1c1*, *dio2* and *dio3*), suggesting a clear TH-dependent function in these cerebellar structures. Present results contrast with those previously reported in zebrafish²⁸, which showed a high

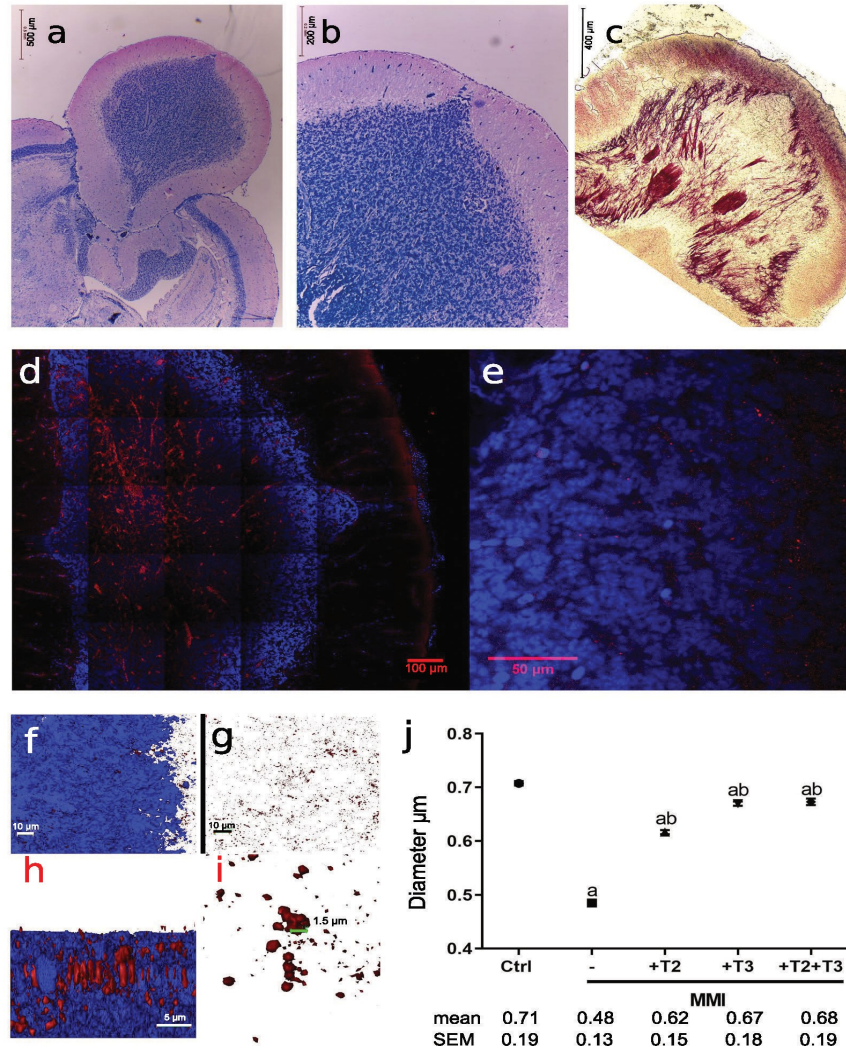


Figure 3. Myelin distribution and composition in tilapia cerebella. (a,b) Coronal sections of cerebella (5 μ m) in Kluver-Barrera staining. (c) Coronal sections of cerebella (50 μ m) in black-gold staining. Bundles of myelin fibres pass through the granular layer. (d,e) Confocal microscopy of 20 μ m coronal sections of the cerebellum of a control animal, immunostained to myelin basic protein (red) and counterstained with DAPI (blue). Note that stained myelin proteins and fibres are more abundant in the granular layer. (f) Frontal view of the reconstruction of 30 confocal sections showing the merge of red for myelin and blue for DAPI. (g) Frontal view of 30 confocal sections for a 3D reconstruction showing only the red channel for myelin. (h) Lateral view of a 3D reconstruction showing myelin fibres. (i) Zoom of myelin fibres in a frontal view. 3D reconstruction and measurement of myelin fibre diameters were performed with Amira software. A total of 9 images (3D reconstructions) within the granular layer from 3 different cerebella per group were analysed. (j) Myelin fibre apparent diameters of tilapia exposed to 4.5 mM MMI with or without simultaneous addition of 1 nM T2, T3 or T2 + T3 for 30 days. Values are means \pm S.E.M of \sim 700 single measurements per group. Significance is indicated as $p = 0.001$ compared to the control (a) or MMI-treated group (b) as compared to the control (a) or MMI-treated group (b).

distribution of *thraa* and a restricted localisation of *thrb* to certain nuclei. The observed differences in the specific localisation and levels of expression of the analysed genes could reflect a dynamic process associated with particular physiological scenarios. However, data in zebrafish and the results of this study showing differential localisation and TH regulation support the idea that *thraa* and *thrb* exert different roles in the CNS, possibly regulating different biological functions. In this context, in mammals, TR α has been associated with CNS development and neurogenesis²⁸, whereas cerebellar TR β has been involved in myelination through the regulation of Krüppel-like factor 9 (KLF9) in differentiating oligodendrocytes¹³.

