

03040
3



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

**EFFECTO DE LAS YODOTIRONINAS SOBRE
LA REGULACIÓN DE LAS DESYODASAS TIPO 1 Y 2
EN EL HÍGADO DEL *Fundulus heteroclitus*.**

TESIS QUE PARA OBTENER EL
GRADO DE MAESTRÍA EN CIENCIAS
(NEUROBIOLOGÍA)

PRESENTA

M.C. María Carlota García Gutiérrez

DIRECTORA DE TESIS: DRA. AUREA OROZCO RIVAS

Campus Juriquilla, Querétaro. Marzo del 2003.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

PAGINACIÓN DISCONTINUA

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

Este trabajo fue apoyado por:
Beca de Maestría CONACYT No. 162656
Beca de DGEP No. Cuenta 9552542-0
Proyecto CONACYT 34311 y 37866-N
Proyecto PAPIIT IN 201202

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

A Armando, Mary, Pati y Tatiana.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Agradecimientos.

A Aurea Orozco Rivas.

A los miembros del comité tutorial, por sus aportaciones durante mis cuatro semestres de formación:

Dr. Manuel Salas Alvarado
Dr. Mauricio Díaz Muñoz

Dra. Aurea Orozco Rivas

A los miembros del jurado por la detallada revisión de la tesis y comentarios:

Dra. Carmen Clapp Jiménez-Labora
Dra. Aurea Orozco Rivas
Dra. Bertha Fenton Navarro

Dr. Mauricio Díaz Muñoz
Dra. Edith Garay Rojas

Por su valiosa apoyo tanto en mi formación como en el desarrollo de este trabajo:

Dr. Carlos M. Valverde Rodríguez
Dr. Michael Jeziorski
M. en C. Patricia Villalobos

Enf. Angeles Zavala
M.C. Juan Carlos Solis

Por todo su apoyo, confianza y amor:

Armando
Mary
Pati
Eduardo
Tatiana

Tavo
Cesar Eduardo
Julian Eduardo
Carlota Luna

Por ofrecerme su amistad y hacer mas placentera mi estancia en Qro:

Arcadios
Berta
Edith
Felipe

Gloria
Jc
Leticia
Los González

Luis
Sofia
Victor

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

D

RESUMEN.

La principal hormona tiroidea (TH) secretada por la glándula tiroidea es la tiroxina ó T4. La desyodación órgano-específica del anillo externo de la molécula de T4 por las enzimas desyodasa tipo 1 (D1) y tipo 2 (D2) forma la triyodotironina ó T3, hormona responsable de los efectos biológicos. La desyodación posterior del anillo externo de la T3 genera la 3,5-diyodotironina (3,5-T2), hasta hace poco considerada un producto inactivo del metabolismo de TH. Sin embargo, recientemente se ha reportado que a dosis altas la 3,5-T2 es activa. Estos resultados así como los hallazgos que muestran que el hígado del pez teleosteo *Fundulus heteroclitus* (*F. heteroclitus*) expresa actividad D1 y D2 llevaron a comparar el efecto de la 3,5-T2 con el de las tironinas conocidas como activas, la T3 y la T4, sobre la D1 y D2 hepáticas en el *F. heteroclitus*. Para este fin, se diseñó una técnica de PCR competitivo para medir los niveles de mRNA de D1 y D2 (D1-mRNA y D2-mRNA), los cuales fueron comparados con su correspondiente actividad enzimática. Los peces fueron tratados por inmersión (12 y 24 h) con 0.1 µM de T4, T3 ó 3,5-T2. A diferencia de lo que se ha reportado en mamíferos, ninguna de las TH modificó significativamente la actividad D1, sin embargo, las 3 disminuyeron la concentración del D1-mRNA. Así mismo, las tres TH redujeron significativamente tanto la actividad como la expresión del D2-mRNA en el siguiente orden: T2>>T3>T4. El hallazgo más importante de la presente tesis es la identificación de la 3,5-T2 como un mensajero con actividad tiromimética potente. Esto resulta muy relevante ya que genera una línea nueva de estudio la cual permitirá explorar si este metabolito de TH participa en la diversidad funcional de las yodotironinas, y así ampliar el conocimiento fundamental de la fisiología tiroidea.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ABSTRACT.

