

03040
5



**CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE LA DESYODACIÓN DE TIRONINAS EN
DOS LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER MAMARIO HUMANO. EFECTO DE LA
TRİYODOTIRONINA, EL ÁCIDO RETINOICO Y LA ESTIMULACIÓN
 β -ADRENÉRGICA.**

Pablo García Solís.

**Entidad Académica, Centro de Neurobiología.
Universidad Nacional Autónoma de México**

Tesis que presenta Pablo García Solís, como requisito para obtener el grado de
Maestro en Ciencias (Neurobiología)

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Campus Juriquilla, Querétaro. Marzo del 2002.



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.

A JESÚS, CON, ROBE, NANO Y LILIANA CON TODO EL CORAZÓN.

Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Metabolismo Energético del Centro de Neurobiología de la UNAM bajo la dirección de la Dra. Carmen Aceves Velasco. Este trabajo fue apoyado parcialmente por los proyectos PAPIIT (UNAM) IN227999 y CONACyT 25598M.

Durante la realización de este trabajo el autor contó con una beca para estudios de posgrado (maestría) otorgada por el CONACyT (No. de Registro 153808), así como una beca complementaria otorgada por la Dirección General de Estudios de Posgrado de la UNAM (No de cuenta 500119785).

ÍNDICE.

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
AGRADECIMIENTOS.....	3
INTRODUCCIÓN.....	4
ANTECEDENTES.....	5
I. HORMONAS TIROIDEAS.....	5
A. LA GLÁNDULA TIROIDES.....	5
B. TRANSPORTE EN LA SANGRE DE LAS TIRONINAS.....	6
C. DESYODACIÓN DE LAS TIRONINAS.....	8
II. ÁCIDO RETINOICO Y RETINOIDES.....	12
A. ESTRUCTURA Y PROPIEDADES QUÍMICAS DE LOS RETINOIDES Y SUS PRECURSORES.....	12
B. METABOLISMO DE LOS RETINOIDES.....	14
1. Digestión, absorción y almacenamiento.....	14
2. Transporte extracelular.....	15
3. Metabolismo Intracelular.....	16
a. Incorporación intracelular del retinol plasmático unido a la RBP.....	16
b. Proteínas que unen a los retinoides.....	16
c. Síntesis de retinal y ácido retinoico.....	19
III. RECEPTORES A TIRONINAS Y ÁCIDO RETINOICO.....	23
IV. PAPEL DE LAS TIRONINAS Y LOS RETINOIDES EN EL DESARROLLO DE LA GLÁNDULA MAMARIA NORMAL Y NEOPLÁSICA.....	24
JUSTIFICACIÓN.....	29
HIPÓTESIS.....	30
OBJETIVOS.....	30
I. OBJETIVO GENERAL.....	30
II. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	30

MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
I. MATERIALES.....	31
II. MÉTODOS.....	31
A. CULTIVOS CELULARES.....	31
B. EXTRACCIÓN DE LAS CÉLULAS.....	32
C. CUANTIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD DESYODATIVA.....	34
RESULTADOS.....	35
I. LÍNEA CELULAR HepG2.....	35
II. LÍNEA CELULAR MCF-7.....	36
A. LAS CÉLULAS MCF-7 EXPRESAN ACTIVIDAD D1.....	36
B. EL ISO Y LA T3 NO ESTIMULAN LA EXPRESIÓN DE LA ACTIVIDAD D1 EN LAS CÉLULAS MCF-7.....	37
C. LAS FORMAS 9-CIS Y TODO-TRANS DEL ÁCIDO RETINOICO ESTIMULAN LA EXPRESIÓN DE LA ACTIVIDAD D1 EN LAS CÉLULAS MCF-7.....	37
III. LÍNEA CELULAR MDA-MB-231.....	40
A. ACTIVIDAD 5'D BASAL EN LA LÍNEA CELULAR MDA-MB-231.....	40
B. INDUCCIÓN DE LA ACTIVIDAD 5'D EN LAS CÉLULAS MDA-MB-231 TRATADAS CON LA T3, EL ISO Y LOS RETINOIDES.....	40
DISCUSIÓN.....	43
PERSPECTIVAS.....	50
CONCLUSIONES.....	51
REFERENCIAS.....	52
ANEXO I.....	65
SUPERFAMILIA DE RECEPTORES NUCLEARES.....	66
A. GENERALIDADES.....	66
B. RECEPTORES A HORMONAS TIROIDEAS.....	69
C. RECEPTORES A ÁCIDO RETINOICO.....	71
ÍNDICE DE FIGURAS.....	73
ÍNDICE DE TABLAS.....	74

RESUMEN.

La 5'desyodasa tipo I (D1) es una selenoenzima que cataliza la conversión periférica de la prohormona tetrayodotironina (T4) a la hormona activa triyodotironina (T3). La D1 produce la mayoría de la T3 que se encuentra en la circulación y se expresa en tejidos como el hígado, la tiroides y la glándula mamaria lactante (GML). Esta enzima es regulada de manera órgano-específica por diversos factores, i.e. los hidratos de carbono, la T3, la tiotropina (TSH) y las catecolaminas. Se ha demostrado que en el cáncer tiroideo, dependiendo del grado de desdiferenciación de la neoplasia, la D1 se vuelve refractaria a los estímulos que regulan su expresión en la tiroides normal (T3 y TSH) pero adquiere la capacidad de responder al ácido retinoico (AR). Por otra parte, la T3 y la norepinefrina son capaces de estimular la expresión de la D1 en la GML. En este estudio se analizó el efecto de la T3, el AR y la estimulación β -adrenérgica sobre la actividad D1 en dos líneas celulares de cáncer mamario humano: MCF-7 (menos diferenciada) y MDA-MB-231 (más desdiferenciada). Las células MCF-7 expresaron actividad D1, la cual solamente se incrementó con el AR. En las células MDA-MB-231 no se detectó actividad D1 bajo ninguna de las condiciones de cultivo. Estos resultados concuerdan con hallazgos previos que muestran que la progresiva desdiferenciación celular característica del cáncer se acompaña de la pérdida en la síntesis y regulación de la desyodación.

ABSTRACT.

5'deiodinase type I (D1) is a selenoenzyme that catalyzes the peripheral conversion of the prohormone thyroxine (T4) to the active form triiodothyronine (T3). D1 produces most circulating T3 and is expressed in organs like liver, thyroid, and lactating mammary gland (LMG). This enzyme is regulated in a organ-specific manner by a wide number of factors such as carbohydrates, T3, thyroid stimulating hormone (TSH), and catecholamines. It has been shown that expression of D1 in thyroid cancer (TC) depends on the degree of cellular dedifferentiation. In TC cells D1 expression is reduced and is refractory to physiological stimuli (T3 and TSH), but acquire the ability to respond to retinoic acid (RA). Fully dedifferentiated (anaplastic) TC cells do not express D1 and do not respond to T3, TSH, or RA. On the other hand the expression of D1 in LMG is stimulated by T3, and norepinephrine. In the present work the effects of T3, RA and β -adrenergic stimulation on D1 activity were analyzed in two breast cancer cell lines: MCF-7 (less dedifferentiated) and MDA-MB-231 (more dedifferentiated). MCF-7 cells expressed basal D1 activity, which was stimulated only with RA treatment. In MDA-MB-231 cells D1 activity was not detected under any treatment. These results are in accordance with previous findings which show that in cancer cells, D1 loses its responsiveness to physiological regulators and suggest that this process is associated with cellular dedifferentiation.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco de manera muy especial a la Universidad Nacional Autónoma de México porque me brindo sus riquezas y la oportunidad de seguir preparándome profesionalmente.

Agradezco a la Dra. Carmen Aceves Velasco por todas sus enseñanzas, paciencia, apoyo y confianza.

A los miembros de mi comité tutorial, Dra. Teresa Edith Garay Rojas, Dr. Mauricio Díaz Muñoz y Dra. Brenda Anguiano Serrano. Gracias por sus valiosas aportaciones a esta tesis.

A los miembros del jurado, Dra. Carmen Clapp Jiménez-Labora, Dr. Juan Luis Rendón Gómez y Dr. Luis Antonio Salazar Olivo. Gracias por su disponibilidad, comentarios y sugerencias.

Al Dr. Carlos Valverde Rodríguez y la Dra. Aurea Orozco Rivas por sus comentarios y aportaciones durante los seminarios, los cuales ayudaron a la realización de un mejor proyecto de tesis.

Agradezco el apoyo técnico de las siguientes personas: Biol. Rita Rojas Huidobro, M. en C. Patricia Villalobos, T. L. C. Felipe Ortiz Cornejo, Dr. Michael C. Jeziorski, Lic. Ma. Del Pilar Galarza (Biblioteca, CNB-UNAM) y M.V.Z. Martín García (Bioterio, CNB-UNAM). También agradezco todo el apoyo brindado por la Unidad de Análisis de Imagen, Unidad de Fotografía y Dibujo y a la Unidad de Enseñanza del CNB en especial a Leonor Casanova e Isabel Bolaños.

A mis amigos y compañeros del laboratorio y del CNB. Gracias por su apoyo.

INTRODUCCIÓN.

La glándula mamaria es un tejido único en el organismo, ya que el epitelio mamario que originará al epitelio alveolar productor de leche empieza su desarrollo en el embrión, se compromete durante la pubertad, y termina su maduración hasta la etapa adulta cuando ocurre un embarazo (Medina, 1996). Esta maduración recurrente, -ya que al terminar cada periodo de lactancia, el tejido alveolar involuciona casi hasta su estado previo a la gestación-, es dependiente de una compleja interacción entre el sistema neuroinmunoendócrino y las señales sensoriales emitidas por las crías (Dickson & Lippman, 1995; Lochter, 1998; Medina, 1996). La elevada incidencia de cáncer en este tejido -representa la cuarta neoplasia más común a nivel mundial (WHO, 1999)- ha permitido sugerir que su característica de proliferación-diferenciación-involución lo hace un tejido muy susceptible a mutaciones, sobretodo en los periodos de diferenciación y desarrollo (Russo & Russo, 1998; Medina, 1996;). Esta noción esta sustentada en dos hechos bien conocidos: 1) el embarazo temprano (antes de los 20 años) reduce en un 50% el riesgo de aparición de cáncer mamario en las mujeres de todo el mundo (McMahon et al., 1979), y 2) los procesos neoplásicos en general se acompañan de una importante y sostenida desdiferenciación del tejido normal, es decir que las células neoplásicas pierden de manera progresiva las características propias del tejido que les dio origen (Dickson & Lippman, 1995; Schmutzler & Köhrle, 2000). Se ha descrito que hormonas relacionadas con la diferenciación celular -estrógenos, tironinas, ácido retinoico (AR), prolactina, etc- están involucradas también en los procesos neoplásicos y que quizás la perdida del equilibrio entre sus acciones puede ser el causante de que una célula se transforme en tumoral (Dickson & Lippman, 1995). El presente trabajo es parte de un proyecto más amplio orientado a conocer la participación de las hormonas tiroideas o tironinas en el desarrollo y diferenciación de la glándula mamaria normal y neoplásica. Específicamente, este estudio se diseñó para caracterizar bioquímica y funcionalmente la actividad desyodativa de tironinas en dos líneas

celulares de cáncer mamario que representan diferentes grados de desdiferenciación: las células MCF7 y las MD-MB-231.

ANTECEDENTES.

I. HORMONAS TIROIDEAS.

A. LA GLÁNDULA TIROIDES.

Independientemente de su tamaño, forma y localización anatómica, la glándula tiroides es un órgano endocrino común a todos los vertebrados. La glándula sintetiza, almacena y secreta al torrente circulatorio una familia de hormonas que reciben el nombre de tironinas, cuya característica distintiva es la presencia de yodo en su estructura (Valverde, Aceves & Navarro 1993). En los mamíferos las tironinas participan en una amplia gama de procesos biológicos; por ejemplo, son indispensables en el desarrollo normal de los individuos, particularmente de su sistema nervioso, regulan el metabolismo energético y la producción de calor (Aceves, 1997). La estructura básica de las tironinas corresponde a la unión de dos aminoácidos tirosina modificados. Dicha molécula

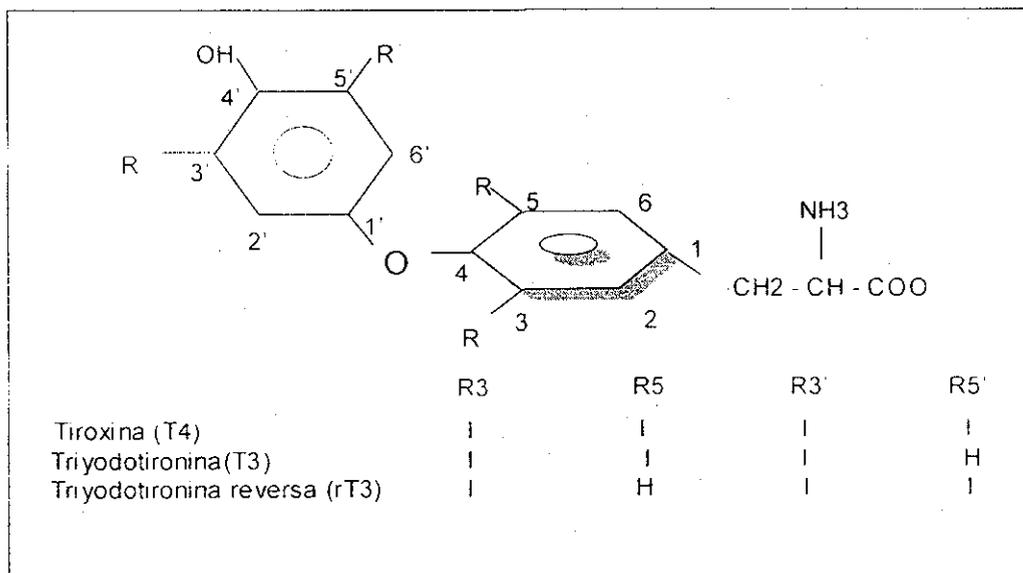


Figura 1. Estructura química y nomenclatura de las tironinas.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

celulares de cáncer mamario que representan diferentes grados de desdiferenciación: las células MCF7 y las MD-MB-231.

ANTECEDENTES.

I. HORMONAS TIROIDEAS.

A. LA GLÁNDULA TIROIDES.

Independientemente de su tamaño, forma y localización anatómica, la glándula tiroides es un órgano endocrino común a todos los vertebrados. La glándula sintetiza, almacena y secreta al torrente circulatorio una familia de hormonas que reciben el nombre de tironinas, cuya característica distintiva es la presencia de yodo en su estructura (Valverde, Aceves & Navarro 1993). En los mamíferos las tironinas participan en una amplia gama de procesos biológicos; por ejemplo, son indispensables en el desarrollo normal de los individuos, particularmente de su sistema nervioso, regulan el metabolismo energético y la producción de calor (Aceves, 1997). La estructura básica de las tironinas corresponde a la unión de dos aminoácidos tirosina modificados. Dicha molécula

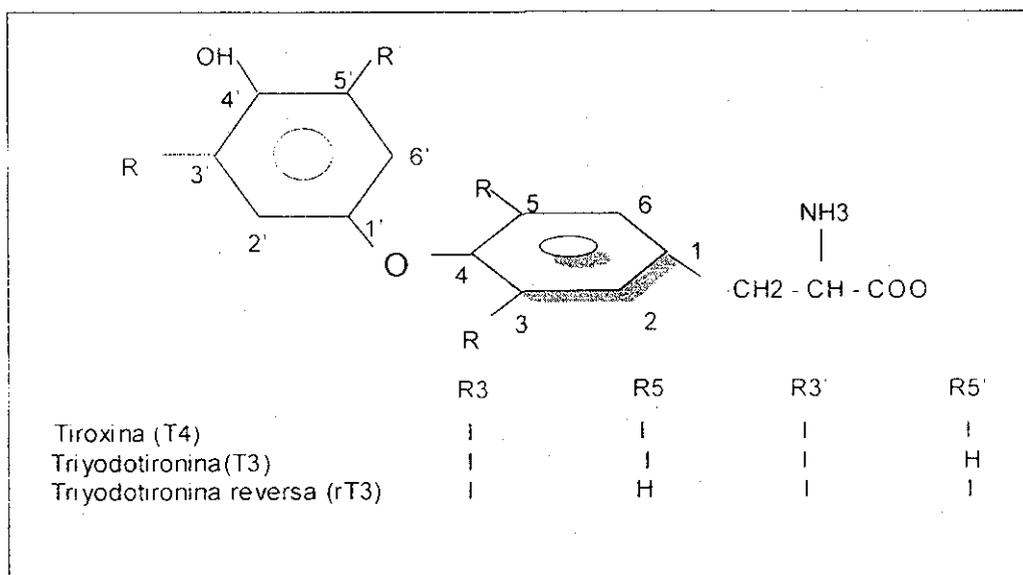


Figura 1. Estructura química y nomenclatura de las tironinas.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

esta formada por un anillo externo (fenólico) y un anillo interno (tirosilo). Las moléculas de yodo se ubican en las posiciones 3', 5' del anillo fenólico y 3, 5 del tirosilo (figura 1). Las tironinas con actividad biológica conocida son la tiroxina (3, 3', 5, 5'-tetrayodotironina o T4) y la 3, 5, 5'-triyodotironina (T3) (Aceves, 1997).

La síntesis y liberación de las tironinas elaboradas por la glándula tiroides están sujetas a un estricto sistema de regulación en el que intervienen una compleja cascada de señales nerviosas y endocrinas específicas denominada eje hipotálamo-hipófisis-tiroides (eje HHT) y mecanismos de autoregulación intrínsecos de la propia glándula en los que participa el yodo (Aceves, 1997). La cascada del eje HHT se inicia en el hipotálamo. Las neuronas hipotálamicas del núcleo paraventricular elaboran y secretan al sistema porta hipofisiario el tripéptido tiroliberina (TRH). Esta neurohormona interactúa con sus receptores específicos a nivel de las células hipofisarias denominadas tirotropos, y controla la síntesis y secreción de la tirotropina (TSH) (Valverde, Aceves & Navarro, 1993). La TSH, una vez liberada a la circulación por el tirotropo, actúa en la glándula tiroides. Los efectos de la TSH en la glándula tiroides están mediados por receptores de membrana en el tirocito, que involucran el sistema de la adenilato ciclasa e incluyen desde el recambio celular hasta los procesos funcionales tiroideos. Así la TSH promueve: a) la captura de yodo, b) la síntesis y secreción de las tironinas y c) la desyodación tiroidea de T4 a T3 (Aceves, 1997). El eje HHT se cierra con el asa de regulación negativa que ejercen las tironinas inhibiendo la síntesis y liberación de la TRH y la TSH (Aceves, 1997).

B. TRANSPORTE EN LA SANGRE DE LAS TIRONINAS.

Debido a su naturaleza hidrofóbica, las tironinas requieren, para su distribución a los órganos blanco, de proteínas que las transporten a través de la sangre. Las principales proteínas encargadas de dicho transporte se sintetizan en el hígado y son la globulina que une a la tiroxina (TBG), la transtiretina (TTR) y la albúmina. La TBG es una glicoproteína con un peso molecular de 54 Kd que solo esta presente en los mamíferos superiores y tiene la más alta afinidad de las tres

proteínas mencionadas. En los humanos la capacidad de unión de la TBG a la T4 en el suero normal es equivalente a su concentración ya, que una molécula de TBG solo es capaz de unir una tironina. La TBG transporta del 70 al 80% de la T4 que circula en el suero. La vida media de la TBG en el plasma es de 5 días. La TTR es la más conservada de las proteínas transportadoras de tironinas y tiene una distribución casi ubicua en los vertebrados. La TTR es la segunda de mayor afinidad por el ligando, tiene un peso molecular de 54 Kd y esta formada por 4 cadenas polipeptídicas idénticas, su concentración es de 4.6 $\mu\text{mol/L}$. Una molécula de TTR une con alta afinidad una molécula de T4; cuando hay altas concentraciones de T4 también se puede unir con menor afinidad una segunda molécula de la hormona. Una parte de la TTR que circula en el suero forma complejos con la proteína que une al retinol (RBP). La unión de T4 por la TTR es independiente de la unión a la RBP. La albúmina por su parte es la de más baja afinidad pero tiene una alta capacidad para transportar a las tironinas, transportando alrededor del 10 al 20% de las tironinas presentes en el suero. En general el principal ligando por estas proteínas es la T4, seguido de la T3 y por último la T3 reversa (3, 3', 5'-triyodotironina o rT3). En condiciones normales la concentración de las tironinas que están libres en el suero es muy pequeña (por abajo del 0.02% del total de la T4 circulante, mientras que para T3 es menor del 0.3%) (Köhrle, 1999a; Larsen, Davies & Hay, 1998; Robbins, 1996). Estas proteínas transportadoras son parte importante de la fisiología tiroidea y se les han propuesto al menos 4 funciones además de la transportación en la sangre: a) almacenamiento extratiroideo de las tironinas, b) protección a los tejidos de la exposición excesiva a las tironinas, c) función de liberación regulada de las hormonas, que permite a la poza de hormonas libres ser continuamente abastecida, haciéndolas más accesibles a las células y d) evitar la pérdida excesiva de yodo al prevenir que las tironinas se eliminen a través de la orina o las heces fecales (Aceves, 1997; Larsen, Davies & Hay, 1998). En la tabla 1 se presenta un resumen de las principales características de las proteínas transportadoras de tironinas.

Tabla 1. Comparación de las tres principales proteínas transportadoras de tironinas en el humano.

	Globulina que une a la tiroxina	Transtiretina	Albúmina
Peso molecular de la holo-proteína (Kd)	54	54	66
Concentración plasmática ($\mu\text{mol/L}$)	0.27	4.6	640
Capacidad de unir a la T4 ($\mu\text{g de T4/dL}$)	21	350	50,000
Constantes de asociación en principales sitios de unión (M^{-1})			
T4	1×10^{10}	7×10^7	7×10^5
T3	4.6×10^8	1.4×10^7	1×10^5
Fracciones de los sitios ocupados por T4 en plasma eutiroideo	0.31	0.02	<0.001
Distribución de tironinas (%/proteína)			
T4	68	11	20
T3	80	9	11

Modificada de Larsen, Davies & Hay, 1998.