To further analyse the involvement of THs in the juvenile myelination process, TH synthesis was blocked by means of a long-term (1 month) intermittent exposure to MMI either alone or with a low (1 nM) TH replacement. This MMI administration protocol has been shown to drop T3 intrahepatic concentrations to around 50%, as compared with controls when administered alone⁷. Unexpectedly, no significant differences were detected in the regulation of genes related to TH signalling in the tilapia cerebellum; however, the expression of this same set of genes does respond to both MMI alone or co-administered with THs (data not shown), suggesting the instalment of a compensatory mechanism. In contrast, modulation in the expression of OPCs and mature oligodendrocyte markers was observed, suggesting that the possible discrete TH fluctuations resultant from the intermittent and low dose administration protocol could influence the molecular dynamics of oligodendrocytes. In the rodent cerebellum, the expression of early OPC Olig-1 or OPC PDGF α R markers is prominent in the perinatal period and decreases gradually as development progresses (between 3 and 14 postnatal days, when the expression of *mbp*, a mature oligodendrocyte marker, increases). This switch is maintained throughout adulthood, where neurogenesis is restricted²⁹. In juvenile tilapia, however, we observed no clear switch between OPCs and mature oligodendrocyte markers since both are expressed at similar levels. This can be explained by the high neurogenic potential maintained throughout teleost lifespan, where the majority of adult-born cells are originated in the cerebellum²⁰. The fact that the expression of OPCs and mature oligodendrocyte markers was modulated by THs in juvenile cerebellum suggests that this endocrine signalling pathway is relevant for juvenile-adult myelination. Another signalling pathway relevant for mammalian differentiating oligodendrocytes is the Wnt signalling pathway, which under physiological conditions is repressed by TNKS for proper myelination³⁰. Furthermore, the glial cell adhesion molecule, or GlialCAM, is a protein involved in oligodendrocyte myelination in mice³¹. T2 and T3 could be modulating myelination through *tnks* and GlialCAM mRNA regulation as seen in PCR and transcriptomic experiments. To explore this, we took advantage of the mild hypothyroid state resulting from the MMI intermittent treatment⁷ and measured the apparent diameter of myelin fibres located in the granular layer of the cerebellum by immunofluorescence. The decrease in TH availability resulted in a significant reduction of myelin fibres (Fig. 3j). Interestingly, replacement with low doses of T3, T2 and T3 + T2 resulted in a significant recovery of myelin fibre diameters, showing that T3 and T2 may regulate myelin formation in juvenile tilapia cerebellum. Further studies using more potent visualization methodologies like electron microscopy will be useful to confirm these data. Although it is not clear if OPCs constitutively differentiate into myelin forming cells in mammals³², it has been shown that T3 improves the remyelination process in a juvenile demyelination rodent model, functioning as a neuroprotective agent by reducing proliferating cells in the SVZ and promoting OPC maturation^{29,33}. Furthermore, TH analogues have been tested as promoters of re-myelination in an effort to ameliorate the symptoms of the human CNS-localised hypothyroidism seen in Allan-Herndon-Dudley syndrome (AHDS). This disorder results from a mutation in the *mct8* gene that inhibits T3 entrance to the brain, leading to demyelination with severe psychomotor retardation. Some of the most promising TH analogues are diiodothyropropionic acid (DITPA) and triiodothyroacetic acid (TRIAC). In this context, DITPA had an effect on the expression of brain TH-signalling genes of *mct8* knock-out mice only if treated prenatally³⁴. Furthermore, human oligodendrocytes treated with DITPA up-regulated the expression of genes related to oligodendrocyte differentiation and myelination, and oligodendrocyte co-culture with retinal ganglion axons promotes myelination after DIPTA treatment³⁵. In teleosts, the only model for hypomyelination is the *mct8*^{-/-} zebrafish larvae, which resembles AHDS. Hypomyelination was partially or totally rescued with a 3-day treatment of DITPA or TRIAC, respectively²⁷. The fact that a T2 analogue had positive effects upon myelination suggests that T2 could also ameliorate myelination in different vertebrates. In the present study, *l-thrb1* expression was up-regulated by T2 in the crista cerebellaris (Fig. 1), a nucleus with transit of ascendant tracts to the granular layer, suggesting that T2 via its receptor could participate as a signal in myelination regulation. Additionally, T2 action is independent of MCT8, like TRIAC and DIPTA³⁶, compounds that have demonstrated CNS myelination therapeutic potential in case of mutations or total deletion of MCT8²⁷. The fact that T2 down-regulates cerebellar *mct8* mRNA could imply T2 participation in other CNS processes. Altogether, these studies and our data support the idea that T2 and T3 promote myelination via different pathways, and prompt T2 as a promising target to analyse for therapy on hypomyelination.