Although it is widely considered to be an inactive product of thyronine (TH) metabolism, 3,5-diiodothyronine (3,5-T₂) has recently been described as a bioactive biological product when tested at high doses (~5x the dose for T₃). Its effects upon deiodinases type 1 (D1) and 2 (D2), the enzymes that catalize the TH outer ring-deiodinating (ORD) pathway, are not yet known, however. These facts and the current data showing that killifish liver expresses the two enzymes that catalyze the TH ORD pathway led us to compare the effect of 3,5-T₂ to that of the known bioactive thyronines T₄ and T₃ upon these deiodinases in killifish liver. To this end, we designed a competitive PCR technique to measure D1 and D2 mRNA levels, which were compared to their enzymatic activity. Fish were treated by immersion (12 or 24 h) with 0.1 μM of T₄, T₃, or 3,5-T₂. In contrast to what has been reported in mammals, no TH exerted a significant effect on D1 activity; although the 3 TH decreased the D1-mRNA concentration. However, all three TH significantly decreased D2 activity and mRNA levels in the following order: T₂>>T₃>T₄. Thus, these data are consistent with the high circulating levels of T₃ characteristic of marine teleosts, suggesting the possible role of this TH as a precursor for a more bioactive thyronine. The most important finding of the present work was the identification of 3,5-T₂ as messenger with potent thyromimetic activity. This results very relevant as it generates a new line of research, which will broaden the fundamental knowledge of thyroid physiology.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ÍNDICE

RESUMEN.	pp 1
ABSTRACT.	pp 2
INTRODUCCIÓN.	pp 6
ANTECEDENTES.	pp 7
I. LAS HORMONAS TIROIDEAS.	pp 7
II. LA GLÁNDULA TIROIDES.	pp 11
III. BIOSÍNTESIS DE LAS HORMONAS TIROIDEAS.	pp 13
IV. CONTROL DE LA FUNCIÓN TIROIDEA.	pp 14
V. TRANSPORTE DE LAS HORMONAS TIROIDEAS.	pp 15
VI. MECANISMO DE ACCIÓN DE LAS HORMONAS TIROIDEAS.	pp 16
VII. METABOLISMO DE LAS HORMONAS TIROIDEAS.	pp 17
A DESYODACIÓN	pp 18
1. DESYODASA TIPO 1 (D1).	pp 19
a. Localización.	pp 19
b. Función.	pp 20
c. Características cinéticas.	pp 20
d. Características moleculares.	pp 21
e. Regulación.	pp 21
2. DESYODASA TIPO 2 (D2).	pp 23
a. Localización.	pp 23
b. Función.	pp 23
c. Características cinéticas.	pp 23
d. Características moleculares.	pp 24
e. Regulación.	pp 24
VIII. HORMONAS TIROIDEAS Y PECES.	pp 25
A DESYODASAS EN TELEÓSTEOS.	pp 26
1. REGULACIÓN.	pp 27
JUSTIFICACIÓN.	pp 31
HIPÓTESIS.	pp 32

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

OBJETIVOS.	pp 32
MATERIAL Y MÉTODOS.	pp 33
I. Animales.	pp 33
II. Validación del método de administración de yodotironinas por inmersión.	pp 33
A Cuantificación de la concentración hepática de T4 y T3.	pp 34
III. Cuantificación de la actividad desyodativa.	pp 36
IV. Cuantificación de la cantidad de mRNA que codifica para la D1 y la D2.	pp 37
A Diseño y construcción de competidores específicos para FhD1 y FhD2.	pp 38
1. Inserción del sitio de restricción para la enzima Hind III.	pp 38
2. Inserción del fragmento de 44 pb.	pp 39
3. Preparación de la curva estándar de los competidores FhD1c y FhD2c.	pp 40
B Extracción del RNA.	pp 41
C Obtención del cDNA FhD1 y FhD2 hepático.	pp 41
D PCR cuantitativo para FhD1 y FhD2.	pp 42
V. DISEÑO EXPERIMENTAL.	pp 44
A Tratamiento por inmersión con T4, T3 ó 3,5-T2.	pp 44
RESULTADOS.	pp 45
I. Efecto de la T4 en la actividad enzimática y la expresión de los mRNAs FhD1 y FhD2 hepáticos.	pp 45
II. Efecto de la T3 en la actividad enzimática y la expresión de los mRNAs FhD1 y FhD2 hepáticos.	pp 45
III. Efecto de la 3,5-T2 en la actividad enzimática y la expresión de los mRNAs FhD1 y FhD2 hepáticos.	pp 48
IV. Efecto de la administración de yodotironinas sobre la actividad desyodativa D2 hepática.	pp 48
DISCUSIÓN.	pp 51
I. Tratamiento por inmersión.	pp 51