C. DESYODACIÓN DE LAS TIRONINAS.

La glándula tiroides secreta a la sangre el total de la T4 y solamente el 20% de la T3 circulante. Se ha demostrado que la formación del 80% de la T3 en sangre, junto con otras tironinas, ocurre fuera de la glándula tiroides mediante el proceso enzimático selectivo y diferencial denominado desyodación. La desyodación consiste en remover los yodos presentes en las moléculas de las tironinas. Para la desyodación se han descrito dos vías independientes. La primera se refiere a la desyodación del anillo fenólico de la molécula de tironina y se le conoce genéricamente como 5'desyodación (5'D). Por esta vía, la T4 se convierte en T3 y la T3 inactiva (rT3) se convierte en 3, 3'-diyotironina (figura 2). La segunda vía se denomina 5 desyodación (5D), involucra la desyodación del anillo tirosilo. Por esta vía la T4 se transforma en rT3 y la T3 en 3, 3'-diyodotironina (figura 2). A la vía 5'D se le conoce como vía de activación ya que los productos que genera son los de mayor actividad biológica, mientras que a la vía 5D se le llama de inactivación ya que el producto generado (rT3 o 3, 3' diyodotironina) parece no tener actividad biológica (Aceves, 1997).

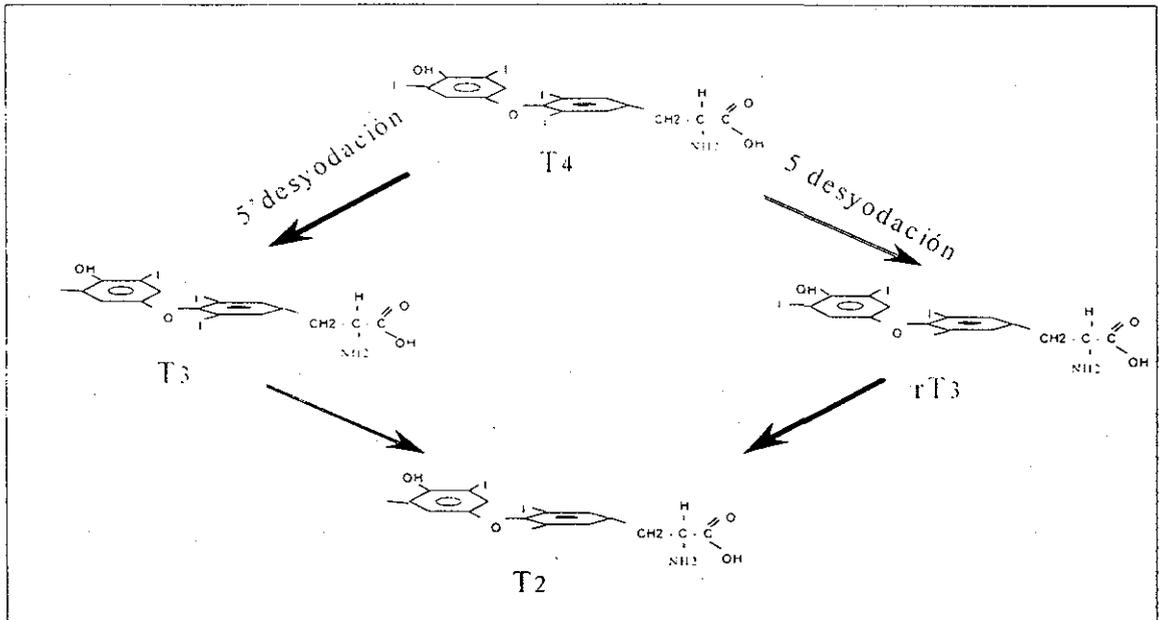


Figura 2. Desyodación secuencial de la T4. Se ilustra la conversión de T4 en T3 y de rT3 en 3, 3'-T2 por la desyodación del anillo externo y la conversión de T4 en rT3 y de T3 en 3, 3'-T2 por la desyodación del anillo interno.

Las dos vías desyodativas, tanto la vía de activación como la de inactivación, se llevan a cabo por la acción de las tres isoenzimas denominadas desyodasas codificadas en genes diferentes. Estas enzimas pertenecen a una familia de selenoproteínas (Aceves, 1997). La vía 5'D la llevan a cabo las desyodasas tipo I (D1) y tipo II (D2), mientras que la vía 5D es catalizada por el tipo III (D3). Si se toma en consideración que las hormonas tiroideas regulan el balance energético de los organismos, la desyodación periférica se puede explicar como una estrategia de ahorro energético sistémico, donde la desyodación "ajusta" el aporte local de tironinas y por consiguiente el gasto de energía órgano por órgano (Aceves, 1997).

La D1 es una enzima que en condiciones normales desyoda tanto el anillo fenólico como el tirosilo, tiene una afinidad 30 veces mayor por la rT3 que para la T4 y es inhibida por el propiltiouracilo (PTU). Aunque se desconocen los factores que regulan la selectividad por uno u otro anillo de la tironina, se ha mostrado que

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

la enzima desyoda preferentemente el anillo fenólico en condiciones de pH básico (Aceves, 1997). La D1 Se encuentra abundantemente en el hígado, riñón, tiroides, y en menor proporción en la hipófisis, músculo esquelético, corazón y glándula mamaria lactante (Aceves, 1997). Su constante de afinidad (K_m) es significativamente mayor que la de las otras dos enzimas (μM vs nM , respectivamente). Para su actividad se requiere de una baja concentración de tiosoles y concentraciones elevadas de sustrato. Bajo condiciones metabólicas normales, la D1 genera la mayor parte de la T3 que se encuentra en la circulación (Köhrle, 1999). Bajo condiciones catabólicas (el ayuno, sepsis, el trauma grave, intervenciones quirúrgicas, la lactancia, el último tercio del embarazo, etc) la actividad de la D1 hepática se reduce, disminuyendo la concentración circulante de la T3 (Aceves, 1997; Köhrle, 1999a). En el gen de la D1 humana (*hdio1*) se han identificado y caracterizado funcionalmente en su región promotora dos complejos de elementos responsivos a la T3 y al AR: los complejos TRE-RARE (Köhrle, 1999a; Toyoda et al., 1995). Estos elementos confieren al *hdio1* la capacidad de respuesta observada tanto *in vivo* como *in vitro* a la T3 y al AR. Sin embargo, se conoce que esta enzima puede ser estimulada por una variedad de moléculas entre los que se incluyen: la T3 y dexametasona en el hígado, la TSH en tirocitos, la noradrenalina y prolactina en la glándula mamaria de rata lactante, la angiotensina II y la noradrenalina en el corazón, así como el AR en células cancerosas de tiroides e hígado (Aceves 1997; Aceves et al., 1999a; Aceves & Rojas-Huidobro, 2001; Köhrle, 1999a; Menjo et al., 1993; Toyoda et al., 1995; Yonemoto et al., 1999). Estos resultados indican que la D1 tiene una regulación diferencial dependiendo del tejido, del estado fisiológico y del grado de diferenciación celular, y que en su regulación parecen intervenir otros mecanismos no genómicos (vgr. cofactores, factores de transcripción asociados a los complejos TRE-RARE, etc) (Köhrle, 1999a).

A La D2 se le considera una verdadera 5'D ya que desyoda exclusivamente el anillo fenólico, su sustrato preferencial es la T4 y es parcialmente resistente al PTU (10 veces más resistente que la D1). Se ha encontrado en prácticamente todos los tejidos. Se expresa preferencialmente en el cerebro, la hipófisis y el

tejido adiposo pardo. La actividad de la D2 es fuertemente estimulada por agentes que incrementan la producción de cAMP y por corticosteroides, y es inhibida por la T3 (Köhrle, 1999a).

La vía de desyodación 5D la lleva acabo la desyodasa tipo III (D3). La D3 se encuentra distribuida en todo el organismo y se expresa primordialmente en piel y placenta. Su función principal es desactivar tanto a la T4 como a la T3. Esta desyodasa es la menos estudiada (Aceves, 1997). En la tabla 2 se presenta un resumen de algunas de las propiedades de las desyodasas.

Tabla 2. Resumen de las propiedades de las tres desyodasas de tironinas.

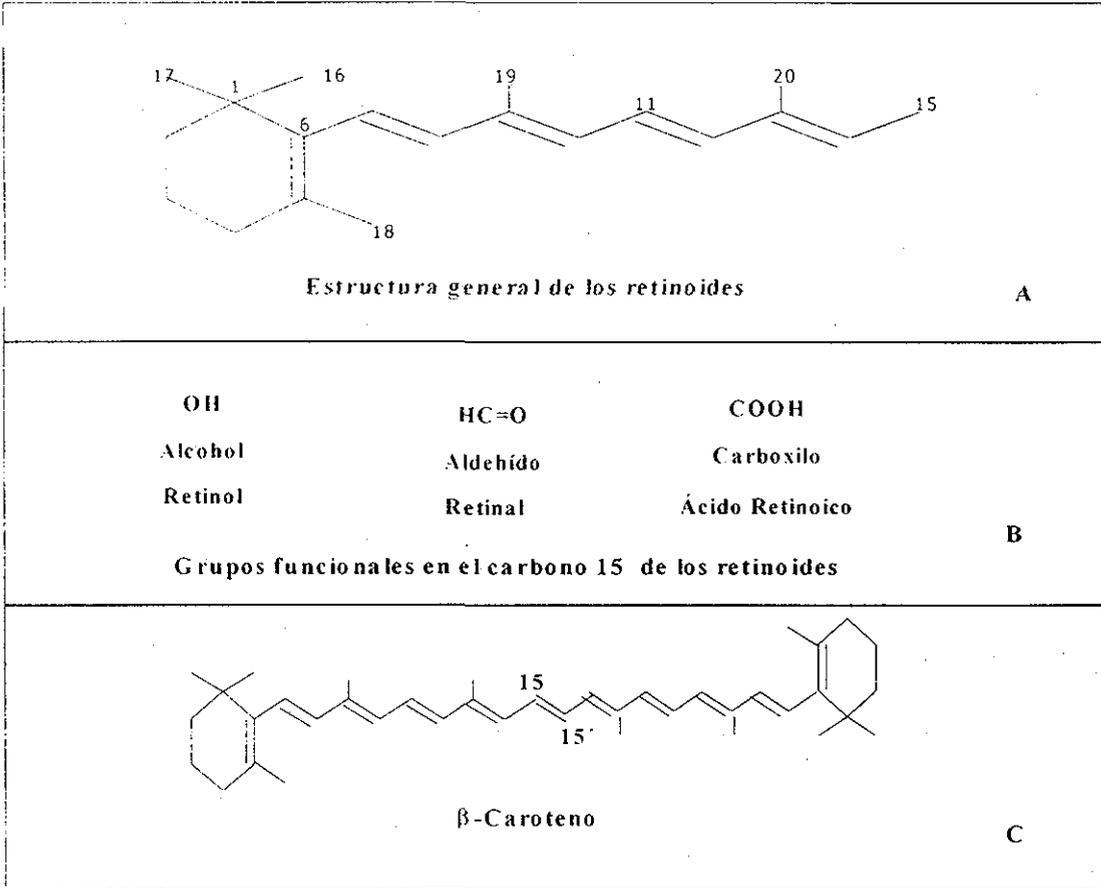
PROPIEDAD	D1	D2	D3
Anillo que desyodan	Interno y externo	Externo	Interno
Cinética de la reacción	Ping-Pong	Secuencial	Secuencial
Preferencia de Substrato	rT3>>T4>>T3	T4>>rT3	T3 (sulfatada) > T4
Km del substrato (substrato preferido)	0.5 µM (rT3)	1-2 nM (T4)	5-20 µM (T3 sulfatada)
Km del Cofactor <i>in vitro</i> DTT	1-10 mM	>10 mM	≈ 70 mM
Inhibidores:			
Thiouracilos	++++	-/+	-
Ácido iopanoico	++++	++++	++++
Iodoacetato	++++	+	?
Flavoniodes	++++	+++	+++
Aromaticos halogenados	++++		
Peso molecular (Kda)	55, 000	200,000	Desconocido
Distribución en los tejidos	Tiroides, riñón, hígado, hipófisis eutiroidea y SNC	SNC, hipófisis, BAT	Casi en todos tejidos, no está en hígado, riñón, tiroides, pituitaria
Localización subcelular	Hígado: reticulo endoplásmico. Riñón: membrana plasmática basolateral	Membranas microsomales	Membranas microsomales
Hipertiroidismo	↑	↓	↑
Hipotiroidismo	↓	↑	↓
Síndrome de baja T3		Sin cambio	Sin cambio
Sitio activo	Selonocisteína	Selonocisteína	Selonocisteína
Gen humano: Localización	1p32-p33	14q24.3-q24.3	14q32
Elementos del promotor	TRE, RARE, sin caja CAAT o TATA	CRE	-----
Probable función	Proveer T3 a la circulación	Proveer T3 para autoconsumo	Inactivar a T4 y a T3

BAT: tejido adiposo pardo. CRE: elemento responsivo al adenosin monofosfato ciclico(cAMP); DTT: ditiotreitil RARE: elemento a responsivo a ácido retinoico; TRE: elemento responsivo a tironina. ↓ Disminución, Aumento ↑. Modificada: Köhrle, 1999a.

II. ÁCIDO RETINOICO Y RETINOIDES.

A. ESTRUCTURA Y PROPIEDADES QUÍMICAS DE LOS RETINOIDES Y SUS PRECURSORES.

El término "retinoides" se aplica a todos los compuestos naturales y sintéticos emparentados con la vitamina A o el *todo-trans*-retinol (Schmutzler & Körhle, 2000). Químicamente los retinoides están formados por un anillo β -ionona (ciclohexenilo) conjugado a una cadena formada por unidades isopreno que tiene un grupo funcional de naturaleza variable en el carbono 15 de la cadena (figura 3) (Mayes, 1997). Los retinoides son compuestos insolubles en agua, solubles en etanol, metanol, cloroformo, grasas y aceites, también son altamente sensibles a la luz y al O₂ (Blaner, 1993; Devore, 1970). En los mamíferos los retinoides se encuentran principalmente en forma de alcohol (retinol), aldehído (retinal), ácidos (AR) y ésteres (ésteres de retinil) (Blaner, 1993). En la naturaleza existen varias configuraciones geométricas de los retinoides como la *todo-trans*, *13-cis*, *11-cis* y *9-cis*. En el humano la configuración más abundante es la *todo-trans* (Blaner, 1993). El retinol es el compuesto precursor del retinal, el AR y los ésteres de retinil (Blaner, 1993). Cada uno de estos compuestos tiene diferentes funciones. La forma *11-cis* del retinal participa en el ciclo de la visión como cromóforo del pigmento visual rodopsina y no se le conoce otra actividad biológica (Blaner, 1993). El *todo-trans* retinal es un metabolito intermedio de la oxidación enzimática del retinol para formar el AR. El AR participa en procesos de desarrollo, crecimiento y diferenciación celular (Yang et al., 1999). El AR ejerce su actividad biológica a través de factores de transcripción ligando-dependientes (receptores nucleares) (Blaner, 1993). En el humano el AR se encuentra de manera natural en las configuraciones *todo-trans*, *9-cis* y *13-cis* (Pfahl & Chytil, 1996).



TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Figura 3. Estructura de los retinoides y sus precursores. En el panel A se muestra la estructura general de los retinoides. Se ilustra el anillo β-ionona conjugado a la cadena de unidades isopreno y como se numeran sus átomos de carbono. En el panel B se muestran los principales grupos funcionales presentes en los retinoides, los cuales se encuentran en el carbono 15 de la molécula y le dan el nombre al retinoide respectivo. En el panel C se presenta la estructura de un carotenoide típico, el β-caroteno. Los carotenoides tienen 40 átomos de carbono y están formados por 8 subunidades isopreno, cuyo arreglo se hace inverso en el centro. Los carotenoides que presentan anillos β-ionona como el β-caroteno son compuestos precursores de retinoides ya que si se fractura la cadena isoprenoide se pueden formar dichas moléculas.

Otro grupo de moléculas importantes que están estrechamente emparentadas con la vitamina A son los carotenoides. La estructura básica de los carotenoides es poliénica de 40 átomos de carbono, formada por ocho unidades del monómero isopreno, cuyo arreglo se hace inverso en el centro, y pueden ser de cadena lineal o tener ciclizaciones en los extremos (ver figura 3). El nombre genérico de los carotenoides deriva del nombre científico de la zanahoria,

Daucus carota, ya que de esta hortaliza se aislaron por primera vez (Badui, 1993). Su color varía de amarillo a anaranjado y rojo; una gran proporción de ellos se encuentra en las hojas verdes. Son responsables del color de muchos frutos y flores. También están presentes en algas, bacterias fotosintéticas, hongos y levaduras (Badui, 1993). Los carotenoides se dividen de acuerdo en su estructura química en carotenos y xantofilas. Los primeros tienen características de hidrocarburos, son solubles en éter de petróleo y en menor medida en etanol; destacan entre estos los α , β y γ carotenos y el licopeno. Por su parte las xantofilas son la forma oxidada de los anteriores, se presentan como ácidos, aldehídos o alcoholes (Badui, 1993). Existe una gran similitud entre las estructuras químicas de la vitamina A y la de algunos carotenoides; los que tienen uno o dos anillos β -ionona presentan actividad biológica de pro vitamina A (figura 3). Los carotenoides tienen esta actividad biológica de pro vitamina ya que la mucosa intestinal de los animales superiores los oxida y los convierte en retinal, precursor del retinol (Olson, 2001). De los más de 600 carotenoides que se han aislado de la naturaleza, aproximadamente 50 tienen actividad de pro-vitamina A (Olson, 2001). Es importante mencionar que los carotenoides, a demás de servir como precursores de la vitamina A en el humano, también funcionan como agentes antioxidantes, es decir protegen al organismo contra la formación y la acción de los radicales libres (Badui, 1993).

B. METABOLISMO DE LOS RETINOIDES.

1. Digestión, absorción y almacenamiento.

Los retinoides no pueden ser sintetizados *de novo* por los animales por lo que todos ellos tienen que provenir de la dieta. Los retinoides en los alimentos se pueden encontrar como retinoides formados o como carotenoides con actividad de pro-vitamina A. Los carotenoides están ampliamente distribuidos entre las frutas y verduras, mientras que los retinoides se encuentran en los alimentos de origen animal, siendo la mejor fuente de estos el hígado y los huevos (Olson, 1986).

Los retinoides y los carotenoides sufren varias conversiones metabólicas, en la luz intestinal e intracelularmente en la mucosa intestinal antes de ser totalmente incorporados al organismo. El resultado final de estas transformaciones químicas se traduce en favorecer la formación de retinol, que es el retinoide que se absorbe en mayor cantidad. Una vez que han ingresado los retinoides a las células del epitelio intestinal, tanto el retinal como el retinol se unen a la proteína celular que une retinol tipo II (CRBP-II). El retinol unido a la CRBP II se esterifica en los quilomicrones por la acción de la lecitin:retinol aciltransferasa. Una pequeña porción de los retinoides de la dieta se convierte en AR o se ingiere como tal y entra a la circulación unido a albúmina. Parte del AR formado en el intestino, así como el proveniente de la dieta, se excretan junto con la bilis (Olson, 1986).

La mayoría del retinol se almacena en el hígado y se libera de acuerdo a la disponibilidad de su proteína transportadora: la proteína transportadora de retinol (RBP). La médula ósea es otro sitio de almacenamiento, aunque se ha sugerido que las altas concentraciones de retinol encontradas se deben más bien a la elevada conversión de retinol a *todo-trans* AR esencial para la diferenciación normal de las células de la sangre (Blaner, 1993). Otro tejido que contribuye sustancialmente al almacenamiento de los retinoides es el tejido adiposo, el cual también almacena carotenoides. Los retinoides también se almacenan, aunque en menor cantidad, en el ojo, los testículos, el riñón, el intestino y los pulmones, entre otros tejidos (Blaner, 1993; Olson, 1986).

2. Transporte extracelular.

El *todo-trans* retinol es transportado por la RBP del hígado a los tejidos blanco. La RBP humana consta de una sola cadena polipeptídica de 21, 231 de peso molecular compuesta de 182 residuos de aminoácido. La RBP humana es secretada por el hígado con el *todo-trans* retinol unido a ella, de tal manera que a cada RBP le corresponde solo una molécula de retinol. La RBP protege al retinol del oxígeno y otras moléculas (Blaner, 1993). En el suero la RBP se combina con la transtiretina (TTR) en una relación molar uno a uno (Larsen, Davies & Hay,

1998). La concentración de RBP en plasma es aproximadamente de 40-50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ mientras que la concentración de TTR es de 200 a 350 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Olson, 1986; Larsen, Davies & Hay, 1998). Estudios realizados en ratas mostraron que la RBP también se sintetiza en el riñón, el bazo, el cerebro, los pulmones, cerebro, estómago, músculo esquelético, testículos, ojo y en los tejidos adiposos blanco y pardo (Blaner, 1993). Por otra parte el AR en plasma se encuentra en muy bajas concentraciones, de 1-3 ng/mL , y está unido a la albúmina (Olson, 1986).

3. Metabolismo Intracelular.

a. Incorporación intracelular del retinol plasmático unido a la RBP.

Una vez que el retinol se encuentra unido a la RBP, éste requiere ser interiorizado por las diferentes poblaciones celulares en las que actúa. Aunque se sugiere la existencia de un receptor de membrana para la RBP necesario para que la célula sea capaz de incorporar el retinol unido a la RBP circulante, la existencia de dicho receptor no se ha comprobado fehacientemente. La propuesta más aceptada para la incorporación celular del retinol unido a la RBP es que el retinol es capaz de atravesar libremente la membrana plasmática. (Blaner, 1993)

b. Proteínas que unen a los retinoides.