Materials and Methods

Biological samples. Male tilapia juveniles (*Oreochromis niloticus*) ~4–6 g (16 weeks post-hatching) were kindly provided by the Quarantine Unit for Tilapia and Catfish at the Universidad Michoacana de San Nicolas de Hidalgo, Mexico. Fish were kept in 10 L tanks with aerated freshwater at a temperature of 25 °C on a 12:12 h photoperiod. Fish were fed once a day with a commercial diet (Sera Marin, Sera, Germany). All animal experimentation was conducted in accordance with accepted standards of humane animal care, and protocols and procedures regarding handling and euthanasia were reviewed and approved by the Animal Welfare Committee of our Institute.

Ex vivo experimental design. We used an *ex vivo* tilapia cerebellar organotypic culture to analyse the acute effect of TH treatment upon the regulation of genes participating in TH signalling and myelination. mRNA expression was measured by both qPCR and FISH. Cerebellar organotypic culture protocol was performed as previously described for tilapia liver⁷, with the following modifications: Intact cerebella from non-treated tilapia were

dissected and placed into ice-cold stabilizing medium. For each treatment, four cerebella were placed onto inserts of semi-porous membranes (pore size 0.4 μm) in 6-well culture plates containing culture medium and maintained in an incubator at 18 °C in 5% CO_2 . After 48 h of stabilisation, the culture medium was supplemented with vehicle NaOH (0.01 N) (control groups) or T3 or T2 at concentrations of (0.1, 1, 10, and 100 nM) previously solubilised in vehicle (experimental groups), and tissues were incubated for 24 h. Experiments for qPCR were performed in triplicate ($n = 60$ cerebella; 12 cerebella per each of 5 experimental groups) (Supplementary Fig. S1). For FISH experiments, a total of 12 cerebella were analysed ($n = 4$ cerebella/treatment), which included controls and two treated groups (10 nM of T2 and T3).

***In vivo* experimental design.** To analyse the effect of T2 or T3 on myelination *in vivo*, tilapia groups were treated with methimazole (MMI) (4.5 mM) (Sigma), a TH synthesis inhibitor, with or without simultaneous addition of 1 nM T2, T3, or T2 + T3 (Sigma) previously solubilised in (0.01 NaOH). Treatments were administered using an immersion protocol previously described and validated in our laboratory⁷. Briefly, MMI or MMI + TH was added to the culture water in the corresponding tank at 09:00 h and replaced with fresh culture water at 17:00 h. This drug administration protocol was repeated three times per week for 30 days. At the end of the experiment, animals were euthanised and cerebella were dissected and quick frozen in TRIzol (Invitrogen) at -80°C until RNA extraction. Using the MMI administration protocol, T3 intrahepatic concentrations show a half reduction as compared to untreated tilapia. Treatment with 1 nM of T3 or T2 alone modifies the expression of some TH-dependent genes, showing that the organism is able to sense the slight fluctuations in intra-tissular TH concentrations⁷. Due to the intermittent nature of the protocol, treated fish were also exposed to discrete TH fluctuations receiving a boost of THs 3 times per week. For RT-qPCR, 3 cerebella were pooled to obtain 3 samples in each treatment. For immunofluorescence and histology analyses, the entire brains were fixed with paraformaldehyde (4%) for 3 h and 3 cerebella were analysed for each treatment.

RNA extraction. Total RNA was extracted from tilapia cerebella collected from the *in vivo* experiments and the organotypic cultures with TRIzol. RNA purity and integrity were assessed by (1%) agarose gels and concentration was measured with a Nano-Drop ND-1000 UV-Vis spectrophotometer at 260 nm (Nano Drop Technologies). For each treatment, ~ 50 – 70 mg of tissue was used for total RNA extraction. RNase-free DNase I (Invitrogen) was added to remove residual genomic DNA.