II.	Estandarización de los PCR's cuantitativos.	pp 52
III.	Efectos de las yodotironinas sobre la regulación de la D1 hepática de <i>F. heteroclitus</i> .	pp 53
IV.	Efectos de las yodotironinas sobre la regulación de la D2 hepática de <i>F. heteroclitus</i> .	pp 56
V.	Efectos de la 3,5-T2 sobre las enzimas que catalizan la vía ORD.	pp 58
VI.	Comentarios finales y reflexiones.	pp 61
	CONCLUSIONES.	pp 62
	PERSPECTIVAS.	pp 63
	REFERENCIAS.	pp 64
	ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS.	pp 75
	ABREVIATURAS	pp 77
	APÉNDICES.	pp 80
	Anexo 1. <i>Fundulus heteroclitus</i> .	pp 80
	Anexo 2. COMPOSICIÓN DEL AGUA DE MAR.	pp 82
	Anexo 3. CIRCULACIÓN SANGUÍNEA EN TELEÓSTEOS.	pp 83
	Anexo 4. PRODUCCIÓN.	pp 86
	Participación en el "21st Conference of European Comparative Endocrinologists".	pp 87
	Manuscrito: "3,5-Diiodothyronine (T2) regulates the hepatic outer ring deiodinating pathway in killifish".	pp 90

<p>TESIS CON FALLA DE ORIGEN</p>

INTRODUCCIÓN.

De los mensajeros endocrinos conocidos, las hormonas tiroideas o yodotironinas (TH) son únicas ya que se trata de aminoácidos modificados que contienen yodo en su molécula (Escobar *et al.*, 1999). El interés de nuestro grupo de trabajo radica en el estudio de una de las vías metabólicas a través de las cuales se regula la actividad biológica de TH a nivel celular, la vía desyodativa. Se trata de una biotransformación órgano-específica catalizada por 3 isoenzimas, las desyodasas (D) que al remover átomos de yodo de sitios específicos de las moléculas de yodotironinas generan, localmente, formas activas o inactivas de la hormona (Bianco *et al.*, 2002).

Estudios recientes de nuestro grupo mostraron que a diferencia del resto de los vertebrados, el hígado de algunos peces teleósteos co-expresa las dos enzimas que catalizan la vía de activación de estas hormonas (Orozco *et al.*, 1997; Orozco *et al.*, 2000). Posteriormente, se clonaron los dos cDNAs que codifican la expresión de estas enzimas en el hígado del *F. heteroclitus* (Valverde-R *et al.*, 1997; Orozco *et al.*, 2002a; Orozco *et al.*, 2003; Villalobos, 2000). Hemos descrito que al igual que en los mamíferos, estas enzimas responden de manera diferente a las mismas situaciones fisiológicas, lo que sugiere la operación de mecanismos de regulación específicos para cada una de las desyodasas (Orozco *et al.*, 1998; Orozco *et al.*, 2002b). Estudios en mamíferos han mostrado que las mismas yodotironinas participan en la regulación de las desyodasas (Bianco *et al.*, 2002). La presencia de ambas enzimas en el hígado del *F. heteroclitus* convierte a este órgano en un modelo ideal para analizar algunos aspectos de esta posible regulación diferencial. Así, el presente trabajo es la continuación de un proyecto más amplio encaminado a estudiar la regulación de la vía de activación de las hormonas tiroideas en los teleósteos, y concretamente analiza cual es el efecto y el posible mecanismo a través del cual las yodotironinas regulan la actividad de las desyodasas tipo 1 (D1) y tipo 2 (D2) en el hígado del *F. heteroclitus*.

ANTECEDENTES.