A nivel intracelular los retinoides también se encuentran unidos a proteínas. En la tabla 3 se presentan algunas de estas proteínas conocidas como proteínas intracelulares no nucleares que unen a los retinoides. Para los fines de este trabajo solo se describirán brevemente 4 de las proteínas intracelulares que unen a retinoides que están estrechamente relacionadas con las vías de señalización del AR. Estas proteínas son las proteínas celulares que unen al retinol tipos I y II (CRBP-I y CRBP-II respectivamente) y las proteínas celulares que unen al AR tipos I y II (CRABP-I y CRABP-II). Estas proteínas son de alta afinidad y especificidad y se expresan en todos los vertebrados, presentando

filogenéticamente una gran homología. La CRBP-I y la CRBP-II unen al retinol y al retinal y no unen al AR, mientras que la CRABP-I y la CRABP-II son específicas para el AR y algunos de sus metabolitos (Napoli, 1999).

Tabla 3. Proteínas intracitoplásmicas que unen retinoides presentes en mamíferos.

Retinol y retinal como ligando

Proteína celular que une al retinol tipo I (CRBP-I)

Proteína celular que une al retinol tipo II (CRBP-II)

Ácido retinoico (AR) como ligando.

Proteína celular que une AR tipo I (CRABP-I)

Proteína celular que une AR tipo II (CRABP-II)

Retinal como ligando

Proteína celular que une al retinal (CRALBP)

Modificada de Blaner, 1993.

La CRBP-I se ha identificado en una gran cantidad de tejidos adultos y embrionarios. La CRBP-I se encuentra principalmente en el citoplasma aunque también se ubica en otros organelos subcelulares incluido el núcleo (Olson, 1986). La CRBP-I encapsula al retinol y lo aísla del medio celular con el grupo funcional hidroxilo enterrado en lo profundo de la proteína. La CRBP-I se encuentra en mucho mayor concentración que el retinol libre, une al retinol de manera muy selectiva y una vez unido el retinol a ella la disociación ocurre de manera muy lenta (Napoli, 1999). Las funciones potenciales de la CRBP-I son favorecer la síntesis de AR, optimizar el almacenamiento de los retinoides y protegerlos de reacciones celulares no enzimáticas de tipo nucleofílicas, electrofílicas u oxidantes (Napoli, 1999; Ross et al; 2000). La CRBP-II se expresa principalmente en el intestino delgado y participa en el proceso de absorción del retinol y el retinal (Napoli, 1999). La CRABP-I es una proteína citosólica que expresa en muchos tejidos tanto embrionarios como adultos. La CRABP-I se encuentra en altas concentraciones con respecto al AR y tiene una alta afinidad por este sustrato, lo que trae como consecuencia que la mayoría del AR presente en la célula está unido a ella (Napoli, 1999; Olson, 1986). Se ha postulado que la CRABP-I tiene una función dual dependiendo de las señales humorales presentes en el medio. Por una parte la CRABP-I acarrea al AR del citoplasma al núcleo para que éste

lleve acabo sus acciones genómicas y por otra parte protege a la célula de una sobreexposición celular al AR. Este efecto protector se debe, por un lado a que las enzimas catabólicas del AR reconocen como sustrato al complejo CRABP-I/AR; por otra parte, que la sobreexpresión de la CRABP-I disminuye la sensibilidad de las células al AR y, finalmente, a que el AR regula negativamente la expresión de la CRABP-I (Gottesman, Quadro & Blaner, 2001; Napoli, 1999; Ross et al., 2000; Wei et al., 1997). Es importante señalar que la CRABP-I también es regulada negativamente por la T3 (Wei et al., 1997). Por su parte, la CRABP-II es una proteína que en el adulto se expresa principalmente en la piel; sin embargo durante todo el desarrollo embrionario la CRABP II se expresa en todos los tejidos y rara vez se expresa junto con la CRABP-I (Gottesman, Quadro & Blaner, 2001). Dentro del metabolismo del AR se postula que la CRABP-II tiene papeles diferentes a los de la CRABP-I. Se sugiere que la CRABP-II se expresa principalmente en los tejidos capaces de sintetizar su propio AR ya que ésta se expresa junto con la CRBP-I y las enzimas retinaldehído deshidrogenasas responsables de la síntesis del AR (Napoli, 1999; Ross et al., 2000). También se ha descrito que la CRABP-II transporta el AR al núcleo y actúa como un regulador transcripcional de la señalización del AR (Delva et al., 1999).

A estas proteínas intracelulares que unen a los retinoides no se les considera del todo esenciales, ya que ratones mutantes con pérdida de la función de una de las siguientes proteínas, CRBP-I, CRABP-I y CRABP-II no presentan grandes alteraciones en el desarrollo, fertilidad, vida cotidiana y conducta (Gottesman, Quadro & Blaner, 2001; Ross et al., 2000). En el caso de ratones con deficiencias de CRABP-I y de CRABP-II hay un incremento en la frecuencia de presentar malformaciones en las extremidades (Gottesman, Quadro & Blaner, 2001).

c. Síntesis de retinal y ácido reinoico.

El retinol es el precursor del retinal y del AR. El retinal participa en el ciclo de la visión como un pigmento que absorbe luz en la retina mientras que los isómeros del AR regulan la expresión de genes que están involucrados en el crecimiento, desarrollo y diferenciación celular (Duester, 2000). En términos generales la síntesis de retinal se da por la oxidación del retinol y la síntesis de AR está dada por la oxidación del retinal. Se ha encontrado que en estas bioconversiones pueden estar involucradas una gran variedad de enzimas, las cuales son miembros de tres familias: La familia de las alcohol deshidrogenasas (ADH), la familia de las deshidrogenasas/reductasas de cadena corta (SDR) y la familia de las aldehído deshidrogenasas (ALDH) (tabla 4) (Duester, 2000).

Tabla 4. Enzimas con actividad de retinoide deshidrogenasa en cordados.

Enzimas/Familia	Otros nombres	Homólogos identificados en diferentes especies
Familia de las alcohol deshidrogenasas (ADH)		
ADH1	ADH Clase I α, β, γ , <i>hADH1,2,3</i>	Humano, pez, pollo, rana, rata, ratón
ADH2	ADH Clase II, π , ADHII, <i>hADH4</i>	Avestruz, humano, rata, ratón
ADH4	ADH clase IV, σ, μ , <i>hADH7, mAdh7, mAdh3</i>	Humano, rana, rata, ratón
ADH7	ADH clase VII, ADH-F	Pollo
ADH8	ADH clase VIII, ADH dependiente de NADP(H)	Rana
Familia de las deshidrogenasas/reductasas de cadena corta (SDR).		
RoDH1	RoDH(I)	Rata, ratón
RoDH2	RoDH(II)	Rata, ratón
RoDH3	RoDH(III)	Rata
RoDH4	hRGH-E	Humano
CRAD1		Ratón
CRAD2		Ratón
RDH5	11- <i>cis</i> -RDH, RDH4, 9cRDH	Bovino humano, ratón
RetSDR1		Bovino, humano, ratón
Familia de las aldehído deshidrogenasas (ALDH)		
ALDH1	ALDH clase I, Ahd2, RALDH, RaiDH(i)	Humano, pollo, rana, rata, ratón
ALDH6	Enzima VI	Humano, pollo, ratón
RALDH2	RADLDH-2, RaiDH (II), enzima V2	Humano, pollo, rata, ratón
ALDH-t		Tunicado

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Modificada de Duester, 2000.

Las ADHs son miembros de la familia de las enzimas deshidrogenasa/reductasa de cadena media, integrada típicamente por enzimas que tienen subunidades de aproximadamente 350 residuos de aminoácidos con

sitios activos que tienen un átomo de zinc catalítico. Las ADHs tienen una amplia gama de sustratos y son responsables del metabolismo del etanol y ciertos aldehídos y alcoholes de importancia fisiológica incluidos el retinol y el retinal. Las enzimas de las familias de las ADH y las SDR son las encargadas de oxidar el retinol para formar el retinal. En la tabla 5 se muestran algunas características de miembros de las familias ADH, SDR y ALDH con actividad de retinoide deshidrogenasa (Duester, 2000).

Tabla 5. Características de las enzimas con actividad de retinoide deshidrogenasa.

Familia/Enzimas	Tejidos en que se expresa	Ubicación celular	Cofactor	Substrato
Familia de las ADHs				
ADH1	Hígado, riñón, adrenales, testículos, epidídimo, útero, ovario, varios tejidos embrionarios	Citosol	NAD	Oxidación: todo- <i>trans</i> retinol y 9- <i>cis</i> retinol
ADH2	Hígado adulto	Citosol	NAD	Oxidación: todo- <i>trans</i> retinol y 9- <i>cis</i> retinol
ADH4	Tejidos oculares, adrenales, piel, epitelio intestinal	Citosol	NAD	Oxidación: todo- <i>trans</i> retinol y 9- <i>cis</i> retinol
Familia de las SDRs				
RoDH1	Hígado	Microsomas	NADP	Oxidación: del todo- <i>trans</i> retinol unido a CRBP-I ^p , todo- <i>trans</i> retinol libre y reconoce como sustrato andrógenos
RoDH2	Hígado, riñón, en cantidades traza en pulmón, cerebro y testículos	Microsomas	NADPH	Oxidación: todo- <i>trans</i> retinol y reconoce como sustrato androgéos
CRAD1 ^a	Riñón, hígado y corazón	Microsomas	NAD	Oxidación: 9- <i>cis</i> retinol, 11- <i>cis</i> retinol, 9- <i>cis</i> retinal, 11- <i>cis</i> retinal y reconoce como sustrato andrógenos
RDH5	Epitelio pigmentado	Microsomas	NAD	Oxidación: 11- <i>cis</i> retinol (ciclo de la visión) y 9- <i>cis</i> retinol, y reconoce como sustrato andrógenos
RetSDR1	Retina	Microsomas	NADPH	Reducción: todo- <i>trans</i> retinal (ciclo de la visión) y 9- <i>cis</i> retinol
Familia de las ALDHs				
ALDH1	Hígado, riñón, testículos	Citosol	NAD	Oxidación: todo- <i>trans</i> retinal libre y unido a CRBP-I ^p y 9- <i>cis</i> retinal
ALDH6	Retina	Citosol	NAD	Oxidación: todo- <i>trans</i> retinal
RALDH2	Tejidos adultos: Hígado, pulmón, testículos, corazón, cerebro, riñón y tejidos embrionarios.	Citosol	NAD	Oxidación: todo- <i>trans</i> retinal y unido a CRBP

ADH: enzimas alcohol deshidrogenasas, SDR: enzimas deshidrogenasas/reductasas de cadena corta, ALDH: enzimas aldehído deshidrogenasas.
^a CRAD: deshidrogenasa de los *cis*-retinoides/adrogénos. ^b CRB-I, proteína celular que une retinol tipo I. Datos tomados de Duester, 2000, Napoli, 1999 y Napoli, 1996.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

A la fecha ha sido difícil establecer cuál o cuáles de estas enzimas identificadas *in vitro* son capaces de sintetizar *in vivo* el retinal a partir del retinol. Debido a que la enzima RoDH1, perteneciente a la familia de las SDR, es capaz de reconocer como sustrato al complejo CRBP-I/retinol se cree que ésta es la enzima "específica" para llevar a cabo este proceso *in vivo*. Esta atribución se debe a que la mayor parte del retinol presente en la célula se encuentra unido a la CRBP-I. Por esta razón se dice que el complejo CRBP-I/retinol previene la oxidación "enzimática inespecífica" del retinol por las enzimas de la familia de las ADH que sólo reconocen como sustrato al retinol libre (Duester, 2000; Napoli, 1999). Cabe señalar que la RoDH1, y en general la familia de las SDR también tienen como sustrato a algunos andrógenos, lo que las convierte en enzimas "inespecíficas de retinoides". Conceptualmente la asociación de la regulación entre retinoides y andrógenos resulta interesante, toda vez que ambos grupos de compuestos ejercen acciones a través de receptores intracelulares agrupados en una misma familia (Napoli, 1999).

Por otra parte, la síntesis del AR se lleva a cabo por la oxidación del retinal. Se han propuesto como las mejores candidatas de la acción de retinal deshidrogenasa a las enzimas ALDH1 y RALDH2; ambas enzimas reconocen como sustrato al retinal libre y al complejo CRBP-I/retinal (Napoli, 1999). La ALDH1 de rata reconoce con alta especificidad al 9-*cis* retinal, por lo que se le considera la principal vía de síntesis del 9-*cis* AR (Napoli, 1996). En la figura 4 se muestran las posibles vías de síntesis del retinal y del AR.

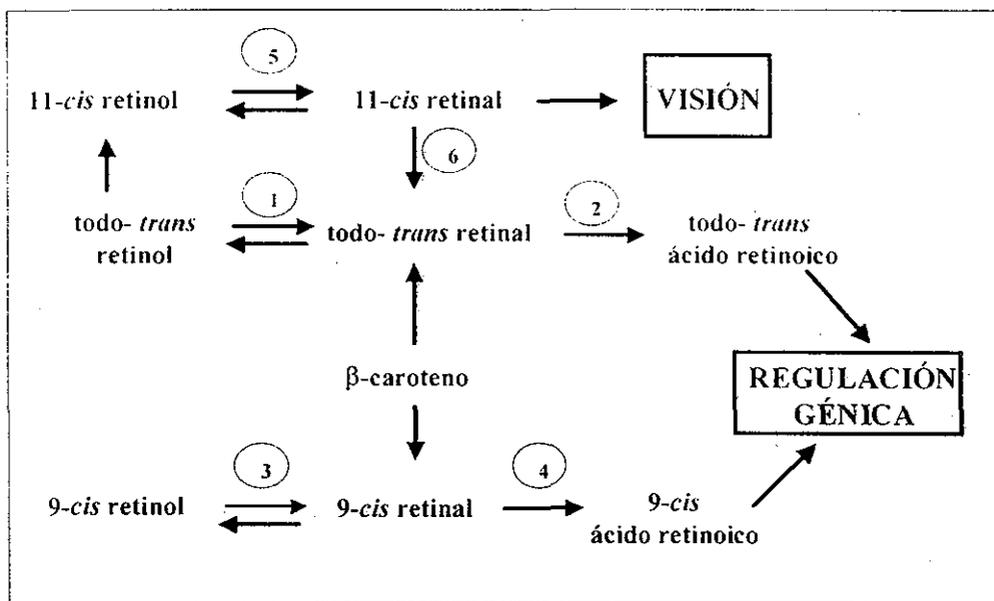


Figura 4. Rutas metabólicas de los retinoides catalizadas por enzimas con actividad de retinoide deshidrogenasa. Tanto el retinal como el ácido retinoico (AR) tienen acciones importantes dentro del organismo. El retinal participa en el ciclo de la visión como parte del pigmento rodopsina y es el precursor del AR. Por su parte los isómeros del ácido retinoico participan en la regulación de genes involucrados en la diferenciación celular. La reacción reversible de oxidación/reducción de los isómeros retinol y retinal (reacciones 1, 3 y 5) las llevan a cabo varios miembros de las familias de las alcohol deshidrogenasas (ADHs) y de la familia de las enzimas deshidrogenasas/reductasas de cadena corta (SDR). Las ADHs y SDRs prefieren al NAD(H) como cofactor cuando catalizan la oxidación del retinol y prefieren al NADP(H) como cofactor cuando catalizan la reducción del retinal. La reacción 1 la llevan a cabo las enzimas ADH1, 2, 4, 7 y 8 de la familia de las ADH y las enzimas RoDH1,2, retSDR1 de la familia de las SDR. La reacción 3 la llevan a cabo las enzimas ADH1, 2, 4 y 8 de la familia de las ADH y las enzimas RDH5 y CRAD1 de la familia de las SDR. La reacción 5 la llevan a cabo las enzimas RDH5 y CRAD1 y 2 de la familia de las SDR. La oxidación irreversible de los isómeros de retinal a AR la llevan a cabo los miembros de la familia de las aldehído deshidrogenasas (reacciones 2 y 4) y todas ellas utilizan al NAD como cofactor. La reacción 2 la llevan a cabo las enzimas ALDH1, ALDH6 y RALDH2, mientras que la reacción 4 solo la lleva a cabo la enzima ALDH1. La reacción 6 es catalizada por la luz. Modificada de Duester, 2000.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

III. RECEPTORES A TIRONINAS Y ÁCIDO RETINOICO.

Los efectos biológicos de la T3 y el AR son mediados por sus receptores que se localizan en el núcleo de las células. Estos receptores son factores de transcripción dependientes de ligando que pertenecen a la superfamilia de receptores nucleares. En esta superfamilia también se incluyen a los receptores a hormonas esteroides, vitamina D, y el receptor de activación de la proliferación de los peroxisomas (PPAR), entre otros (Mangelsdorf et al., 1995). Estos receptores se unen a secuencias específicas del DNA de genes blanco llamadas elementos responsivos a hormonas (HREs); de este modo y con su respectivo ligando unido activan la transcripción de genes. La unión al DNA de los receptores a tironinas (TR) y al AR (subfamilias RAR y RXR) se da por la formación de complejos homodiméricos (TR-TR) o heterodiméricos (TR-RXR) (Yen, 2001). De hecho, a principios de la década de los 90's se empezaron a estudiar las interacciones entre los TR con los RAR y RXR, ya que tenían estructuras similares y al menos una redundancia parcial de funciones (Williamns et al., 1992). Se evidenció que tanto la T3 como el AR tenían efectos profundos en el desarrollo de los vertebrados, y que ambos tenían órganos blanco en común como eran el hígado, el cerebro y los huesos (Williamns et al., 1992). No es casualidad que los individuos con hipotiroidismo e hipovitaminosis A compartan algunos signos clínicos como son las malformaciones neuronales, la falta de crecimiento y la infertilidad (Larsen, Davies & Hay, 1998; McDowell, 1989). De hecho se sabe que el distiroidismo afecta el metabolismo de la vitamina A y que la deficiencia de esta vitamina afecta el estado tiroideo (DeGroot et al., 1984; Dunn & Dunn, 2000; Rivlin, 1996). En la actualidad se han descrito algunos genes que son regulados tanto por la T3 como por el AR; esta regulación es muy compleja y poco entendida, ya que depende de muchos factores. Entre esos factores se encuentran la disponibilidad de los ligandos, las complejas interacciones entre los receptores y otros factores de transcripción y de los HREs específicos para cada tipo receptor (Breen, Hickok & Gurr, 1997; Crowe et al., 1996; Köhrle, 1999a; Toyoda et al., 1995; Stephanopu & Handwerger, 1995; Williamns et al., 1992, Yen, 2001). Más información sobre los TR, RAR y RXR se encuentra en el Anexo I.

IV. PAPEL DE LAS TIRONINAS Y LOS RETINOIDES EN EL DESARROLLO DE LA GLÁNDULA MAMARIA NORMAL Y NEOPLÁSICA.

En la glándula mamaria diferenciada se distinguen básicamente dos componentes principales: El parénquima que forma un sistema de conductos ramificados con alvéolos secretores, y el estroma que da el sustrato donde el parénquima se desarrolla, alimenta y funciona (Medina, 1996). El parénquima está formado por células mioepiteliales y epiteliales lumbinales (ductales y alveolares) mientras que el estroma esta formado por fibroblastos, adipocitos, vasos sanguíneos y abundante matriz extracelular (Lochter, 1998). Al nacimiento, el epitelio glandular consiste de pequeños conductos arborizados con primordios alveolares en su porción terminal (Medina, 1996). Los primordios alveolares son estructuras especializadas que tienen la mayor proliferación durante la pubertad y son las que darán origen durante la gestación a los alvéolos encargados de sintetizar y secretar la leche (Lochter, 1998). Al inicio de la pubertad el epitelio mamario crece alométricamente y se empiezan a desarrollar los conductos y alvéolos (Medina, 1996). En las hembras juveniles y adultas nulíparas se da un proceso cíclico de proliferación-diferenciación-apoptosis en el epitelio glandular que es regulado primordialmente por las hormonas del ciclo menstrual (Dickson & Lippman, 1995; Medina, 1996). Durante la gestación ocurre una rápida e intensa proliferación celular, y se lleva a cabo la diferenciación terminal alveolar que trae como consecuencia la capacidad de sintetizar la leche (Lochter, 1998; Medina, 1996). Una vez que cesa la lactancia, los alvéolos sufren de un proceso apoptótico masivo y de remodelación del estroma denominado involución, que da como resultado un epitelio mamario muy similar al que se tiene antes de la gestación (Lochter, 1998; Medina, 1996).

La proliferación y diferenciación del epitelio mamario están regulados por una gran variedad de mensajeros neuroendócrinos entre los que se incluyen a los esteroides (estradiol y progesterona), hormonas peptídicas (prolactina, lactógeno placentario), tironinas, factores de crecimiento, catecolaminas, etc (Dickson & Lippman, 1995; Medina, 1996). Estos mensajeros actúan directamente y se

conoce que también participan en la síntesis y liberación de otros factores locales paracrinos, autocrinos y juxtacrinos, tanto en el parénquima como en el estroma mamarios (Dickson & Lippman, 1995). La compleja interacción entre los mensajeros neuroendócrinos y los factores locales explican la progresiva y dinámica proliferación/diferenciación/involución de la glándula mamaria, desde la pubertad hasta la menopausia. Lamentablemente esta plasticidad bioquímica y morfológica de la glándula mamaria también es el reflejo de la alta susceptibilidad de su epitelio a la transformación maligna (Dickson & Lippman, 1995; Lochter, 1996; Medina, 1996). El cáncer mamario representa la cuarta neoplasia más común a nivel mundial, del cual el 80% es de origen epitelial (WHO, 1999; Lochter, 1996).