RT-qPCR. Quantification of the different gene transcripts was performed as previously described⁷. Briefly, mRNA was reverse transcribed (RT) from (2 μg) of total RNA using an oligo(dT) primer. Quantitative PCR was carried out in duplicates using β -Actin and ubiquitin-conjugating enzyme E2Z (UBCE) as reference genes³⁷. PCR protocols and oligonucleotides used for gene amplification are specified in Supplementary Table 1S4. In all cases, gene-specific standard curves were used and in quantification and data analyses performed in a Step One instrument according to the instructions from the manufacturer (Applied Biosystems[®]). The protocol for all genes was 10' at 95 °C, 10' at 60 °C, 10' at 72 °C for 40 cycles. For each experimental sample, the mRNA concentration was expressed as molecules per microgram of total mRNA used in the RT reaction (2 μg), obtained by comparison with the standard curve and normalised to the concentration of each reference gene.

NISSL staining. Brains previously fixed in PFA (4%), cryopreserved in sucrose and paraffined, were sliced in 10 μm sagittal sections. Sections were gradually rehydrated with xylene and (100%, 96%, 80% and 70%) ethanol for 5 min each and dyed with (0.5%) Cresyl Violet solution for 30 sec, washed in distillate water and dehydrated with reverse series of alcohol solutions and xylene for 10 min to finally apply Entellan mounting medium.

Fluorescent *in situ* hybridization (FISH). After treatments (see above), cerebella were frozen in 2-methylbutane (submerged in mix of dry ice/ethanol), and then embedded in Tissue-Tek O.C.T. Compound (Sakura Finetek[®]). The samples were sliced in a cryostat (Leica-CM1850) to obtain sagittal sections of 30 μm and mounted in SuperFrost[®] Plus (VWR) slides. Sagittal sections allow not only the location of gene expression at the histological level but also the identification of tracts where they may have an action in the cerebellar system.

Synthesis of mRNA probes. The full coding region of TR α 1, D2 and D3, as well as a 1 kb fragment of the coding region of L-TR β 1, OATP1C1 and MCT8 were amplified using specific oligonucleotides (Supplementary Table 2S5). Amplified fragments were inserted into a pCR[®]4-TOPO[®] vector (Invitrogen) and linearised using Not1 and Spe1 or Pme1 restriction enzyme. All mRNA probes were labelled by *in vitro* transcription using T3 (antisense) and T7 (sense) RNA polymerase with digoxigenin-UTP DIG RNA labelling kit (ROCHE). Supplementary Fig. S6 shows sense and antisense controls.

Hybridisation. Tissue slices were treated as previously described by Carasatorre *et al.*³⁸. Anti-DIG-POD (1:800) (ROCHE) diluted in TSA was added and the slices were incubated overnight at 4 °C, washed in TBS and TTBS and developed with Tyramide signal amplification-Cy3 (TSA-Cy3; 1:75) detection kit (Perkin-Elmer) in darkness and incubated for 60 min, washed in TBS and TTBS, contrasting with DAPI (1:400 in TBS) (ROCHE), and mounted with medium 1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octane (DABCO 33-LV; Sigma-Aldrich).

Fluorescent images. Observations and image acquisition were performed in a microscope Imager ZI (ZEISS) using AxioCam MRm (ZEISS- 60N-C). The images were obtained in 2D mosaics of 12 \times 14 scan, saved in .jpg format in AxioVision LE 4.8.1 software 2009, and were size adjusted, cropped, contrast enhanced, and annotated in Inkscape (Vector Graphics Editor).