I. LAS HORMONAS TIROIDEAS.

Las hormonas tiroideas o yodotironinas son una familia de mensajeros endocrinos que contienen yodo en su molécula y que son responsables de mantener un estado de bienestar general en la mayoría de los tejidos del organismo. Las TH ejercen efectos directos sobre sus órganos blanco; así como efectos permisivos que ocurren en cooperación con otras hormonas. En los vertebrados participan en el crecimiento, la diferenciación, el metabolismo energético, en funciones como la reproducción y especialmente en el desarrollo y maduración del sistema nervioso central. Además, ejercen efectos especie-específicos como son la migración y la osmorregulación en peces, la metamorfosis en anfibios, la muda de piel en los reptiles, la termogénesis y la conducta migratoria en las aves. En los mamíferos, en donde existe mayor información, se sabe que juegan un papel importante en el balance metabólico, el consumo de oxígeno y la calorificación además de otros efectos que se resumen en la Tabla 1 (Norris, 1985).

La estructura química de las TH es homóloga en todos los vertebrados (Fig. 1). Consiste en dos anillos bencénicos unidos por un puente de oxígeno. El anillo interno conserva la cadena alanina y por ello también es conocido como anillo tirosilo; mientras que el anillo externo contiene un grupo hidroxilo en el carbono 4, por lo que también se denomina fenilo. Debido a constricciones espaciales, los átomos de yodo en la moléculas de las TH solo se pueden localizar en las posiciones 3, 5, 3' y 5', en número máximo de 4. Considerando que su peso atómico es de 127, se comprende que el contenido de yodo representa el 65% del peso molecular de la hormona que presenta 4 átomos del halógeno. Esta yodotironina es la 3, 5, 3', 5'-tetrayodotironina o tiroxina (T4), que únicamente se produce en la glándula tiroidea y es el producto mayoritario de su secreción. La T4 tiene una vida media ($t_{1/2}$) circulante de aproximadamente una semana y se considera una forma poco bioactiva y precursora de la 3,5,3'-triyodotironina (T3). Esta última yodotironina se produce tanto en la glándula tiroidea como en los tejidos extratiroideos por la pérdida de un átomo de yodo del anillo fenilo de la T4. La T3 tiene

TESTS COM
PA

TABLA 1. Principales Efectos de las Hormonas Tiroideas en los Mamíferos.

CALORIGÉNESIS	Favorece la glucólisis y el consumo de oxígeno. Estimulan la síntesis de las subunidades α y β de la bomba de Na^+/K^+ ATPasa dependiente. Controlan síntesis de termogenina (UCP) en la grasa parda.
METABOLISMO DE VITAMINAS	Participan en la síntesis de vitamina A. Inhiben la fosforilación de tiamina y aumentan la demanda de otros componentes del complejo B.
CRECIMIENTO Y DIFERENCIACIÓN CELULAR	ESTIMULAN: Crecimiento somático. Producción de GH. Maduración del sistema nervioso. Osificación epifisaria.
SISTEMA NERVIOSO CENTRAL	Esenciales (período crítico) en desarrollo y maduración neuronal. Modulan la velocidad de conducción-excitación y regulan patrones conductuales.
METABOLISMO DE CARBOHIDRATOS	AUMENTAN: Absorción y utilización de glucosa. Glucogenólisis. Degradación de insulina.
SISTEMA CARDIOVASCULAR	Efecto inotrópico y cronotrópico positivos. Sinergismo con catecolaminas.
METABOLISMO DE LÍPIDOS	ACELERAN: Síntesis, degradación y excreción biliar de colesterol y ácidos biliares.
SISTEMA HEMATOPOYÉTICO	Participan en la síntesis de hemoglobina. Absorción de vitamina B12 y ácido fólico.
METABOLISMO PROTEICO	Anabolismo/catabolismo (dependiendo de los niveles).
METABOLISMO MUSCULAR	Inhiben conversión de creatina a fosfocreatina.
METABOLISMO HIDROELECTROLÍTICO	Aumentan la filtración glomerular. Diuresis de sodio extracelular.
FUNCIÓN HIPOFISIARIA	Regulan la síntesis y secreción de TSH, GH, FSH, LH y PRL.
FUNCIÓN REPRODUCTIVA	GONADAS: Necesarias para la diferenciación gonadal. GLÁNDULA MAMARIA: Esenciales para la diferenciación funcional de primordios alveolares. Forman parte del complejo galactopoyético.
APARATO GASTROINTESTINAL	REGULAN: Velocidad del tránsito intestinal.