Tanto las tironinas como los retinoides participan en la regulación del desarrollo de la glándula mamaria, y se les ha involucrado en la etiología y desarrollo del cáncer mamario (González-Sancho et al., 1999; Lee et al., 1995a; Lee et al., 1995b; Prakash, Krinsky & Russell, 2000; Vonderhaar & Greko, 1979; Yang et al., 1999). Ambos mensajeros regulan la expresión génica a nivel transcripcional vía sus receptores nucleares, de hecho existe una compleja interacción entre su metabolismo y señalización.

El papel que juegan los retinoides en la glándula mamaria normal y neoplásica es muy variado. El epitelio mamario humano es capaz de incorporar *retinol del medio* y *sintetizar localmente AR*, o *tomar directamente del espacio extracelular AR* (Hayden et al., 2001; Mira-Y-López et al., 2000). Utilizando cultivos primarios se describieron algunos efectos de los retinoides sobre la glándula mamaria. Dichos efectos son: a) participan en la diferenciación del tejido alveolar; b) favorecen la síntesis de caseína; c) disminuyen la proliferación e inducen la apoptosis de algunas de las células alveolares y d) suprimen la aparición de fenotipos anormales (Lee et al., 1995a y 1995b). En el cáncer mamario los retinoides pueden inhibir la proliferación celular disminuyendo la expresión de promotores del crecimiento celular (e.g. AP-1) o incrementando la expresión de inhibidores del crecimiento (e.g. TGF- β). Los retinoides también pueden inducir diferenciación o apoptosis en las células cancerosas (Yang et al. 1999). Por otra

parte, el metabolismo de los retinoides en el cáncer mamario esta deteriorado. Se ha observado que las células cancerosas de mama no sintetizan AR y expresan pobremente la CRBP-I (Kuppumbatti et al., 2000; Mira-Y-López et al., 2000). Sin embargo parecen expresar un mayor cantidad de CRABPs (Küng et al., 1980; Metha et al., 1982a). En cuanto a la expresión de RARs y RXRs hay información controvertida. Lo más claro parece ser que en el cáncer mamario hay una reducción en la expresión de RAR β , y que la expresión RAR α correlaciona positivamente con la capacidad de respuesta de la célula maligna al AR (Yang et al., 1999). A nivel epidemiológico se ha descrito que el consumo adecuado de vitamina A así como de sus precursores es un factor preventivo de cáncer mamario (Prakash, Krinsky & Russell, 2000; Yang et al., 1999).

Por su parte las tironinas regulan el desarrollo alveolar participando tanto en los procesos de proliferación y diferenciación, además de que promueven la síntesis de α -lactoalbúmina (Bhattacharjee & Vonderhaar, 1984; Vonderhaar & Greko, 1979). En cuanto a la relación entre las tironinas y cáncer mamario, se ha establecido que los pacientes con este tipo de cáncer presentan una mayor prevalencia de desordenes tiroideos (Giani et al., 1996; Smyth et al., 1998). Aunque no se ha establecido una relación causal entre estas enfermedades, los padecimientos tiroideos que predominan en los pacientes con cáncer mamario son el bocio no tóxico, el hipotiroidismo y enfermedades autoinmunes de la tiroides (Giani et al., 1996; Smyth et al., 1998). Por otra parte, en estudios *in vitro* se demostró que la T3 es capaz de inhibir la expresión de la tenascina-C en células epiteliales mamarias. La tenascina-C es una glicoproteína de matriz extracelular que tiene múltiples efectos a nivel morfológico y de diferenciación. La tenascina-C induce el crecimiento y motilidad celular y también tiene efectos inmunosupresivos y angiogénicos. Esta proteína la expresan tanto las células epiteliales como las del estroma de la glándula mamaria normal y neoplásica. Altos niveles de expresión de la tenascina-C correlacionan con mayor malignidad del tumor y es un mal pronóstico (González-Sancho et al., 1999). Otro factor involucrado en la fisiología tiroidea que esta relacionado con la génesis y desarrollo del cáncer mamario es el yodo. Observaciones epidemiológicas recientes colocan al yodo como un posible

factor de protección contra el cáncer mamario, prostático y tiroideo (Cann, van Netten & van Netten, 1999; Feldt-Rasmussen, 2001; Venturi & Venturi, 1999). Utilizando modelos animales, se ha visto que tratamientos con alimentos ricos en yodo (algas), yoduro de potasio (KI) administrado en el agua de beber o KI más progesterona inhiben la progresión tumoral y aumentan los procesos de apoptosis tumoral, dando como resultado una disminución en el tamaño de los tumores (Funahashi et al., 1999; Funahashi et al., 1996). Estos estudios sugieren que el yodo puede estar actuando directamente como un protector del DNA por su potente acción antioxidante, o bien indirectamente como un factor regulador (en la generación local o en sus receptores) de otros mensajeros involucrados en la diferenciación celular como hormonas tiroideas, retinoides, esteroides, etc (Venturi & Venturi, 1999). La glándula mamaria lactante es capaz de captar yodo vía la expresión del simporter sodio/yodo (NIS) el cual también se expresa en la tiroides (Kogai et al., 2001). La expresión del NIS en la glándula mamaria lactante es regulada por la succión y aunque no se conoce el mecanismo íntimo de dicha regulación, se ha demostrado que la oxitocina y el β -estradiol tienen un papel primordial (Riedel et al., 2001). Algunos tumores malignos de mama también expresan el NIS, pero tienen una menor capacidad de incorporar yodo que la glándula mamaria lactante. La poca capacidad de captar yodo del tumor maligno se ha atribuido a la presencia de un factor autoinmune presente en el suero de los pacientes (Kilbane et al., 2000). Las líneas celulares de cáncer mamario MDA-MB-231 y MCF-7 no expresan el NIS de manera basal, sin embargo el AR incrementa la captación de yodo en las células MCF-7 estimulando la expresión de NIS (Kogai et al., 2001).

Hasta el momento se ha descrito que modificaciones en el metabolismo intracelular de los retinoides, T3 y yodo pueden jugar un papel en la etiología y desarrollo del cáncer mamario y es aquí donde las desyodasas de la vía 5'D cobran un papel relevante, ya que a partir de T4 generan T3 y yodo libre. Además, como se comentará enseguida, la D1 bajo ciertas circunstancias es susceptible de ser estimulada por el AR. En la región promotora del gen de la D1 humana (*hdio1*) se han identificado y caracterizado funcionalmente dos complejos de elementos

responsivos a la T3 y al AR: los complejos TRE-RARE (Köhrle, 1999a; Toyoda et al., 1995). Estos elementos le confieren al *hdio1* la capacidad de respuesta observada tanto *in vivo* como *in vitro* a la T3 y al AR. El Complejo TRE-RARE más proximal al sitio de inicio de la transcripción es un repetido directo de 12 nucleótidos de separación (DR12). El complejo TRE-RARE más distal al sitio de inicio la transcripción es un DR4 + 2 es decir que hay dos sitios mitad separados por 4 nucleótidos y un tercer sitio mitad separado por 2pb del DR4 (Köhrle, 1999a). Ambos complejos TRE-RARE pueden mediar la respuesta del *hdio1* al AR y a la T3, pero se ha observado que ésta es diferencial y depende del contexto fisiológico de la célula.

Cabe destacar que la T3 y el AR no son los únicos compuestos que pueden regular la actividad de la D1; De hecho, se conocen muchos otros de naturaleza muy variada como son: hidratos de carbono, selenio, TSH, corticosteroides, catecolaminas, etc. Cada uno de estos factores regula la actividad desyodativa de manera órgano-específica. Aunado a lo anterior, los procesos patológicos tumorales se acompañan de cambios en la regulación de esta enzima. Así por ejemplo, en el hígado normal de rata, la D1 responde positivamente a la T3, mientras que en la línea celular humana HepG2 (carcinoma hepatocelular) esta enzima es estimulada tanto por la T3 como por AR (Schreck et al., 1994; Toyoda et al., 1995). En líneas celulares de tirocitos de rata la síntesis de la D1 es estimulada por TSH y T3, pero no responde al AR. Líneas celulares humanas de cáncer folicular tiroides no responden a la T3 ni a la TSH pero si lo hacen al AR. Además, células de tipo anaplásico de cáncer de tiroides no desyodan y son refractarias a TSH, T3 o AR. Estas observaciones han servido de base para proponer que una pérdida en la desyodación pueda ser considerada como un marcador de desdiferenciación celular.

JUSTIFICACIÓN.

Los hallazgos antes mencionados nos motivaron a analizar si las células tumorales mamarias mantienen su capacidad de desyodación y si ésta es regulada de la misma manera que en el epitelio mamario normal. Para abordar este problema se utilizaron las líneas celulares derivadas de cáncer mamario humano MCF-7 y MDA-MB-231. Las cuales pueden considerarse que representan diferentes estados de desdiferenciación principalmente por tres aspectos: 1) expresión de receptores a estrógenos y progesterona, 2) la expresión de la proteína típica del epitelio alveolar diferenciado, la caseína y 3) la inducción por AR de la expresión del NIS. Las células MCF-7 son positivas a todos ellos y, por tanto, se consideran un tipo celular menos desdiferenciado, mientras que las células MDA-MB-231 son negativas, es decir es un tipo celular más desdiferenciado (Constantinou, Krygier & Metha, 1998; Dickson & Lippman, 1995; Eithier, 1996; Hay et al., 1994; Kogai et al., 2001). Además, estas últimas células presentan también mayores cocientes de proliferación e invasión tanto *in vivo* como *in vitro*, tienen una morfología nuclear más aberrante y pérdida de mediadores bioquímicos de la morfología epitelial (Dickson & Lippman, 1995). También presentan una expresión alterada de receptores a factores de crecimiento (altos niveles de receptores al factor crecimiento epidermal y erbB₂ y bajos niveles de receptores a IGF-I) (Dickson & Lippman, 1995).

HIPÓTESIS.

El grado de desdiferenciación celular de las neoplasias estará en relación directa con la pérdida en la capacidad de producción local de T3. Esta pérdida en el funcionamiento de la desyodasa se manifestará en las células menos desdiferenciadas (MCF7) como una disminución en su respuesta a agentes fisiológicos como T3, ISO y una mayor sensibilidad a AR. Por el contrario, la línea celular más desdiferenciada (MDA-MB-231) mostrará una pérdida total en la expresión de la enzima y una ausencia total de respuesta a los agentes fisiológicos.

OBJETIVOS.

I. OBJETIVO GENERAL.

Caracterizar bioquímica y funcionalmente el tipo de desyodación presente en dos líneas celulares derivadas de cáncer mamario humano.

II. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- Establecer las condiciones óptimas de cultivo para las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB 231.
- Analizar el tipo y cantidad de desyodación expresada en ambas líneas celulares usando concentraciones de sustratos, cofactores e inhibidores específicos.
- Caracterizar la respuesta desyodativa a T3, ISO y AR. (dosis y tiempos).

HIPÓTESIS.

El grado de desdiferenciación celular de las neoplasias estará en relación directa con la pérdida en la capacidad de producción local de T3. Esta pérdida en el funcionamiento de la desyodasa se manifestará en las células menos desdiferenciadas (MCF7) como una disminución en su respuesta a agentes fisiológicos como T3, ISO y una mayor sensibilidad a AR. Por el contrario, la línea celular más desdiferenciada (MDA-MB-231) mostrará una pérdida total en la expresión de la enzima y una ausencia total de respuesta a los agentes fisiológicos.

OBJETIVOS.

I. OBJETIVO GENERAL.

Caracterizar bioquímica y funcionalmente el tipo de desyodación presente en dos líneas celulares derivadas de cáncer mamario humano.

II. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- Establecer las condiciones óptimas de cultivo para las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB 231.
- Analizar el tipo y cantidad de desyodación expresada en ambas líneas celulares usando concentraciones de sustratos, cofactores e inhibidores específicos.
- Caracterizar la respuesta desyodativa a T3, ISO y AR. (dosis y tiempos).

MATERIALES Y MÉTODOS.

I. MATERIALES.

La [125 I] triyodotironina reversa ($[^{125}\text{I}]\text{rT3}$) (Actividad específica, 1174 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$) se adquirió de New England Nuclear (Boston, MA). La triyodotironina reversa no radioactiva fue obtenida de Henning Co. (Berlín, Alemania). El Ditiotreitól (DTT) se obtuvo de Calbiochem (La Jolla, CA). El Isoproterenol (ISO), el H_2SeO_3 se adquirieron de Aldrich Chemical, Co. (Milwaukee, WI). La T3, el todo-*trans* AR y el 9-*cis* AR se obtuvieron de Sigma Chemical, Co. (St Louis, MO). El reactivo de Bradford fue de BIO-RAD Laboratories (Hércules, CA). El suero fetal de bovino (SFB), la solución de tripsina-EDTA (0.05% de tripsina, 0.4g/L EDTA·4Na), la solución de antibióticos penicilina /estreptomicina, el medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) alto en glucosa fueron de GIBCO BRL (Grand Island, NY). Las cajas de cultivo fueron de Corning (Corning, NY). El resto de los reactivos fueron de alta pureza disponibles comercialmente.

II. MÉTODOS.

A. CULTIVOS CELULARES.

Las líneas celulares utilizadas fueron la MCF-7 número de la American Type Culture Collection (ATCC) HTB-22, la MDA-MB- 231 (No. ATCC HTB-26) y la HepG2 (No. ATCC HB-8065) (Hay et al., 1994). Las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB- 231 fueron obsequiadas por el Instituto Nacional de Cancerología de México. La línea HepG2 se compró en la ATCC (Manassas,VI). Todas las líneas celulares se cultivaron en DMEM adicionado con 10% de SFB, 3 nM H_2SeO_3 , 100 U/mL de penicilina y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de estreptomicina y se incubaron a 37° C en una atmósfera húmeda de 90% de aire y 10% de CO_2 . Para los experimentos las células se inocularon a una densidad de 1.8×10^4 células/ cm^2 en cajas de cultivo

celular con 6 pozos (cada pozo de 34.8 mm de diámetro). Cuando las células alcanzaron 85-90% de confluencia se cambiaron las condiciones de cultivo a medio base más diferentes concentraciones de ISO, T3, 9-*cis* AR y todo-*trans* AR. Dependiendo del protocolo de cultivo, las células también permanecieron durante diferentes tiempos (12, 24 y 48 horas) con concentraciones seleccionadas de los compuestos arriba mencionados y durante el tratamiento no hubo ningún cambio de medio. Dado que los retinoides se disolvieron en etanol absoluto, se utilizó como control un tratamiento que contenía la misma cantidad de etanol presente en los tratamientos con retinoides. La concentración de etanol utilizada fue menor al 0.1% (v/v). Las diluciones de los retinoides en el medio de cultivo se hicieron de soluciones concentradas en el momento previo a la aplicación de los tratamientos. Todas las manipulaciones de los retinoides se hicieron protegiéndolos de la luz. En la figura 5 se muestra una fotografía de los cultivos con las células MCF-7 y MDA-MB-231.

B. EXTRACCIÓN DE LAS CÉLULAS.

Pasado el tiempo seleccionado para los diferentes tratamientos las células se extrajeron. Para extraer las células primero se retiró el medio de cultivo de las cajas y se agregó solución amortiguada de fosfatos (PBS). El volumen de PBS utilizado fue el mismo que el del medio de cultivo en que se encontraban las células. Posteriormente se retiró el PBS y se adicionó a cada pozo de cultivo 500 μ L de solución de tripsina-EDTA y se incubaron por 10 minutos. Pasado el tiempo de incubación a cada caja de cultivo se adicionó 1 mL de DMEM suplementado con 10% de SFB y 100 U/mL de penicilina y 100 μ g/mL de estreptomicina. La suspensión celular formada se centrifugó a 2000 rpm por 2 minutos para formar el paquete celular. Se retiró el sobrenadante y se adicionó 300 μ L de la solución 10 mM HEPES (pH 7.0) con 0.32 M de sacarosa, 1 mM de EDTA y 10 mM de DTT (HEPES) a 4°C. Las muestras se congelaron inmediatamente en hielo seco y se almacenaron a -70 °C hasta su uso.

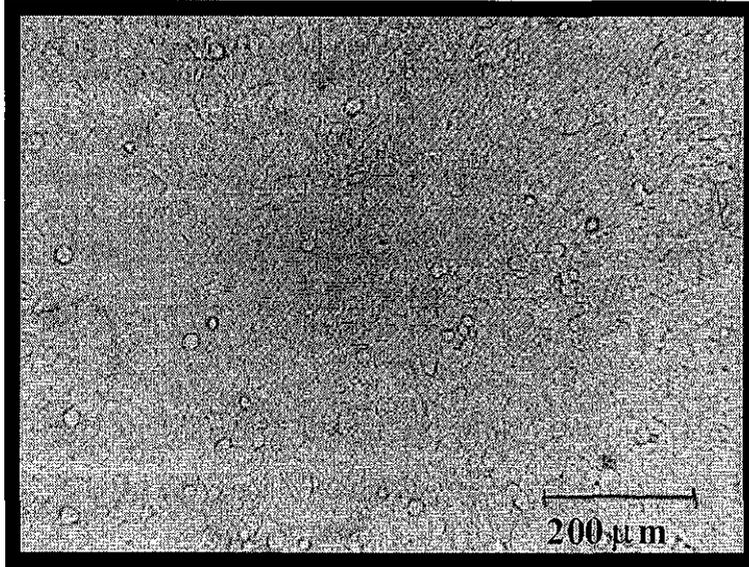
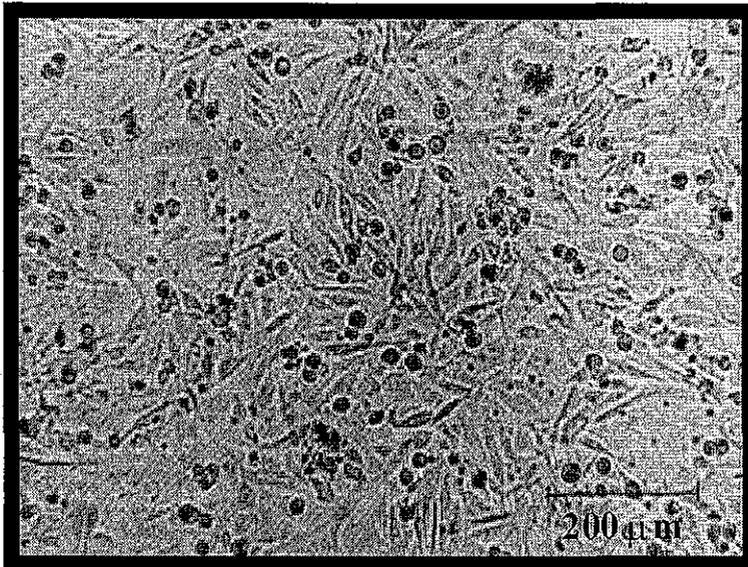
A**B**

Figura 5. Fotografías de las células (A) MCF-7 y (B) MDA-MB-231 mantenidas en cultivo (Amplificación 100x). Ambas líneas celulares inocularon a una densidad de 1.8×10^4 células/cm² y se cultivaron en DMEM adicionado con 10% de SFB, 3 nM H₂SeO₃, 100 U/mL penicilina y 100 μg/mL estreptomicina. Todos los cultivos se incubaron a 37 °C en una atmósfera húmeda, 95% aire y 5 % CO₂. Las fotografías se tomaron después de 4 días de cultivo.

C. CUANTIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD DESYODATIVA.

La actividad 5'D se determinó por el método de liberación de radioyodo modificado de Leonard et al. (1980), y estandarizado en nuestro laboratorio (Aceves & Valverde 1989). Dependiendo del tipo celular se hicieron dos ensayos de desyodación. El primero de ellos se diseñó para determinar si las células expresaban actividad 5'D y que tipo de desyodasa tenían. Para este ensayo se preparó por duplicado una mezcla radioactiva con $\approx 100 \mu\text{g}$ de proteína de la muestra a analizar, 2 nM de [^{125}I]rT3, 20 mM de DTT con y sin 1 mM de PTU. En algunos ensayos de desyodación se utilizó como control positivo un homogeneizado de glándula mamaria de rata primípara (Sprague Dawley) con 10 días de lactancia. El tejido se homogeneizó con un Politron en la solución de HEPES y se utilizaron 200 μg de proteína por muestra para el ensayo. Si la actividad desyodativa presente se inhibía con 1mM de PTU se asumía que las células expresaban principalmente D1. Una vez hecho este ensayo si las células solo expresaban D1 se preparó un ensayo utilizando las concentraciones óptimas de sustrato y cofactor para determinar dicha actividad. La mezcla radioactiva incluyó para este ensayo $\approx 100 \mu\text{g}$ de proteína de la muestra a analizar, 2 nM de [^{125}I]rT3, 0.5 μM de rT3 no radiactiva y 5 mM de DTT. Las muestras para ambos tipos de ensayo se incubaron a 37°C durante 3 horas. Una vez cumplido el tiempo de incubación la reacción enzimática se detenía agregando 50 μL de la solución de paro (50% de suero de bovino, 50% de 10 mM de PTU) y enseguida se agregaba 300 μL de ácido tricloro acético al 10% (v/v). Una vez detenida la reacción la suspensión radioactiva se mezcló con un vortex y se centrifugó a 12, 000 rpm por 2 minutos. El sobrenadante de la suspensión radioactiva se pasó por columnas de cromatografía de intercambio catiónico Dowex 50W-X2, que fueron eluidas con ácido acético al 10% (v/v) para aislar el [^{125}I]. El [^{125}I] liberado se cuantificó en un contador gamma. La concentración de proteínas se midió por el método de Bradford (ensayo de proteína de Bio-Rad, Bio-Rad Laboratories, Inc., Richmond, CA). Los resultados se expresan como picomolas de [^{125}I] liberado por mg de proteína/hora (pmolas I*/mg de proteína/h).

RESULTADOS.