20. Zupanc, G. K. H., Sirbulescu, R. F. & Ilies, I. Radial glia in the cerebellum of adult teleost fish: implications for the guidance of migrating new neurons. *Neuroscience* **210**, 416–430 (2012).
21. Zada, D. *et al.* Angiogenesis in zebrafish. *Handb. Cerebellum Cerebellar Disord.* **459**, 106–114 (2016).
22. Gothi, J. D., Demeneix, B. & Renaud, S. Comparative approaches to understanding thyroid hormone regulation of neurogenesis. *Mol. Cell. Endocrinol.* **459**, 104–115 (2017).
23. Okuda, K. S. *et al.* Lyve1 Expression Reveals Novel Lymphatic Vessels and New Mechanisms for Lymphatic Vessel Development in Zebrafish. *Development* **139**, 2381–2391 (2012).
24. Hibi, M., Matsuda, K., Takeuchi, M., Shimizu, T. & Murakami, Y. Evolutionary mechanisms that generate morphology and neural-circuit diversity of the cerebellum. *Dev. Neurobiol.* **59**, 282–301 (2012).
25. Vancamp, P. & Darras, V. M. Dissecting the role of regulators of thyroid hormone availability in early brain development: Merits and potential of the chicken embryo model. *Mol. Cell. Endocrinol.* **459**, 71–78 (2017).
26. Delbaere, J. *et al.* MCT8 deficiency in Purkinje cells disrupts embryonic chicken cerebellar development. *J. Endocrinol.* **232**, 259–272 (2017).
27. Zada, D., Blitz, E. & Appelbaum, L. Zebrafish – An emerging model to explore thyroid hormone transporters and psychomotor retardation. *Mol. Cell. Endocrinol.* **459**, 53–58 (2017).
28. Marelli, F., Carra, S., Rurale, G., Cotelli, F. & Persani, L. *In vivo* Functional Consequences of Human THRA Variants Expressed in the Zebrafish. *Thyroid* **27**, 279–291 (2017).
29. Calza, L., Fernandez, M., Giuliani, A., Aloe, L. & Giardino, L. Thyroid hormone activates oligodendrocyte precursors and increases a myelin-forming protein and NGF content in the spinal cord during experimental allergic encephalomyelitis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**, 3258–3263 (2002).
30. Casaccia, P. Anti-TANKyrase weapons promote myelination. *Nat. Neurosci.* **14**, 945–947 (2012).
31. Favre-Kontula, L. *et al.* GlialCAM, an immunoglobulin-like cell adhesion molecule is expressed in glial cells of the central nervous system. *Glia* **56**, 633–645 (2008).
32. Levine, J. M., Reynolds, R. & Fawcett, J. W. The oligodendrocyte precursor cell in health and disease. *Trends Neurosci.* **24**, 39–47 (2001).
33. Calza, L. & Fernandez, M. G. L. Cellular approaches to central nervous system remyelination stimulation: thyroid hormone to promote myelin repair via endogenous stem and precursor cells. *J. Mol. Endocrinol.* **44**, 13–23 (2010).
34. Ferrara, A. M. *et al.* The Thyroid Hormone Analog DITPA Ameliorates Metabolic Parameters of Male Mice With Mct8 Deficiency. *Endocrinology* **156**, 3889–94 (2015).
35. Lee, J. Y. *et al.* Overcoming Monocarboxylate Transporter 8 (MCT8)-Deficiency to Promote Human Oligodendrocyte Differentiation and Myelination. *EBioMedicine* **25**, 122–135 (2017).
36. Kinne, A. *et al.* Essential molecular determinants for thyroid hormone transport and first structural implications for monocarboxylate transporter 8. *J. Biol. Chem.* **285**, 28054–28063 (2010).
37. Geng, C. *et al.* Evaluation of reference genes for quantitative real-time RT-PCR analysis of gene expression in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Gene* **527**, 183–192 (2013).
38. Carasatorre, M. *et al.* Hippocampal synaptic expansion induced by spatial experience in rats correlates with improved information processing in the hippocampus. *PLoS One* **10**, 137944 (2015).
39. Schmued, L. *et al.* Introducing Black-Gold II, a highly soluble gold phosphate complex with several unique advantages for the histochemical localization of myelin. *Brain Res.* **1229**, 210–217 (2008).

Acknowledgements

Yasmin Hernández-Linares is a doctoral student from the Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and has received CONACyT fellowship 288935. This study was supported by grants from PAPIIT IN204517 and CONACyT 219833. We thank Abraham Cisneros Mejorado for providing the Black Gold II technique. This work received technical support from Maarten Cornelis Anthonij Werdler; MS Adriana González Gallardo; Ing. Elsa Nydia Hernández-Ríos, Ing. Ramón Martínez Olvera, MS, Edith Garay. Also, Luis Aguilar, Alejandro de León, Carlos S. Flores, and Jair García from the Laboratorio Nacional de Visualización Científica Avanzada. We thank Jessica G. Norris for critically reviewing the manuscript.

Author Contributions

Y. Hernández-Linares and A. Olvera participated in the planning and execution of the experiments and drafted the manuscript; P. Villalobos standardized and ran qPCR experiments; C. Lozano-Flores C. and A. Varela-Echavarría provided and supervised FISH and immunofluorescence methods; M. Luna participated in the analysis and interpretation of FISH experiments; and A. Orozco directly participated in the planning of the study and the drafting of the manuscript. All authors provided critical comments about the manuscript and revised the text. All authors of this research paper have read and approved the final version submitted.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43701-w>.

Competing Interests: The authors declare no competing interests.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2019