I. LÍNEA CELULAR HepG2.

Como control positivo de nuestros cultivos y tratamientos se utilizó la línea celular HepG2 que proviene de un carcinoma hepatocelular humano (Hay et al., 1994). Las células HepG2 expresan la D1 y su expresión se puede estimular tanto con el AR como con T3 (Schreck et al., 1994; Toyoda et al., 1995). En la figura 6 se observa que con los tratamientos con T3 (50 nM, *todo-trans* AR y *9-cis* (100 nM) la actividad D1 se incremento. Las células también se trataron con ISO (13 μ M) pero este no tuvo ningún efecto sobre la actividad D1. Con estos resultados se concluyó que tanto los reactivos así como la forma de extraer las células para determinar la actividad desyodativa funcionaban adecuadamente.

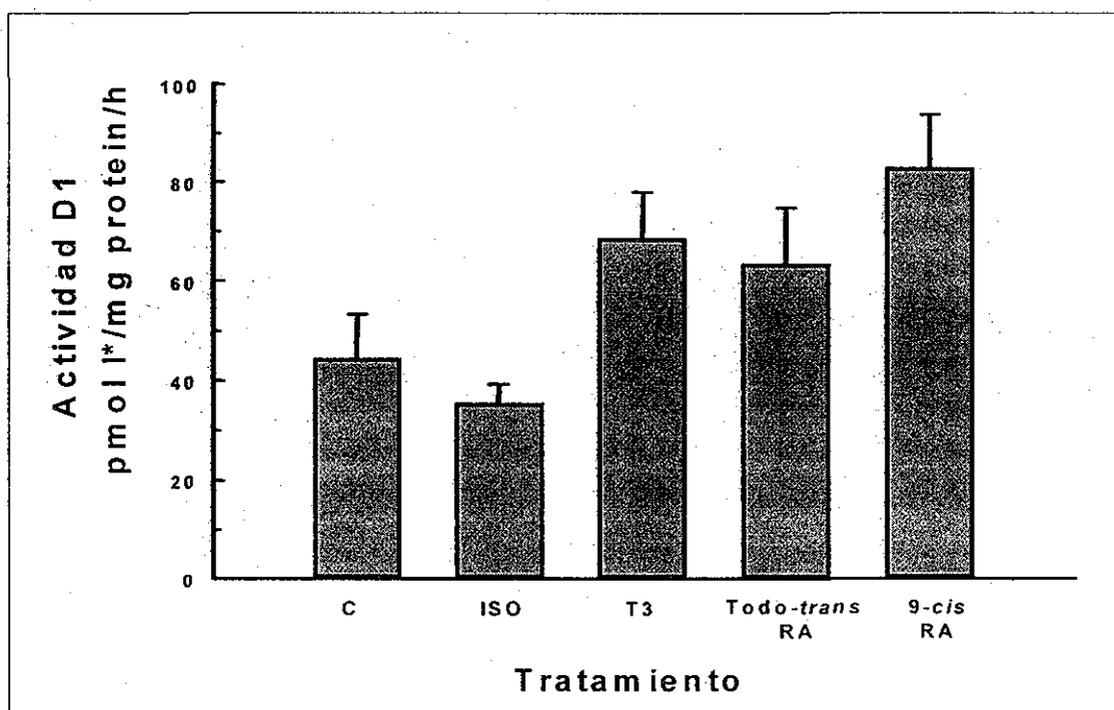


Figura 6. Actividad desyodativa tipo I (D1) en las células HepG2 con diferentes tratamientos. Las células HepG2 se cultivaron en DMEM adicionado con 10% de SFB, 3 nM H_2SeO_3 , 100 U/mL de penicilina y 100 μ g/mL de estreptomicina (medio base). Las células se incubaron a 37 °C en una atmósfera húmeda con 95% de aire y 5% de CO_2 . Cuando las células alcanzaron el 85-95% de confluencia se les aplicaron por 24 horas los siguientes tratamientos: Control (C), 13 μ M de isoproterenol (ISO), 50 nM de T3 (T3), 100 nM de *todo-trans* y *9-cis* ácido retinoico (*Todo-trans* AR y *9-cis* AR respectivamente). Los resultados representan la media \pm D.E. de los valores obtenidos de dos cajas de cultivo.

II. LÍNEA CELULAR MCF-7.

A: LAS CÉLULAS MCF-7 EXPRESAN ACTIVIDAD D1.

Como se observa en la figura 7, la línea celular MCF-7 expresa principalmente la actividad D1, ya que cuando se utilizó 1 mM de PTU en el ensayo la actividad 5'D se inhibió en un 85%. A partir de este resultado los demás ensayos se realizaron utilizando las condiciones de saturación de sustrato y cofactor para determinar la actividad D1 (0.5 μ M de rT3, 2 nM de [125 I]rT3 y 5 mM de DTT).

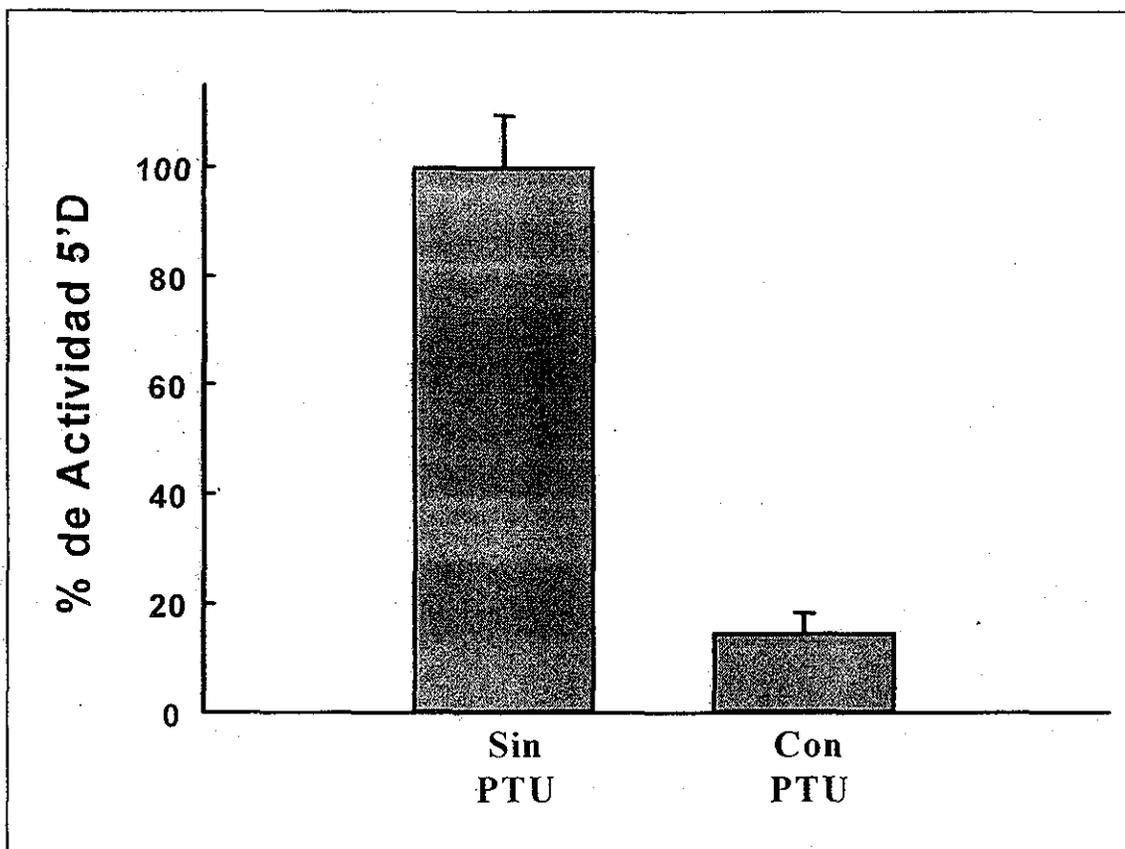


Figura 7. Efecto del PTU sobre la actividad 5'D en las células MCF-7. Las células MCF-7 se cultivaron en DMEM adicionado con 10% de SFB, 3 nM H_2SeO_3 , 100 U/mL de penicilina y 100 μ g/mL de estreptomicina (medio base). Las células se incubaron a 37 °C en una atmósfera húmeda con 95% de aire y 5% de CO_2 . Cuando las células alcanzaron el 85-95% de confluencia se extrajeron para determinar la actividad 5'D. La actividad desyodativa se inhibió en un 85% con PTU (1mM).

B. EL ISO Y LA T3 NO ESTIMULAN LA EXPRESIÓN DE LA ACTIVIDAD D1 EN LAS CÉLULAS MCF-7.

En la figura 8(A y B) se muestran los resultados del reto a las células MCF-7 con 3 dosis de ISO (6.5 μ M, 13 μ M y 130 μ L) y T3 (25 nM, 50 nM y 1 μ M) por 24 horas. Ninguna de las dosis mencionadas de ISO y T3 tubo efectos significativos sobre la actividad de la D1 ($p > 0.05$). En la figura 8C se muestra que utilizando una sola dosis de ISO o T3 (13 μ M y 50 nM respectivamente) durante diferentes tiempos (12, 24 y 48 horas) la actividad D1 tampoco se modificó.

C. LAS FORMAS 9-CIS Y TODO-TRANS DEL AR ESTIMULAN LA EXPRESIÓN DE LA ACTIVIDAD D1 EN LAS CÉLULAS MCF-7.

La figura 9A muestra que las dos configuraciones geométricas del AR utilizadas incrementan la actividad D1. El *todo-trans* AR incrementa la actividad D1 significativamente con respecto al control, desde concentraciones de 10 nM ($p < 0.05$). En contraste, el *9-cis* AR requiere de concentraciones de hasta 100 nM para lograr incrementos similares. La figura 9B muestra el curso temporal de expresión de la actividad D1 en respuesta a concentraciones de 100 nM del AR en las configuraciones *todo-trans* y *9-cis*. A las 12 horas de tratamiento con el *todo-trans* AR ya se observa un incremento significativo de la expresión de la D1 ($p < 0.05$) con respecto al control y al tratamiento con el *9-cis* AR (19.6 ± 1.4 vs 12.5 ± 1.3 y 14.5 ± 0.05 , respectivamente). La actividad D1 más alta se presentó con el tratamiento de 48 horas con el *todo-trans* AR (26.9 ± 1.7). Por su parte, el *9-cis* AR presenta una inducción más discreta de la actividad D1, la cual presenta su punto más alto a las 24 horas. También es de destacar que contrario a lo que ocurre con el tratamiento de 48 horas con el *todo-trans* AR, la actividad D1 con el *9-cis* no aumenta, incluso parece que empieza a declinar.

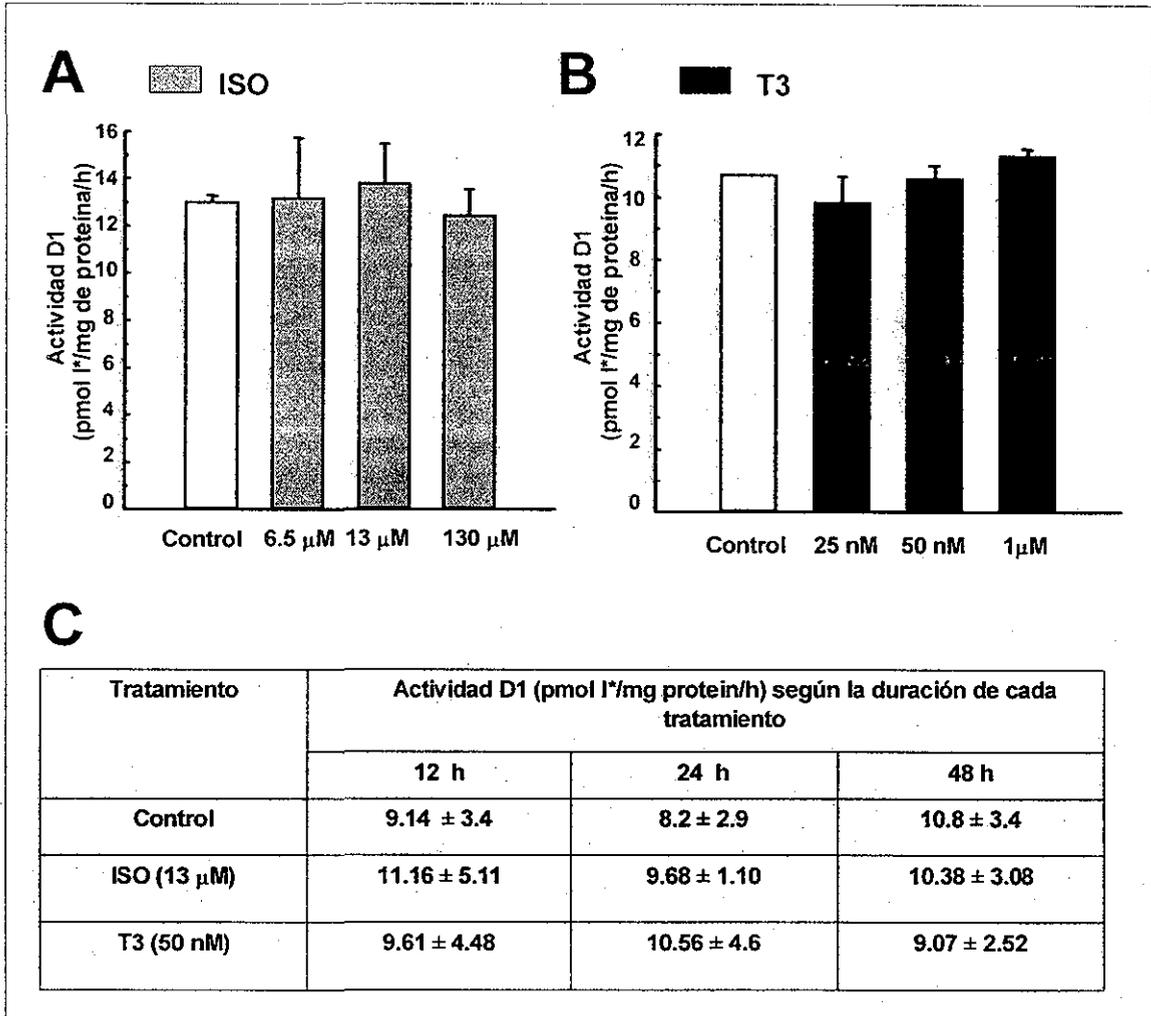


Figura 8. Actividad desyodativa tipo I (D1) en las células MCF-7 tratadas con isoproterenol (ISO) y T3. En los paneles A y B se muestra que la actividad D1 no se modificó significativamente ($p > 0.05$) con dosis crecientes de ISO y T3 (24 horas de tratamiento). En el panel C se muestra que la actividad D1 no se modificó significativamente ($p > 0.05$) a lo largo del tiempo (12, 24 y 48 horas) utilizando una sola dosis de ISO y T3. Los resultados representan la media \pm D.E. de los valores obtenidos de tres experimentos diferentes. Los datos se analizaron utilizando la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

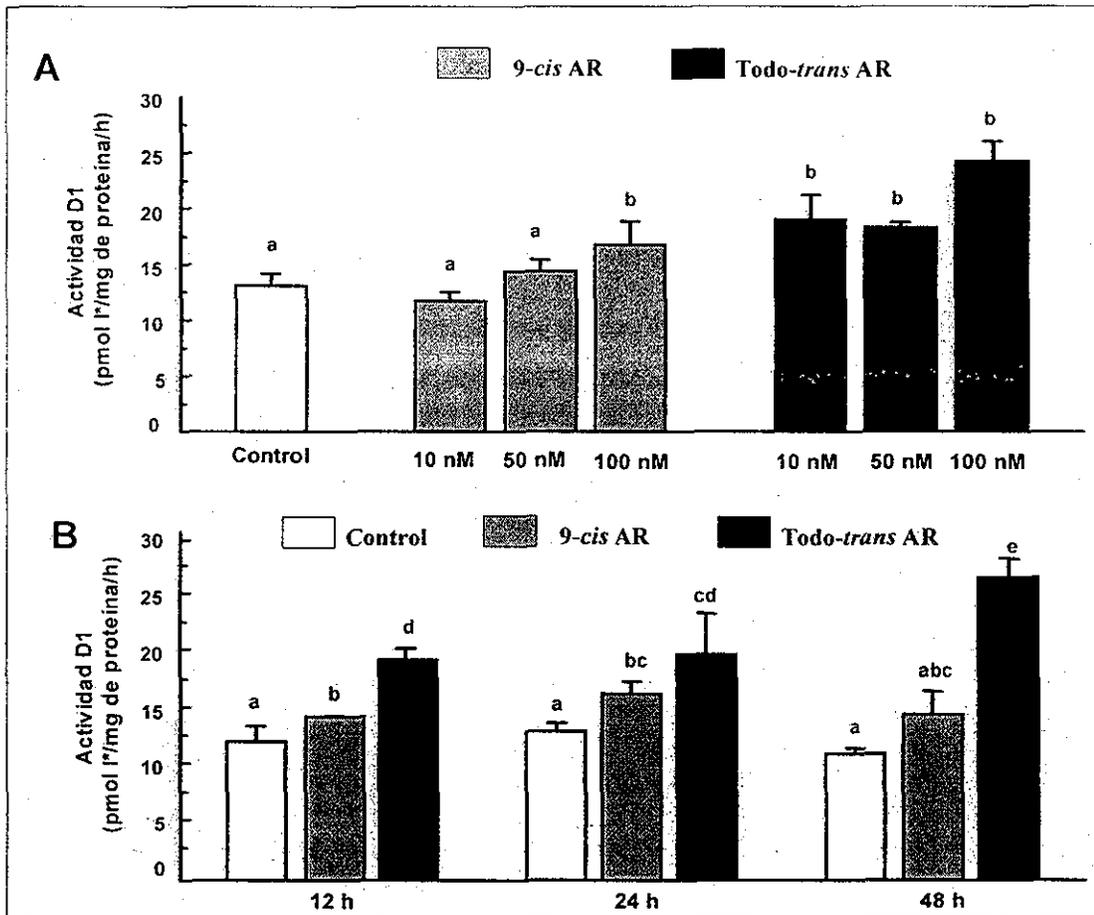


Figura 9. Efecto del ácido retinoico (AR) sobre la actividad desyodativa tipo I (D1) en células MCF-7. (A) Efecto dosis dependiente de los retinoides. Se aplicaron concentraciones crecientes de retinoides durante 24 horas. Los resultados representan la media \pm D.E. de los valores obtenidos de 2 cajas de cultivo. (B) Curso temporal de la actividad D1 en respuesta a la administración de 100 nM de AR en sus presentaciones 9-cis y todo-trans. Los resultados representan la media \pm D.E. de los valores de 3 cajas de cultivo. Diferentes superíndices indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) utilizando la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis; las diferencias entre grupos se determinaron por la prueba U de Mann-Whitney.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

II. LÍNEA CELULAR MDA-MB-231.

A. ACTIVIDAD 5'D BASAL EN LA LÍNEA CELULAR MDA-MB-231.

No se detectó actividad 5'D en las células MDA-MB-231. En la tabla 6 se muestra una comparación de la desyodación entre la línea celular MCF-7 y la MDA-MB-231 usando condiciones de cultivo y cantidad de proteína similares.

Tabla 6. Comparación de la actividad 5'D entre la línea celular MCF-7 y la MDA-MB-231.

Línea Celular	Concentración de proteína (μg) por muestra	% de actividad 5'D	% de inhibición de la actividad 5'D con 1 mM de PTU
MCF-7	109	11.6 \pm 0.14	85-100
MDA-MB-231	95.4	No detectado	No detectado

Desyodación con 2 nM de [^{125}I]rT3, 20 mM de DTT, con y sin 1 mM de PTU. La determinación de la actividad 5'D para ambas líneas celulares se llevo a cabo en el mismo ensayo por duplicado.

B. INDUCCIÓN DE LA ACTIVIDAD 5'D EN LAS CÉLULAS MDA-MB-231 TRATADAS CON LA T3, EL ISO Y LOS RETINOIDES.

Los resultados de los experimentos realizados con la línea celular se reportan como la cantidad de cuentas totales emitidas por el [^{125}I] por cada una de las muestras. En los dos paneles de las figuras 10 y 11 aparecen tres columnas señaladas como controles del ensayo. Dichos controles son a) las cuentas totales por minuto que se colocó en cada ensayo que corresponden a la cantidad total de [^{125}I]rT3 utilizada como sustrato; b) la liberación inespecífica de [^{125}I] de la [^{125}I]rT3, la cuál no depende de procesos enzimáticos y se determina colocando la mezcla radioactiva con [^{125}I]rT3 en la solución buffer (HEPES; ver materiales y métodos) y se trata de la misma manera que las muestras problemas; y por último c) el control positivo del ensayo. En todos los ensayos con las células MDA-MB-231 se utilizó como control positivo un homogeneizado de glándula mamaria de rata lactante la cual se sabe tiene una considerable actividad 5'D. En resumen, las figuras 10 y 11 muestran que bajo ninguna de las condiciones experimentales probadas en las células MDA-MB-231 se detectó actividad 5'D, ya que no hubo una liberación de radioyodo superior a la que ocurre inespecíficamente.

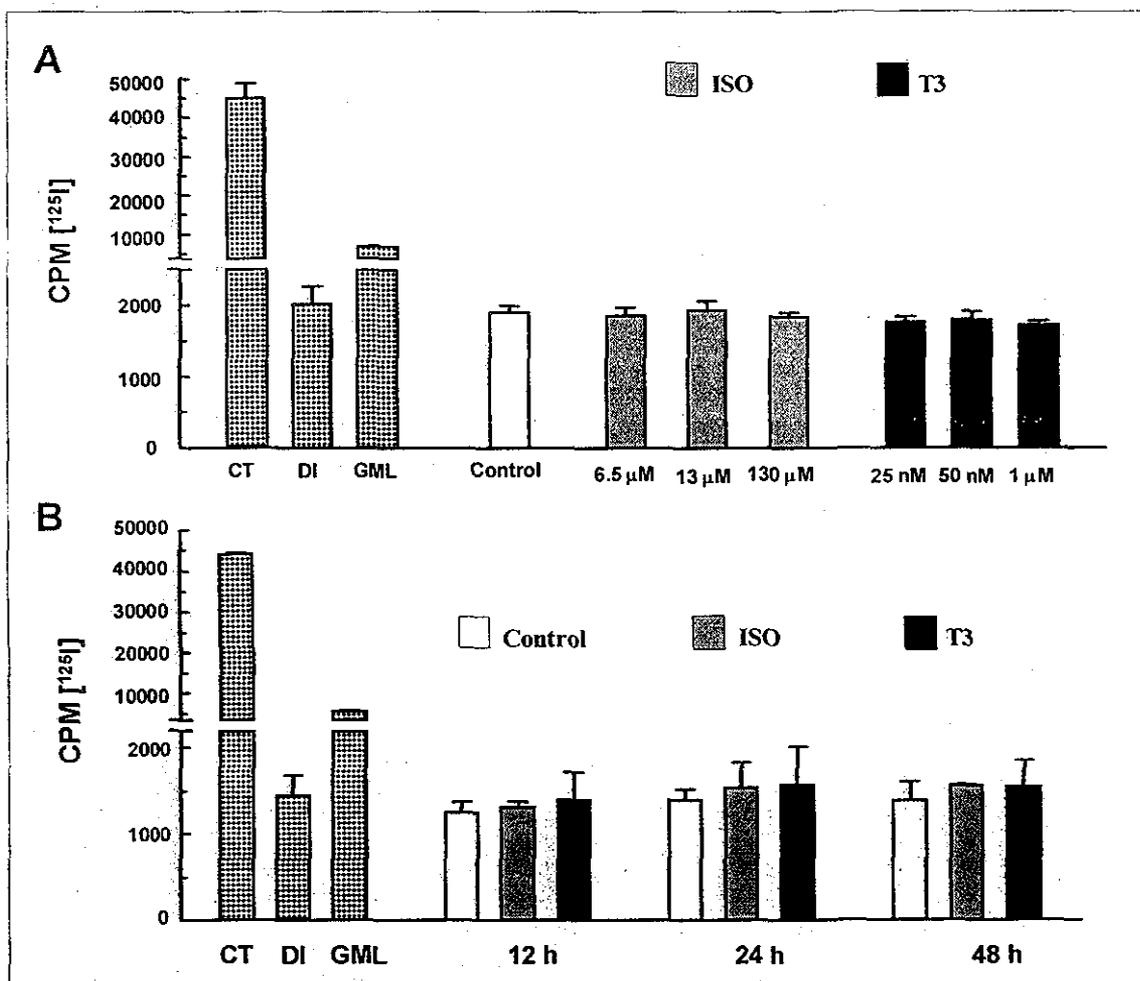


Figura 10. Ensayo de desyodación en células MDA-MB-231 tratadas con Isoproterenol (ISO) y T3. En ambos paneles las barras CT (cuentas totales por minuto de $[^{125}\text{I}]$ rT3 utilizadas en el ensayo), LI (Liberación inespecífica de $[^{125}\text{I}]$ de la $[^{125}\text{I}]$ rT3) y GML (liberación de $[^{125}\text{I}]$ de la $[^{125}\text{I}]$ rT3 en un homogeneizado de glándula mamaria de rata lactante) representan los controles del ensayo. En el Panel A se muestra que no hay inducción de la actividad desyodativa utilizando dosis crecientes de ISO y T3 (24 horas de tratamiento) y el panel B muestra que tampoco hay inducción de actividad desyodativa utilizando dosis de 13 μM de ISO y 50 nM de T3 durante diferentes tiempos (12, 24 y 48 horas). Cada barra representa la media \pm D.E. de los valores obtenidos de 2 cajas de cultivo.

FALLA DE ORIGEN

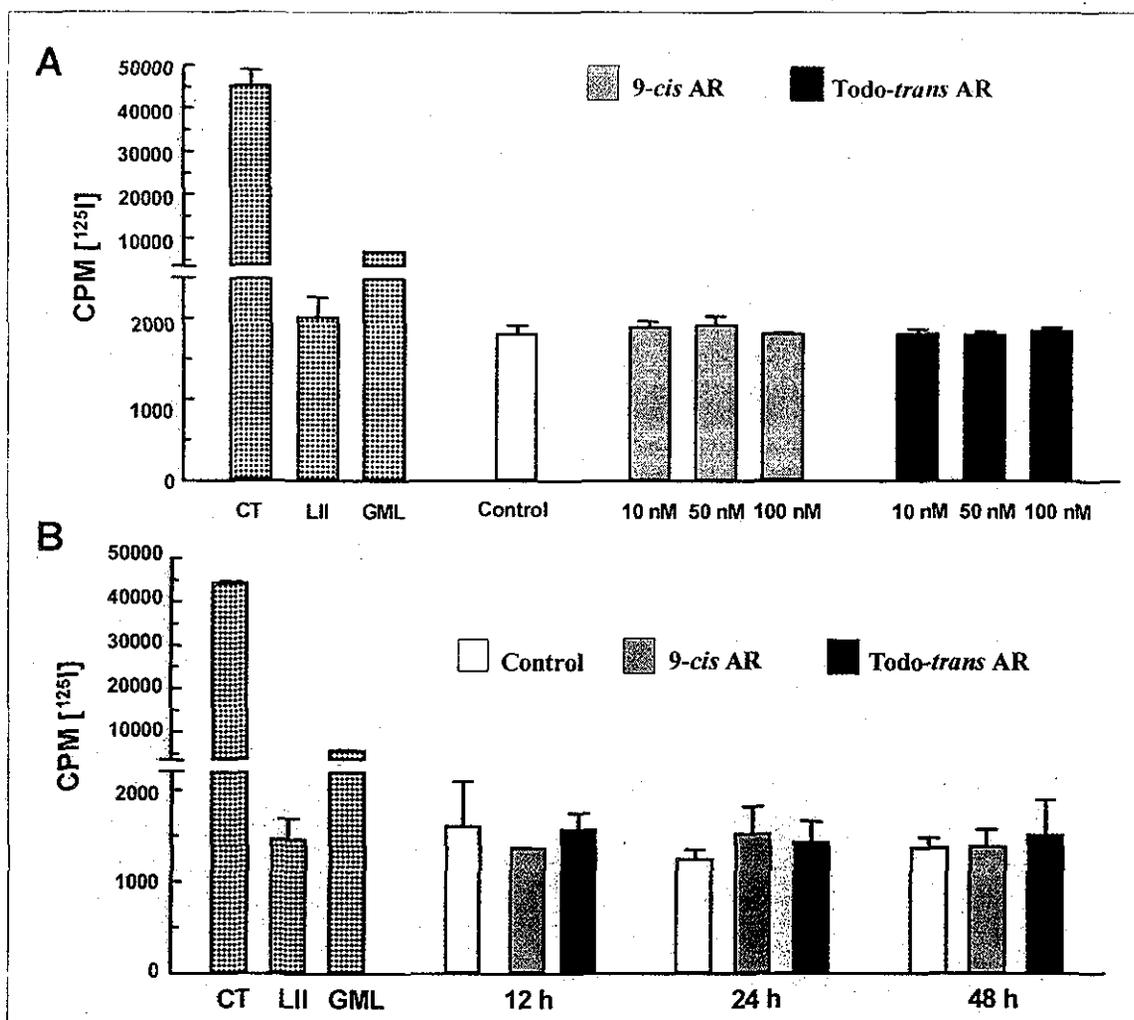


Figura 11. Ensayo de desyodación en células MDA-MB-231 tratadas con ácido retinoico (AR). En ambos paneles las barras CT (cuentas totales por minuto de $[^{125}\text{I}]$ rT3 utilizadas en el ensayo), LII (Liberación inespecífica de $[^{125}\text{I}]$ de la $[^{125}\text{I}]$ rT3) y GML (liberación de $[^{125}\text{I}]$ de la $[^{125}\text{I}]$ rT3 en un homogeneizado de glándula mamaria de rata lactante) representan los controles del ensayo. En el Panel A se muestra que no hay inducción de la actividad desyodativa utilizando dosis crecientes de 9-cis y todo-trans AR (24 horas de tratamiento) y el panel B muestra que tampoco hay inducción de actividad desyodativa utilizando dosis de 100 nM de 9-cis y todo-trans AR durante diferentes tiempos (12, 24 y 48 horas). Cada barra representa la media \pm D.E. de los valores obtenidos de 2 cajas de cultivo.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

DISCUSIÓN.

Tanto la línea celular MCF-7 como la MDA-MB-231 son líneas celulares obtenidas de metástasis de cáncer mamario humano. Ambas líneas celulares fueron obtenidas de efusiones pleurales (Either, 1996; Hay et al., 1994). Las diferencias más notables entre ellas son que la línea celular MCF-7 expresa receptores a estrógenos y progesterona (ER+, PR+), sintetiza caseína y es inducible a expresar el NIS, mientras que la MDA-MB-231 es negativa a todo lo anterior (Constantinou, Krygier & Metha, 1998; Either, 1996; Hay et al., 1994; Kogai et al., 2001). Estas diferencias han permitido proponer a estas líneas celulares como dos modelos de cáncer mamario en diferentes estadios de desdiferenciación. Las MCF-7 como un cáncer mamario parcialmente desdiferenciado y las MDA-MB-231 como un cáncer mamario más desdiferenciado (Dickson & Lippman, 1995; Lochter, 1998).

Los resultados del presente trabajo mostraron que la línea celular MCF-7 expresa actividad D1 y que esta enzima es estimulada por el AR. Por el contrario, las células MDA-MB-231 no expresan actividad 5'D basal y los tratamientos de ISO, T3 y AR no inducen la expresión de dicha enzima. En el organismo normal, la D1 se regula diferencialmente dependiendo del tejido en la cual se expresa. Así por ejemplo, en la tiroides esta enzima es regulada positivamente por T3 y TSH (Köhrle, 1999a). En el hígado, su síntesis se incrementa por la T3, los corticosteroides y los hidratos de carbono (Köhrle, 1999a; Menjo et al, 1993), mientras que en el corazón la D1 es estimulada por angiotensina II, cAMP y noradrenalina (Yonemoto y col 1999; Aceves & Rojas-Huidobro, 2001). En la glándula mamaria lactante es la succión de las crías la que regula la expresión de la D1 a nivel del epitelio alveolar (Aceves et al., 1995; Aceves et al., 1999b). Dentro de la succión, los principales componentes que participan en esta regulación son la estimulación β -adrenérgica y la prolactina (Aceves et al., 1999a). La estimulación adrenérgica se realiza a través de la liberación local de noradrenalina por la inervación e induce su expresión a nivel transcripcional (Aceves et al., 1999a; Aceves et al., 1999b).

La pérdida de respuesta de la D1 de las células tumorales mamarias a la T3 y al ISO en nuestro estudio concuerda con los datos generados en otras líneas celulares tumorales. Así por ejemplo, la línea celular normal FRTL-5 (tirocitos diferenciados de rata) expresa altos niveles de D1 y responde positivamente a T3 y TSH pero no al AR. En cambio, en las células de cáncer diferenciado de tiroides humano (FTC-133 y FTC-238) la D1 se expresa en muy bajos niveles comparados con las células normales y no responde a la TSH ni a la T3 pero si lo hace al AR. Por otro lado, en células totalmente indiferenciadas (anaplásicas) de cáncer de tiroides no se detecta actividad desyodativa y no es posible inducirla con T3, TSH o AR (Schmutzler et al., 1996; Schreck et al., 1994). Este hecho ha llevado a algunos autores a plantear que tanto la disminución de la expresión de la D1 como su capacidad de respuesta al AR son signos de desdiferenciación celular (Köhrlé, 1999a). Esta hipótesis se fortalece con hallazgos en la línea celular HepG2 (carcinoma hepatocelular humano) en donde, a pesar de ser tumoral, este tipo celular mantiene muchas características propias de los hepatocitos como la expresión de la globulina que transporta a los esteroides sexuales, la TBG, la albúmina, la transferrina, y la RBP, entre otras proteínas (Crowe et al., 1996; Hay et al., 1994; Toyoda et al., 1995). En las células HepG2 la D1 es estimulada tanto por T3 como por AR (Toyoda et al., 1995; Schreck et al., 1994). Es decir esta línea podría representar los primeros estadios de conversión tumoral. Algo similar parece ocurrir en los cánceres mamarios primarios humanos. Estudios en nuestro laboratorio han revelado que las muestras de cáncer ductal contienen muy poca actividad 5'D la cual es generada por las enzimas D1 y D2. En contraste, las células tumorales que provienen del cáncer lobulillar (cáncer generado a partir del epitelio alveolar), expresan principalmente D1 a concentraciones más elevadas (Gallardo de la O et al., 2000). Aunque no hay estudios que analicen su respuesta a T3, AR e ISO, se tienen datos que indican que a mayor progresión del tumor primario, se presenta una disminución en la expresión de las desyodasas (Gallardo de la O et al., 1999).

La inducción de la expresión de la D1, tanto por la T3 como por el AR, se explica por la presencia de 2 complejos TRE-RARE ubicados en la región promotora de su gen (Köhrle, 1999a). Sin embargo, el mecanismo íntimo que permite la regulación diferencial por estos mensajeros no se conoce. Más aún, la respuesta diferencial de esta enzima a otros mensajeros como TSH, noradrenalina, angiotensina II, cAMP e hidratos de carbono sugiere que existen otros mecanismos que intervienen en su regulación. Por ejemplo, se ha sugerido que la concentración endógena de glutatión podría ser un factor determinante en su regulación, ya que se considera a este metabolito como el cofactor endógeno (Köhrle, 1996). Es importante enfatizar que al parecer son este tipo de respuestas no asociadas a un efecto transcripcional directo las primeras que se pierden cuando el tejido se vuelve canceroso.

En el caso de los tratamientos con T3, en ninguno de los dos tipos celulares hubo una estimulación de la actividad D1, lo cual parece no tener una explicación por la expresión de sus receptores. Tanto la línea celular MCF-7 como la MDA-MB-231 expresan receptores a T3: TR α 1, TR α 2 y TR β 1 (Shao et al., 1995). Hasta el momento no es posible hacer una comparación con las condiciones fisiológicas, ya que no se conoce cual es el patrón de expresión de los TRs en la glándula mamaria normal. Otro dato que resulta muy interesante es que en líneas celulares de cáncer mamario ER+, la T3 junto con los estrógenos tienen un efecto sinérgico de estimulación de la proliferación (Shao et al., 1995). En un trabajo de Nogueira & Brentani (1996), se mostró que en las células MCF-7 la T3 mimetiza los efectos de los esteroides. En dicho estudio se observó que la T3 por si sola estimula la proliferación celular, induce la expresión de los mRNAs del receptor a progesterona e incrementa la liberación del factor de crecimiento transformante del tipo α (TGF- α). Por el contrario, en estas mismas células la T3 disminuye la expresión del mRNA del TGF- β . También ellos encontraron que estos efectos no ocurrían en las células MDA-MB-231. En estos estudios se sugiere que estos efectos de la T3 pueden deberse a que esta actúa directamente sobre el ER. Hasta el momento no se conoce si los estrógenos podrían, en condiciones patológicas, modificar la expresión de las desyodasas. Datos obtenidos en tejido

mamario normal han mostrado un incremento discreto en la expresión de la D2 durante el ciclo estral de la rata (Aceves et al., 1995) y ningún efecto sobre la D1 durante la lactancia (Aceves, datos no publicados).

Como mencionamos anteriormente, los retinoides tienen un papel fundamental en el desarrollo, diferenciación y crecimiento celulares, en especial en los tejidos epiteliales (Blaner, 1993). El epitelio mamario humano es capaz de incorporar retinol del medio y sintetizar AR, además de tomar AR directamente del medio (Hayden et al., 2001; Mira-Y-López et al., 2000). Se ha descrito que los retinoides promueven y mantienen el estado diferenciado del epitelio glandular mamario (Lee et al., 1995a y 1995b). Con respecto al cáncer mamario, se ha mostrado que los retinoides inhiben la proliferación de las células cancerosas, inducen su diferenciación y su apoptosis (Yang et al., 1999, Prakash, Krinsky & Russell, 2000). También se conoce que algunas líneas celulares cancerosas tienen deteriorada la vía de síntesis del AR (deficientes en RALDHs) entre estas líneas celulares se encuentran la MCF-7 y la MDA-MB-231 (Kuppumbatti et al., 2000, Mira-Y-López et al., 2000). Por el contrario se ha descrito que los tumores mamaros muestran una mayor expresión de las CRABPs que su contraparte normal (Küng et al., 1980; Metha et al., 1982a). Todo esto sugiere que en el cáncer mamario existe un mecanismo compensador (aumentar la captación externa de AR mediante la expresión de CRABPs) a la incapacidad de síntesis local de AR. Estudios más específicos han mostrado que las células MCF-7 expresan la CRABP-II mientras que las MDA-MB-231 no (Mira-Y-López et al., 2000). Esto sugiere que las células MCF-7 mantienen su sensibilidad a la acción de los AR. Efectivamente, se conoce que la CRABP-II interaccionan física y funcionalmente con los complejos heterodiméricos RAR-RXR sinergizando la expresión génica ejercida por el AR, principalmente con la forma *todo-trans* AR (Delva et al., 1999). Estos reportes concuerdan con el hallazgo en nuestro estudio de que solamente las células MCF-7 respondieron al AR y que fueran más sensibles a la forma *todo-trans* AR. Es decir, parecería, que conforme avanza la dediferenciación celular se va perdiendo la capacidad de sintetizar AR y de transportarlo al núcleo (falta de RALDH y CRABP-II) para ejercer su acción. Algo

similar parece ocurrir con los receptores a AR al haber una reducción en la expresión de RAR β conforme el cáncer se va haciendo más maligno (Yang et al., 1999). Tanto la células MCF-7 como las MDA-MB-231 expresan los receptores RAR y RXR (Jing et al., 1996; Widschwendter et al., 1995). Sin embargo la expresión de RAR en las células MD-MB-231 es significativamente menor (Kogai et al., 2000).

Por lo revisado hasta aquí, parecería que la conversión celular normal a tumoral se acompaña, entre otras, de alteraciones en el metabolismo y transporte de tironinas y AR. Es decir, conforme avanza el proceso tumoral decrece la síntesis de desyodasas y de RALDH (generadoras de las formas activas localmente) y decrece la síntesis de la CRABP-II encargada de llevar al AR hasta el núcleo para ejercer su función. Este aparente desequilibrio podría explicar el inicio de la desdiferenciación celular, ya que se conoce que ambos: tironinas y AR participan en el mantenimiento de la diferenciación celular de prácticamente todos los epitelios (Olson, 2001; Yen, 2001). De hecho, permite explicar la exitosa utilización del AR en el tratamientos de cáncer de piel y de tiroides, donde la administración de elevadas concentraciones de AR se acompaña de una rediferenciación del epitelio y una regresión tumoral (Schmutzler & Köhrle, 2000). Es posible que la falta de AR en el núcleo genere una disminución en la síntesis de la D1 y por lo tanto de una falta de T3 local. Una depleción importante de AR en el núcleo celular tumoral permitiría explicar porque en condiciones normales la D1 no responde a AR pero si en condiciones tumorales. Es decir en el primer caso (normal), el AR (que esta en concentraciones adecuadas) actúa como un modulador de los complejos TRE-RARE y la D1 se incrementa con concentraciones crecientes de T3. En el caso tumoral, la célula no tiene AR para activar los complejos TRE-RARE y la célula pierde su respuesta a T3. Esta noción permite explicar porque la administración del AR induce e incrementa la síntesis de la D1.

Otra posibilidad es que el AR regule el aporte adecuado de yodo. El AR también participa en la captura del yodo debido a que induce la expresión del NIS. Kogai et al. (2000) utilizando las células MCF-7 y MDA-MB-231 encontraron que

solo en las células MCF-7 se inducía la expresión del NIS. Recordemos que el NIS de la glándula mamaria se expresa solo durante la gestación y lactancia y que su síntesis es regulada por la succión (Riedel et al., 2001). Aunque la gran capacidad de la glándula mamaria lactante para captar yodo se ha interpretado como un mecanismo para asegurar el aporte normal de este micronutriente para el neonato a través de la leche (Tazebay et al., 2000), recientemente se ha sugerido que el yodo pudiera ser también un potente protector del cáncer, por su elevada capacidad antioxidante y antitumoral (Venturi & Venturi, 1999; Cann, van Netten & van Netten, 1999; Feldt-Rasmussen, 2001). En los pacientes con cáncer mamario se ha descrito que la incorporación y concentración intracelular de yodo en la célula tumoral están disminuidas (Kilbane et al., 2000; Kogai et al., 2000). Esto puede deberse a un déficit o ausencia de la expresión de la D1 y/o del NIS o por la presencia de un factor en el suero que impide la incorporación de yodo (Kilbane et al., 2000). Se ha señalado que la naturaleza de este factor puede ser autoinmune, los pacientes con cáncer mamario tienen una incidencia considerable de autoinmunidad tiroidea (Giani et al., 1996; Smyth et al., 1998). Se ha encontrado que este tipo de pacientes tienen anticuerpos anti-tiroperoxidasa e incluso se sugiere la presencia de anticuerpos anti-NIS (Kilbane et al., 2000; Smyth et al., 1998). Aunado a lo anterior, se ha demostrado que en tumores mamaros inducidos con cancerígenos como el Dimetilbenzoantraceno, el consumo de alimentos altos en yodo (algas), o la administración de yodo solo o yodo más progesterona (Funahashi et al., 1999; Funahashi et al., 1996) tienen un efecto significativo en la reducción del tamaño tumoral.

Consideraciones finales.

Se conoce que el factor más exitoso en la prevención del cáncer mamario es el embarazo temprano (McMahon et al., 1970; Russo & Ruso, 1998). Se ha estimado que el binomio menarca tardía y embarazo antes de los 20 años se acompaña de una disminución del 50% en el riesgo de desarrollar cáncer en todas las mujeres del mundo (McMahon et al., 1970). Se ha postulado que este efecto

protector se debe a que a partir de la pubertad, el ciclo estral induce la proliferación y diferenciación parcial del epitelio mamario haciéndolo muy susceptible a agentes altamente mutagénicos. Por el contrario, el embarazo y la lactancia, inducen la proliferación y la diferenciación alveolar de manera continua y total, disminuyendo la probabilidad de mutaciones (Russo & Russo, 1998). Aunque esta es la noción mas aceptada hasta el momento, existen estudios que muestran que más que la diferenciación total del epitelio alveolar, el medio "ambiente" celular donde se desarrolla la glándula pudiera ser el importante para permitir o no la transformación tumoral (Abrams et al., 1998). Es decir se ha demostrado que aún en animales múltiparos, alteraciones en el medio ambiente endocrino (esteroides, tiroideas, AR, prolactina, hormona de crecimiento, etc) (Abrams et al., 1998) y nutricional (yodo, fitoestrogenos, vitamina E, selenio, etc) (Cann, van Netten & van Netten, 1999; Köhrle, 1999b), pueden volver al epitelio susceptible de transformación tumoral. Es decir, parecería que el conjunto de señales que esta recibiendo la glándula mamaria durante periodos específicos, es determinante en la susceptibilidad del epitelio. Recordemos que después de cada embarazo, el epitelio involuciona y comienza de nuevo una nueva etapa de diferenciación. Uno de los mejores ejemplos de esto es el hecho de que las poblaciones asiáticas presentan una prevalencia de cáncer mamario y prostático menor, siempre y cuando mantengan una dieta oriental (Cann, van Netten & van Netten, 1999). Los diferentes candidatos protectores de cáncer en estos casos son entre otros: los fitoestrógenos, el yodo, la vitamina E, etc, que son consumidos en mayores cantidades que en las poblaciones occidentales por el uso de algas en sus condimentos (Cann, van Netten & van Netten, 1999; Coffey, 2001). Por lo tanto no seria sorprendente que un desequilibrio en el complejo tironinas/AR/yodo pudiera estar involucrado en los procesos de transformacion tumoral. Estudios posteriores son necesarios para establecer con mayor precision el papel de estos mensajeros en la iniciación y promoción de los procesos cancerosos.

PERSPECTIVAS.

Considero que la interrogante más importante que surge de este trabajo es la de esclarecer el verdadero papel de las interrelaciones entre los efectos de los retinoides, las hormonas tiroideas y el yodo en la glándula mamaria normal y neoplásica. Utilizando la rata como modelo experimental se tiene la posibilidad de abordar integralmente dichas interrelaciones. En primer lugar se plantea la necesidad de conocer más a fondo el metabolismo de los de retinoides en la glándula mamaria normal en diversos estados fisiológicos (pubertad, gestación y lactancia). Para ese fin se puede iniciar con el estudio del patrón de expresión de los mRNAs de las CRABPs y las enzimas que sintetizan el AR. En segundo lugar, con el estudio de la expresión de la D1 o el NIS, se podría conocer si los retinoides en los diferentes estados fisiológicos modifican el metabolismo de la tironinas y el yodo en la glándula mamaria. También queda la tentativa de ver si diferentes estados tiroideos modifican el metabolismo del AR. En cuanto a la neoplasia mamaria existen protocolos muy bien estandarizados en los que se puede inducir cáncer mamario a través del uso de cancerígenos como la *N*-metil-*N*-nitrosourea. Estos cánceres tienen la ventaja de que poseen características fisiopatológicas similares al cáncer mamario humano como son la dependencia a estrógenos, expresión elevada de las CRABPs y también la expresión de la D1 (Gallardo de la O et al., 2000; Küng et al., 1980; Media, 1996; Metha et al., 1982a; Metha et al., 1982b; Macejova, Liska & Brtko, 2001; Thordarson et al., 2001). Con el uso de estos modelos se puede estudiar la historia natural de la expresión y regulación de la D1 y el NIS en el cáncer mamario así como las interrelaciones de los efectos de los retinoides y las hormonas tiroideas. Otra posibilidad para continuar con esta línea de investigación es la de utilizar sistemas *in vitro* como cultivos primarios o líneas celulares. Los sistemas *in vitro* permiten evaluar el efecto directo que tienen tanto retinoides, yodo y tironinas sobre los procesos celulares a estudiar (diferenciación celular, expresión génica). Además los sistemas *in vitro* tienen la ventaja de que permiten analizar de manera más práctica los mecanismos íntimos por medio de los cuales estos mensajeros químicos ejercen sus efectos.

CONCLUSIONES.

- 1) Se demostró que la línea celular menos desdiferenciada (MCF-7) expresa la desyodasa D1 y que ésta responde, de manera dosis dependiente, al *todo-trans* y *9-cis* AR.
- 2) Se demostró que la línea celular más desdiferenciada (MDA-MB-2131) no expresa actividad desyodativa de ningún tipo y no puede ser inducida con los mensajeros fisiológicos típicos.

Estos resultados sugieren que la expresión y respuesta de la D1 mamaria están asociadas directamente a la diferenciación epitelial y apoyan la idea de la D1 como un marcador de dicha diferenciación.

REFERENCIAS.

- Abrams T, Guzmán R, Swanson S, Thordarson G, Talamantes F & Nandi S. 1998. Changes in the parous rat mammary gland environment are involved in parity-associated protection against mammary carcinogenesis. *Anticancer Res.* 18, 4115-4122.
- Aceves C. 1997. Eje hipotálamo-hipófisis-tiroides. En Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas (Eds.), *Actualización en Fisiología.* (pp 223-240). Morelia: Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas, UNAM y Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. FCE.
- Aceves C, Pineda O, Ramírez-C I, Navarro M & Valverde-R. 1999a. Mammary type I deiodinase is dependent on the suckling stimulus: Differential role of norepinephrine and prolactin. *Endocrinology* 140, 2948-2953.
- Aceves C, Rodón FC, Ramírez-C I, Wilson S, Pineda-C O, López-B L, Mancilla R & Valverde-R C. 1995. Mammary 5'deiodinase (5'D) during the breeding cycle of the rat: indirect evidence that 5'D type I is specific to the alveolar epithelium. *Endocrine* 3, 95-99.
- Aceves C, Rojas-Huidobro R, Marina N, Morales T & Mena F. 1999b. Mammary gland sympathetic innervation is a major component in type 1 deiodinase regulation. *Endocrine* 11, 115-121.
- Aceves C & Rojas-Huidobro R. 2001. Effects of suckling and adrenergic stimulation on peripheral deiodination in lactating rats: differential expression of type 1 deiodinase mRNA forms. *J. Endocrinol.* 171, 533-540.

- Aceves C & Valverde-R C. 1989. Type I, 5'-monodeiodinase activity in the lactating mammary gland. *Endocrinology* 124, 2818-2820.
- Anderson G, Mariash C & Oppenheimer J. 2000. Molecular actions of thyroid hormone. En E. Braverman & R Utiger (Eds). *Werner and Ingbar's The Thyroid. A fundamental and Clinical Text*. (pp. 174-195). Philadelphia: Lippincott-Williams & Williams.
- Badui S. 1993. *Química de los alimentos*. Ciudad de México: Alhambra.
- Bhattacharjee M & Vonderhaar BK. 1984. Thyroid hormones enhance the synthesis and secretion of α -lactalbumin by mouse mammary tissue *in vitro*. *Endocrinology* 115, 1070-1077.
- Blaner WS. 1993. Biochemistry and pharmacology of retinoids. En W. Hong & R Lotan (Eds.), *Retinoids in Oncology*. (pp. 1-41). New York: Marcel Dekker.
- Breen J, Hickok N & Gurr J. 1997. The rat TSH β gene contains distinct response elements for regulation by retinoids and thyroid hormone. *Mol. Cell. Endocrinol.* 131, 137-146.
- Cann S, van Netten J & van Netten C. 2000. Hypothesis. Iodine, selenium and the development of breast cancer. *Cancer Causes Control* 11, 121-127.
- Chambon P. 1996. A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *FASEB J.* 10, 940-954.
- Coffey D. 2001. Similarities of prostate and breast cancer: evolution, diet, and estrogens. *Urology* 57 (Suppl 4A), 31-38.

- Constantinou A, Krygier A & Metha R. 1998. Genistein induces maturation of cultured human breast cancer cells and prevents tumor growth in nude mice. *Am. J. Clin. Nutr.* 68 (suppl), 1426S-1430S.
- Crowe T, Loidl N, Payne K, Topliss D, Stockigt J & Baelow J. 1996. Differential modulation of thyroid hormone responsiveness by thyroid hormone responsiveness by retinoids in a human cell line. *Endocrinology* 137, 3187-3192.
- DeGroot L, Larsen PR, Refetoff S & Stanbury J. 1984. *The thyroid and its diseases*. New York: John Wiley & Sons.
- Devore G. 1970. *Química orgánica*. Ciudad de México: Publicaciones Cultural.
- Delva I, Bastie JN, Rochette-Egly C, Kraïba R, Balintrad N, Despouy G, Cambon P & Chomienne C. 1999. Physical and functional interactions between cellular retinoic acid binding protein II and the retinoic acid-dependent nuclear complex. *Mol Cell. Biol.* 19, 7158-7167.
- Dickson R & Lippman M. 1995. Growth factors in breast cancer. *Endocrine Rev.* 16, 559-589.
- Duester G. 2000. Families of retinoid dehydrogenases regulating vitamin A function. Production of visual pigment and retinoic acid. *Eur. J. Biochem.* 267, 4315-4324.
- Dunn JT & Dunn JD. 2000. Thyroglobulin: chemistry, biosynthesis and proteolysis. En E. Braverman & R Utiger (Eds). *Werner and Ingbar's The Thyroid. A fundamental and Clinical Text.* (pp. 91-104). Philadelphia: Lippincott-Williams & Williams.

- Ethier S.1996. Human breast cancer cell lines as models of growth regulation and disease progression. *J. Mam. Gland Biol. Neoplasia* 1, 111-121.
- Feldt-Rasmussen U. 2001. Iodide and cancer. *Thyroid* 11, 483-486.
- Feng X, Jaing Y, Meltzer P & Yen P. 2000. Thyroid hormone regulation of hepatic genes *in vivo* detected by complementary DNA microarray. *Mol. Endocrinol.* 14, 947-955.
- Funahashi H, Imai T, Tanaka Y, Tobinaga J, Wada M, Morita T, Yamada F, Tsukamura K, Oiwa M, Kikumori T, Narita T & Takagi H. 1996. Suppressive effect of iodine on DMBA-induced breast tumor growth in the rat. *J. Surg. Oncol.* 61, 209-213.
- Funahashi H, Imai T, Tanaka Y, Tsukamura K, Hayakawa Y, Kikumori T, Mase T, Itoh T, Nishikawa M, Hayashi H, Shibata A, Hibi Y, Takahashi M & Narita T. 1999. Wakame seaweed suppresses the proliferation of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary tumors in rats. *Jpn. J. Cancer Res.* 90, 922-927.
- Gallardo de la O E, Rojas-Huidobro R, Solorio-Montoya C & Aceves C. Análisis de la desyodación en tejido mamario humano normal y neoplásico. Mem. XXII Congreso Nacional de la sociedad Mexicana de Bioquímica. Acapulco Gro. 19-24 de noviembre 2000.
- Geng K, Li Y, Bezault J & Furmanski P. 1998. Induction of lactoferrin expression in murine ES cells by retinoic acid and estrogen. *Exp. Cell Res.* 245, 214-20.

- Giani C, Fierabracci P, Bonacci R, Gigliotti A, Campani D, De Negri F, Cecchetti, Martino E & Pinchera A. 1996. Relationship between breast cancer and thyroid disease: Relevance of autoimmune thyroid disorders in breast malignancy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 81, 990-994.
- González-Sancho J, Álvarez-Dolado M, Caelles C & Muñoz. 1999. Inhibition of tenascin-C expression in mammary epithelial cells by thyroid hormone. *Mol. Carcinogenesis* 24, 99-107.
- Gottesman M, Quadro L & Blaner W. 2001. Studies of vitamin A metabolism in mouse model systems. *Bioessays* 23, 409-419.
- Hargrove GM, Junco A & Wong NC. 1999. Hormonal regulation of apolipoprotein AI. *J Mol Endocrinol.* 22,103-11.
- Hay R, Caputo J, Chen T, Macy M, McClintock P & Reid Y. 1994. ATTC Cell lines and hybridomas 8 edition. Rockville: American Type Culture Collection.
- Hayden L, Hawk S, Sih T & Satre M. 2001. Metabolic conversion of retinal to retinoic acid mediates the biological responsiveness of human mammary epithelial cells to retinol. *J. Cell. Physiol.* 186, 437-447.
- Hernández A & Obregón M. 2000. Triiodothyronine amplifies the adrenergic stimulation of uncoupling protein expression in rat brown adipocytes. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 278, E769-E777.
- Jing Y, Zhang J, Bleiweiss I, Waxman S, Zelent A & Mira-y-López R. 1996. Defective expression of cellular retinal binding protein type I and retinoic acid receptors $\alpha 2$, $\beta 2$ & $\gamma 2$ in human breast cancer cells. *FASEB J.* 10, 1064-1070.

- Kastner P, Mark M & Chambon P. 1995. Nonsteroid nuclear receptor: What are genetic studies telling us about their role in real life? *Cell* 83, 859-869.
- Kilbane M, Ajjan R, Weetman A, Dwyer R, McDermott E, O'Higgins NJ & Smyth P. 2000. Tissue iodine content and serum-mediated ¹²⁵I uptake blocking activity in breast cancer. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 85, 1245-1250.
- Kogai T, Shultz J, Johnson L, Huang M & Brent G. 2000. Retinoic acid induces sodium/iodide symporter gene expression and radioiodide uptake in the MCF-7 breast cancer cell line. *Proc. Natl. Am. Soc.* 97, 8519-8524.
- Köhrle. 1996. Thyroid hormone deiodinases-A selenoenzyme Family acting as gate keepers to thyroid hormone action. *Acta Med. Austriaca* 23,17-30.
- Köhrle J. 1999a. Local activation and inactivation of thyroid hormones: The deiodinase family. *Mol. Cell. Endocrinol.* 151, 103-119.
- Köhrle J. 1999b. The trace element selenium and the thyroid gland. *Biochimie* 81, 527-533.
- Küng W, Geyer E, Eppenberger U & Huner P. 1980. Quantitative estimation of cellular retinoic acid-binding protein activity in normal, dysplastic, and neoplastic human breast tissue. *Cancer Res.* 40, 4265-4269.
- Kuppumbatti Y, Bleiweiss I, Mandeli J, Waxman S & Mira-y-López R. 2000. Cellular retinol-binding protein expression and breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 200, 475-480.
- Larsen R, Davies T & Hay I. 1998. The Thyroid Gland. En J. Wilson, D. Foster, H. Kronenberg H & R. Larsen. *Williams Textbook of Endocrinology*.(pp. 389-515). Philadelphia: W.B. Saunders Company.

- Lazar M. 2000. A Sweetheart deal for thyroid hormone. *Endocrinology* 141, 3055-3056.
- Lee P, Darcy K, Shudo K & IP M. 1995a. Modulation of normal mammary epithelial cell proliferation, morphogenesis, and functional differentiation by retinoids. A comparison of retinobenzoic acid derivative RE80 with retinoic acid. *Endocrinology* 136, 1707-1717.
- Lee P, Darcy K, Shudo K & IP M. 1995b. Interaction of retinoids with steroid and peptide hormones in modulating morphological and functional differentiation of normal rat mammary epithelial cells. *Endocrinology* 136, 1718-1730.
- Leonard J & Rosenberg I. 1980. Iodothyronine 5'-deiodinase from rat kidney: substrate specificity and the 5'-deiodination of reverse triiodothyronine. *Endocrinology* 107, 1376-1383.
- Lochter A. 1998. Plasticity of mammary epithelia during normal development and neoplastic progression. *Biochem. Cell Biol.* 76, 997-1008.
- Macejova D, Liska J & Brtko J. 2001. Mammary gland carcinoma-related increase of type iodothyronine 5'-deiodinase activity in Spague-Dawley rats. *Gen. Physiol. Biophys.* 20, 293-302.
- Mangelsdorf D, Thummel C, Beato M, Herlich P, Schütz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P & Evans R. 1995. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 83, 835-839.

- Mangelsdorf D & Evans R. 1995. The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell* 83, 841-850.
- Mayes P. 1997. Estructura y función de las vitaminas liposolubles. En P. R. Murray, D. Granner, P. Mayes, V. Rodwell (Eds.), *Bioquímica de Harper*. (pp.705-721) Ciudad de México: El Manual Moderno.
- McDowell L. 1989. *Vitamins in animal nutrition*. San Diego: Academic Press.
- McMahon B, Cole T, Lin M, Mirra A, Ravnihar B, Salber E, Valaroas V & Yuasa S. 1970. Age at first birth and breast cancer risk. *Bull. Wld. Hlth. O.* 43, 209-221.
- Medina D. 1996. The mammary gland: A unique organ for the study of development and tumorigenesis. *J. Mam. Gland Biol. Neoplasia* 1, 5-19.
- Menjo M, Murata Y, Fuji T, Nimura & Seo H. 1993. Effects of thyroid and glucocorticoid hormones on the level of messenger ribonucleic acid for iodothyronine type I 5'- deiodinase in rat primary hepatocyte cultures grown as spheroids. *Endocrinology* 133, 2984-2990.
- Metha T, Kute T, Hopkins M & Moon R. 1982a. Retinoic acid binding proteins and steroid receptor levels in human breast cancer. *Eur. J. Cancer Oncol.*18: 221-226.
- Metha R, McCormick D, Cerny W & Moon R. 1982b. Correlation between retinoid inhibition of N-methyl-N-nitrosourea-induced mammary carcinogenesis and levels of retinoic acid binding proteins. *Carcinogenesis* 3, 89-91.

- Mira-Y-López R, Li W, Kuppumbatti Y, Rexer B, Jing Y & Ong D. 2000. Retinol conversion to retinoic acid is impaired in breast cancer cell lines relative to normal cells. *J. Cell. Physiol.* 185, 302-309.
- Napoli J. 1996. Retinoic acid biosynthesis and metabolism. *FASEB J.* 10, 993-1001.
- Napoli J. 1999. Interactions of retinoid binding proteins and enzymes in retinoid metabolism. *Biochim. Biophys. Acta* 1440, 139-162.
- Nogueira C & Brentani M. 1996. Triiodothyronine mimics the effects of estrogen in breast cancer cell lines. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 59: 271-279.
- Olson J. 1986. Physiological and metabolic basis of major signs of vitamin A deficiency. En J.C. Bauernfeind (Ed.), *Vitamin A Deficiency and its control.* (pp. 19-67). London: Academic Press.
- Olson J. 2001. Vitamin A. En R.B. Rucker, J.W. Suttie, D.B. McCormick, M.J. Lawrence (Eds). *Handbook of vitamins* (pp. 1-50). New York: Marcel Dekker Inc.
- Park EA, Song S, Olive M & Roesler WJ. 1997. CCAAT-enhancer-binding protein alpha (C/EBP alpha) is required for the thyroid hormone but not the retinoic acid induction of phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) gene transcription. *Biochem. J.* 322 (Pt 1), 343-349.
- Pfahl M & Chytil F. 1996. Regulation of metabolism by retinoic acid and its nuclear receptors. *Ann. Rev. Nutr.* 16, 257-283.

- Prakash P, Krinsky N & Russell R. 2000. Retinoids, carotenoids , and human breast cancer cell cultures: A review of differential effects. *Nutr. Rev.* 58, 170-176.
- Riedel C, Dohán O, De la Vieja A, Ginter C & Carrasco N. 2001. Journey of the iodine transporter NIS: From its molecular identification to its clinical role in cancer. *Trends Biochem. Sci.* 26, 490-496.
- Rivlin R. 1996. Vitamin metabolism in hypothyroidism. En E Braverman & R Utiger (Eds.), *Werner and Ingbar's The Thyroid. A fundamental and Clinical Text.*(pp. 863-865) Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers.
- Robbins J. 1996. Peripheral hormone metabolism. En E Braverman & R Utiger (Eds.), *Werner and Ingbar's The Thyroid. A fundamental and Clinical Text.*(pp. 162-178) Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers.
- Ross S, McCaffery P, Drager U & De Luca L. 2000. Retinoids in embryonal development. *Physiol. Rev.* 80, 1021-1054.
- Russo I & Russo J. 1998. Role of hormone in mammary cancer initiation and progression. *J. Mam. Gland. Biol. Neoplasia* 3, 49-61.
- Schmutzler C Brtko J, Biernert K & Köhrle J. 1996. Effects of retinoids and role of retinoic acid receptors in human thyroid carcinomas and cell lines derives therefrom. *Exp. Clin. Endocrinol. Diab.* 10, 393-406.
- Schmutzler C & Köhrle J. 2000. Retinoic acid redifferentiation therapy for thyroid cancer. *Thyroid* 10, 393-406.

- Schreck R, Schieders F, Schmutzler C & Körle J. 1994. Retinoids stimulate type I iodothyronine 5'-deiodinase activity in human follicular thyroid carcinoma cell lines. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 79, 791-798.
- Shao Z, Sheik A, Dawson M, Li X, Wilber J, Feng P & Fontana J. 1995. Thyroid hormone enhancement of estradiol stimulation of breast carcinoma proliferation. *Exp. Cell Res.* 218, 1-8.
- Stephanou A & Handwerger S. 1995. Retinoic acid and thyroid hormone regulate placental lactogen expression in human trophoblast cells. *Endocrinology* 136, 933-938.
- Smyth P, Shering G, Kilbane M, Murray M, McDermott E, Smith D & O'Higgins. 1998. Serum thyroid peroxidase autoantibodies, thyroid volume, and outcome in breast carcinoma. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 83: 2711-2716.
- Tazebay U, Wapnir I, Levy O, Dohan O, Zuckier L, Hua-Zhao Q, Deng H, Amenta P, Fineberg S, Pestell R & Carrasco N. 2000. The mammary gland iodide transporter is expressed during lactation and in breast cancer. *Nature Med.* 6, 871-877.
- Thordarson G, Lee A, McMarty M, Van Horn K, Chu O, Chou Y, Yang J, Guzman R, Nandi S & Talamantes F. 2001. Growth and characterization of *N*-methyl-*N*-nitrosourea-induced mammary tumors in intact and ovariectomized rats. *Carcinogenesis* 22, 2039-2047.
- Toyoda N, Zavacki A, Maia L, Harney J & Larsen P. 1995. A novel retinoid X receptor-independent thyroid hormone response element is present in the human type 1 deiodinase gene. *Mol. Cell. Biol.* 15, 5100-5112.

- Valverde-R C, Aceves C & Navarro AL. 1993. Hormonas a la medida y para toda ocasión. *Ciencia y Desarrollo* 111, 22-33.
- Venturi S & Venturi M. 1999. Iodide, thyroid and stomach carcinogenesis: evolutionary story of a primitive antioxidant? *Eur. J. Endocrinol.* 140: 371-372.
- Vonderhaar BK & Greko AE. 1979. Lobulo-alveolar development of mouse mammary gland is regulated by thyroid hormones. *Endocrinology* 104, 409-418.
- Wei L, Lee C, Filipcik P & Chang L. 1997. Regulation of the mouse cellular retinoic acid-binding protein-I gene by thyroid hormone and retinoids in transgenic mouse embryos and P19 cells. *J. Endocrinol.* 155, 35-46.
- Widschwendter M, Daxenbichler G, Dapunt O & Marth C. 1995. Effects of retinoic acid and γ -interferon on expression of retinoic acid receptor and cellular retinoic acid-binding protein in breast cancer cells. *Cancer Res.* 55, 2135-2139.
- Williams G, Harney J, Moore D, Larsen P & Brent G. 1992. Differential capacity of wild type promoter elements for binding and *trans*-activation by retinoic acid and thyroid hormone receptors. *Mol. Endocrinol.* 6, 1527-1537.
- World Health Organization (WHO). 1999. The World Health Report. <http://www.who.int/whr/1999/en/pdf/burden.pdf>.
- Yang L, Tin-U C, Wu K & Brown P. 1999. Role of retinoids receptors in the prevention and treatment of breast cancer. *J. Mam. Gland. Biol. Neoplasia* 4, 377-388.

- Yen P. 2001. Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. *Physiol. Rev.* 81, 1097-114.
- Yonemoto T, Nishikawa M, Matsubara H, Mori Y, Toyoda N, Gondou A, Imai Y, Iwasaka T & Inada M. 1999. Type 1 iodothyronine deiodinase in heart. Effects of triiodothyronine and angiotensin II on its activity and mRNA in cultured rat myocytes. *Endocrine J.* 46, 621-628.

ANEXO I.

SUPERFAMILIA DE RECEPTORES NUCLEARES.

I. GENERALIDADES.

Como ya se menciona en el apartado III de los antecedentes la superfamilia de los receptores nucleares esta formada por factores de transcripción dependientes de ligando. En esta superfamilia se incluyen a los receptores a hormonas esteroides, tironinas, AR, vitamina y PPAR (Mangelsdorf et al., 1995). Estos receptores se unen a los HREs y con su respectivo ligando unido activan la transcripción de genes. La caracterización de muchos de los miembros de esta superfamilia de receptores han revelado características estructurales comunes a todos ellos (figura 12 panel A). Estas proteínas tienen varios dominios, los cuales están divididos en diferentes regiones de la "A" a la "F". La división de cada una de las regiones comienza en el extremo amino y finaliza en el extremo carboxilo. En la porción amino terminal se ubica la región variable A/B que contiene una función autónoma de activación (AF-1). La región C contiene el dominio que se une a una secuencia específica del DNA (DBD), a esta secuencia específica de DNA es la que se conoce como elemento responsivo a hormona (HRE). El DBD esta compuesto por dos motivos "de dedos de zinc". La región C contiene también uno de los dos sitios nucleares de localización y dimerización. La región D es el dominio denominado de "bisagra". En la porción carboxilo terminal se ubica la región E multifuncional. La región E contiene el dominio que une al ligando (LBD), un dominio de dimerización, una región de localización nuclear y también se ubica una segunda función autónoma de activación (AF-2). Finalmente, la región F se ubica la porción más distal del carboxilo terminal. Esta región esta ausente en algunos de los receptores como el receptor de progesterona, PPAR y los receptores a AR de las subfamilias RAR y RXR (Mangelsdorf et al., 1995).

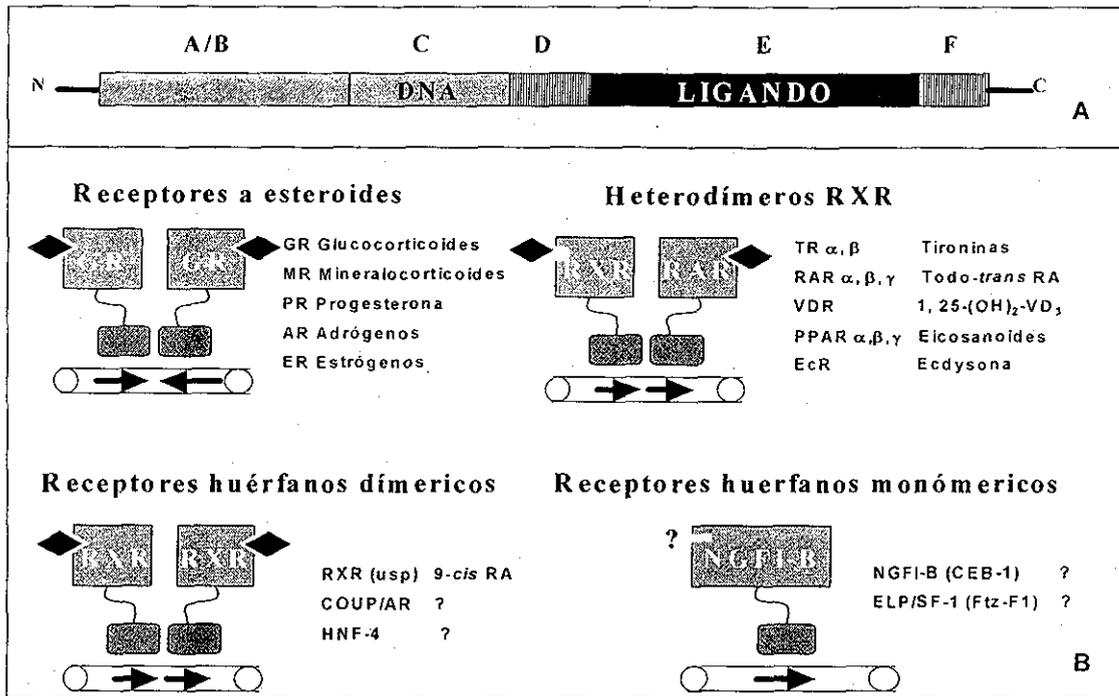


Figura 12. Organización estructural de los receptores nucleares y su clasificación. En el panel A se muestra la estructura general de los receptores nucleares. Típicamente un receptor nuclear contiene una región variable en la porción amino terminal (A/B), una región conservada que une al DNA (C), una región variable de bisagra (D), una región conservada que une al ligando (E) y una región variable en el carboxilo terminal (F). En el panel B se muestra la clasificación de los receptores nucleares de acuerdo a su ligando, su tipo de unión al DNA (representada por las flechas) y por sus propiedades de dimerización. Modificada de Mangelsdorf et al., 1995.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Como ya se menciono la capacidad de los miembros de la superfamilia de los receptores nucleares para regular la expresión de génica se debe la presencia en el gen de los HREs. Estas secuencias reguladoras se localizan cerca del sitio de inicio de la transcripción en dirección 5' río arriba de la región promotora del gen, ocasionalmente se encuentran en regiones intrónicas (Anderson, Mariash & Oppenheimer, 2000). Los HREs están formados por hexanucleótidos (sitio mitad) consenso, los cuales reflejan la forma en que el receptor va a funcionar e interactuar con otros receptores (homodímeros, heterodímeros o monómeros). Los HREs pueden tener varios arreglos entre los que se cuentan a los palíndromas, los repetidos directos y los invertidos (Anderson, Mariash & Oppenheimer, 2000; Mangelsdorf & Evans, 1995).

La superfamilia de receptores nucleares se pueden dividir cuatro clases dependiendo de su dimerización y sus propiedades de unión al DNA (ver figura 12 panel B). La clase I incluye a los receptores a hormonas esteroideas, que funcionan como homodímeros y unen al DNA en sitios-mitad organizados como repeticiones invertidas y palíndromas. La clase II se encuentran agrupados típicamente los receptores que heterodimerizan con los receptores X a AR (RXR) y característicamente se unen a HREs en forma de repeticiones directas. A la clase dos pertenecen los receptores al AR (RAR), a tironinas (TR), a vitamina D, etc. Las clases III y IV incluyen a los receptores llamados "huérfanos", sólo que los primeros forman homodímeros y se une a repeticiones directas, mientras que los de la clase IV se unen como monómeros a los HREs (Mangelsdorf et al., 1995).

II. RECEPTORES A HORMONAS TIROIDEAS.

Existen dos genes que codifican para los receptores a hormonas tiroideas (TRs), el α y el β . Estos genes codifican tres proteínas que regulan la expresión génica en respuesta a la T3 el TR α 1, el TR β 1 y el TR β 2. El gen α sintetiza otras dos variantes más, el TR α 2 y el TR α 3, que no unen el ligando pero afectan la acción de los verdaderos receptores (Kastner, Mark & Chambon, 1995). Los TRs se expresan de manera diferencial en los tejidos. El TR β 1 se expresa abundantemente en el hígado y el riñón; pero está ampliamente distribuido en todo el organismo. El TR β 2 está particularmente presente en la hipófisis y en el hipotálamo mientras que el TR α 1 es menos abundante y se expresa primordialmente en el corazón (Lazar, 2000). En pacientes con mutaciones en el gen del TR β se ha encontrado que presentan un síndrome general de resistencia a las tironinas (SGRT), caracterizado por altos niveles circulantes de la TSH y de tironinas. En este síndrome también se manifiestan una serie de signos y síntomas similares a los que ocurren en los casos de déficit de tironinas (defectos en la audición, retraso mental, poca capacidad para el aprendizaje y desordenes emocionales). Estas mutaciones que siempre se localizan en el LBD, reducen o eliminan la capacidad de unir al ligando pero no se afecta la formación de heterodímeros con los receptores RXR ni la unión con el DNA. En estudios *In vitro* se ha observado que los receptores mutantes actúan como dominantes negativos e inhiben la activación de T3 dependiente por los TR silvestres. Los pacientes con SGRT, tienen otros defectos, como malformaciones del esqueleto que no pueden ser explicadas en base a la privación de tironinas. Por lo que probablemente una mutación dominante negativa de TR β puede interferir con eventos normalmente mediados por TRs, sino vía RXR. En contraste no se han encontrado mutaciones en TR α en pacientes con SGRT. Las mutaciones en el gen del TR α pueden ser desde letales hasta pasar por defectos menores (Kastner, Mark & Chambon, 1995). En la tabla 7 se enlistan algunos de los genes que son regulados por la T3.

Tabla 7. Lista de algunos genes regulados por las hormonas tiroideas.

Función	Genes	Tipo de regulación	Tejido
Endocrina	Hormona de crecimiento ^{1,2,3}	↑	Células GC
	Subunidad α TSH ^{1,2}	↓	Tumor tirotóxico
	Subunidad β TSH ^{1,2,3}	↓	Tumor tirotóxico
	TRH ^{1,2}	↓	Hipotálamo
	Desyodasa tipo I ^{1,2,3}	↑	Hígado
	Lactógeno placentario ^{1,2,3}	↑	Trofoblastos
	Globulina que une las hormonas sexuales ^{1,3}	↑	Células de hepatocarcinoma
	Globulina que une a la tiroxina ^{1,3}	↓	Células de hepatocarcinoma
	Metabolismo Intermedio	Enzima Málica ^{1,2}	↑
Glucosa-6-fosfatasa ¹		↑	Hígado
Gen S14 ^{1,2}		↑	Hígado
Fosfoenolpiruvato carboxicinas ^{1,2,3}		↑	Hígado
(Probable) Factor de transcripción del gen de la insulina ¹		↓	Hígado
Glicerol fosfato deshidrogenasa ¹		↓	Hígado
Apolipoproteína A1 ^{1,2,3}		↓ y ↑	Hígado
Proliferación celular y replicación	B61 ¹	↑	Hígado
	Bcl3 ¹	↑	Hígado
	Proteína similar a la kinesina (<i>Kip1p</i>) ¹	↑	Hígado
Transducción de señales	Receptor adrenérgico β-2 ¹	↑	Hígado
	Inhibidor de la proteína cinasa C (<i>mPKC</i>) ¹	↑	Hígado
	Proteína G inhibitoria de la adenilato ciclasa, cadena α ¹	↓	Hígado
	Laminina A ¹	↓	Hígado
Proteínas del citoesqueleto	β-actina ¹	↑	Hígado
	α-miosina (cadena pesada) ^{1,2}	↑	Miocardio
	β-miosina (cadena pesada) ^{1,2}	↑	Miocardio
Otras	UCP-I ^{1,2,3}	↑	Tejido adiposo pardo (adipocitos)
	CRABP-I ^{1,3}	↓	Embriones de ratones transgénicos
	Proteína básica de mielina ^{1,2}	↑	SNC

CRBP-I: Proteína celular que une al ácido retinoico tipo I TSH: Hormona estimulante del tiroides; UCP-I: Proteína desacopladora de la fosforilación oxidativa. ↑ Genes regulados positivamente, ↓ Genes regulados negativamente, ¹Genes identificados por un aumento o disminución en la expresión del mRNA o de la actividad de la proteína, ²Genes en los que se ha identificado elementos responsivos a tironinas (TRE) y ³Genes identificados cuya expresión se modifica por acción directa o indirecta del ácido retinoico. Referencias: Aceves, 1997; Anderson, Mariash & Oppenheimer, 2000; Breen, Hickok & Gurr, 1997; Crowe et al., 1996; Feng et al., 2000; Hargrove, Junco & Wong, 1999; Hernández & Obregón, 2000; Köhrle, 1999a; Park et al., 1997; Toyoda et al., 1995; Stephanopu & Handwerker, 1995; Wei et al., 1997; Williams et al., 1992; Yen, 2001.

III. RECEPTORES NUCLEARES A ÁCIDO RETINOICO.

Se han descrito dos subfamilias de receptores nucleares al AR, los RAR y RXR. Cada una de estas subfamilias de receptores consiste de tres subtipos (α , β y γ). La subfamilia RAR se activa por los isómeros del AR, *todo-trans*, *9-cis* y *13-cis*, mientras que la familia RXR se activan exclusivamente por el *9-cis* AR. Los RARs y RXRs exhiben la estructura modular de los otros receptores nucleares. Los aminoácidos localizados en el centro de la región C, contienen dos motivos de dedos de zinc, que corresponden al centro del DBD responsable para el reconocimiento de los cognados de los elementos responsivos. La región C está altamente conservada entre los tipos RAR (94-97%) y entre los tipos RXR (91-97%). La región E, también esta altamente conservada entre los tipos RAR (84-90%) y los tipos RXR (88-95%) (Chambon, 1996).

Los RAR y los RXR interactúan con coactivadores transcripcionales como el SRC1 y el TIF2 y con corepresores, que incluyen el N-CoR y el SMRT. Los receptores a retinoides también pueden interactuar con otros factores de transcripción como el AP-1, un mediador de la actividad mitogénica. La interacción entre el AP-1 y los receptores a retinoides trae como consecuencia una inhibición del efecto del AP-1 y por ello se dice que el AR puede ejercer un efecto de represión del crecimiento (Schmutzler & Köhrle, 2000; Yang et al., 1999).

Algunas de las acciones fisiológicas de los retinoides han sido inferidas de estudios en los que ha estado implicada la deficiencia de vitamina A. Estos estudios han demostrado que los retinoides se requieren durante los periodos pre y posnatal del desarrollo. El retinol es necesario para la sobrevivencia, crecimiento, desarrollo y mantenimiento de la visión. Estudios en ratones en los que se les ha deletado o inactivado el gen de los receptores a AR demuestran estas aseveraciones (ver tabla 8) (Yang et al., 1999). Por otra parte en la Tabla 9 se muestran algunas proteínas cuyo gen es regulado por el AR.

Tabla 8. Fenotipos de ratones “knockout” en los receptores a ácido retinoico.

Receptor	Viabilidad	Fenotipo
RAR α	Si	Reducción de la viabilidad, deficiencia en el crecimiento, esterilidad de los machos, malformaciones congénitas
RAR β	Si	Fenotipo normal; animales capaces de llegar a la edad adulta de reproducirse
RAR γ	Si	reducción de la viabilidad, deficiencia en el crecimiento, esterilidad de los machos, malformaciones congénitas
RXR α	No	Animales que mueren <i>in utero</i> al día 16.5 de la gestación, tienen malformaciones oculares y miocárdicas.
RXR β	Si	Esterilidad en los machos
RXR γ	Si	Fenotipo normal, animales capaces de llegar a la edad adulta y reproducirse

Modificado de Yang et al., 1999.

Tabla 9. Lista de algunos genes regulados por el ácido retinoico.

Función	Genes	Tipo de regulación
Señalización y metabolismo del ácido retinoico	RAR α 2 ^{1,2}	↑
	RAR β 2 ^{1,2}	↑
	RAR γ 2 ^{1,2}	↑
	CRBP-I ^{1,2}	↑
	CRBP-II ^{1,2}	↑
	CRABP-I ^{1,3}	↓
	CRABP-II ^{1,2}	↑
Endocrina	Alcohol deshidrogenasa (clase I, tipo 3) ^{1,2}	↑
	Hormona de crecimiento ^{1,2,3}	↑
	Desyodasa tipo I ^{1,2,3}	↑
Morfogénica	Sub unidad β , TSH ^{1,2,3}	↓
	Lactogéno placentario	↑
	Hox a-1 (Hox 1.6) ^{1,2}	↑
Otras	Hox b-1 (Hox 2.9) ^{1,2}	↑
	Fosfoenolpiruvato carboxicinas ^{1,2,3}	↑
	Apolipoproteína A-I ^{1,2,3}	↓ y ↑
	Laminina B1 ^{1,2}	↑
	Lactoferrina ^{1,2}	↑
	UCP-I ^{1,2,3}	↑

CRABP-I: Proteína celular que une al ácido retinoico tipo I; CRABP-II: Proteína celular que une al ácido retinoico tipo II; CRBP-I: Proteína celular que une al retinol tipo I; CRBP-II: Proteína celular que une al retinol tipo II; TSH: Hormona estimulante del tiroides; UCP-I: Proteína desacopladora de la fosforilación oxidativa. ↑ Genes regulados positivamente, ↓ Genes regulados negativamente, ¹Genes identificados por un aumento o disminución en la expresión del mRNA o de la actividad de la proteína, ²Genes en los que se ha identificado elementos responsivos al ácido retinoico (RARE) y ³Genes identificados cuya expresión se modifica por acción directa o indirecta de la T3. Referencias: Breen, Hickok & Gurr, 1997; Geng et al., 1998; Hargrove, Junco & Wong, 1999; Hernández & Obregón, 2000; Köhrle, 1999a; Olson, 2001; Park et al., 1997; Ross et al., 2000; Stephanou & Handwerker, 1995; Wei et al., 1997; Williams et al., 1992.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química y nomenclatura de las tironinas.....	5
Figura 2. Desyodación secuencial de la T4.....	9
Figura 3. Estructura de los retinoides y sus precursores.....	13
Figura 4. Rutas metabólicas de los retinoides catalizadas por enzimas con actividad de retinoide deshidrogenasa.....	22
Figura 5. Fotografías de las células (A) MCF-7 y (B) MDA-MB-231 mantenidas en cultivo (Amplificación 100x).....	33
Figura 6. Actividad desyodativa tipo I (D1) en las células HepG2 con diferentes tratamientos.....	35
Figura 7. Efecto del PTU sobre la actividad 5'D en las células MCF-7.....	36
Figura 8. Actividad desyodativa tipo I (D1) en las células MCF-7 tratadas con isoproterenol (ISO) y T3.....	38
Figura 9. Efecto del ácido retinoico (AR) sobre la actividad desyodativa tipo I (D1) en células MCF-7.....	39
Figura 10. Ensayo de desyodación en células MDA-MB-231 tratadas con Isoproterenol (ISO) y T3.....	41
Figura 11. Ensayo de desyodación en células MDA-MB-231 tratadas con ácido retinoico (AR).....	42
Figura 12. Organización estructural de los receptores nucleares y su clasificación.....	67

ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla 1. Comparación de las tres principales proteínas transportadoras de tironinas en el humano.....	8
Tabla 2. Resumen de las propiedades de las tres desyodasas de tironinas.....	11
Tabla 3. Proteínas intracitoplásmicas que unen retinoides presentes en mamíferos.....	17
Tabla 4. Enzimas con actividad de retinoide deshidrogenasa en cordados.....	19
Tabla 5. Características de las enzimas con actividad de retinoide deshidrogenasa.....	20
Tabla 6. Comparación de la actividad 5'D entre la línea celular MCF-7 y la MDA-MB-231.....	40
Tabla 7. Lista de algunos genes regulados por las hormonas tiroideas.....	70
Tabla 8. Fenotipos de ratones "knockout" en los receptores a ácido retinoico.....	72
Tabla 9. Lista de algunos genes regulados por el ácido retinoico.....	72