En donde: TSH, hormona estimulante de la tiroides; GH, hormona de crecimiento; FSH, hormona folículo estimulante; LH, hormona luteinizante; PRL, prolactina. Modificada de: Escobar *et al.*, 1999; Norris 1985.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

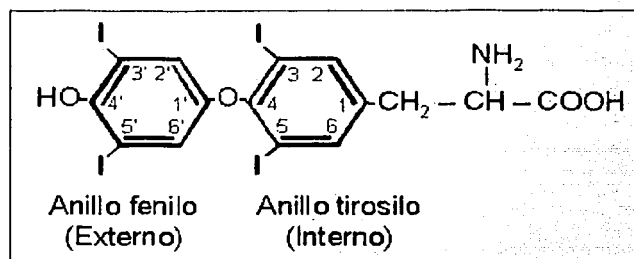


Fig. 1. Estructura general de las yodotironinas.

una $t_{1/2}$ circulante aproximada de un día y se considera la hormona metabólicamente activa por presentar la mayor afinidad a los receptores de TH. La 3,3',5'-triyodotironina (rT3), un isómero de la T3 que es secretada en pequeñas cantidades por la glándula tiroides, se produce principalmente en los tejidos extratiroides por la pérdida de un átomo de yodo del anillo interno de la T4. La rT3 tiene una $t_{1/2}$ en circulación de alrededor de una hora y no se le conoce actividad biológica (Escobar *et al.*, 1999).

Hasta hace poco tiempo se consideraba que las únicas TH activas eran la T4 y la T3 y que el resto de yodotironinas correspondía a productos de catabolismo. Sin embargo, en los últimos dos lustros se han acumulado evidencias acerca de la actividad biológica de otras yodotironinas que contienen un menor número de átomos de yodo en la molécula. Así, se ha reportado que la 3,5-diyodotironina (3,5-T2), un metabolito que se obtiene por la desyodación del anillo externo de la T3, tiene efectos biológicos selectos similares a los de T3 (Tabla 2). Así mismo, se han encontrado niveles circulantes de esta hormona en un orden de magnitud menor que los de T3 y T4, especialmente en pacientes con patologías no tiroideas (Pinna *et al.*, 1997).

TESIS CON
 CALLA DE ORIGEN

TABLA 2. Efectos tiromiméticos reportados para la 3,5-T2.

Efectos mitocondriales.	Referencias.
<p>INCREMENTA:</p> <p>Consumo de oxígeno en hígado de rata.</p> <p>Consumo de oxígeno de células sanguíneas mononucleares.</p> <p>Respiración mitocondrial en hígado.</p> <p>Consumo de Ca⁺⁺ mitocondrial.</p> <p>Actividad α-glicerofosfato deshidrogenasa.</p> <p>Actividad de la cadena respiratoria.</p> <p>Actividad citocromo oxidasa.</p> <p>β-oxidación.</p>	<p>Sterling <i>et al.</i>, 1988.</p> <p>O'Reilly y Murphy, 1992.</p> <p>Casas <i>et al.</i>, 2000; Lanni <i>et al.</i>, 1992; Lanni <i>et al.</i>, 1993.</p> <p>Horst <i>et al.</i>, 1989.</p> <p>Moreno <i>et al.</i>, 2002.</p> <p>Goglia F <i>et al.</i>, 1994b.</p> <p>Casas <i>et al.</i>, 2000; Goglia <i>et al.</i>, 1994a; Lombardi <i>et al.</i>, 1998.</p> <p>Lombardi <i>et al.</i>, 2000.</p>
<p>Efectos extra mitocondriales.</p>	
<p>INCREMENTA:</p> <p>Actividad de la enzima málica.</p> <p>Actividad glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa.</p> <p>Actividad desyodativa tipo 1.</p> <p>Metabolismo de leucina.</p> <p>Tolerancia al frío en ratas hipotiroideas.</p> <p>Tasa de metabolismo basal.</p> <p>Volumen de la célula folicular en <i>Locusta migratoria</i>.</p> <p>ESTIMULA:</p> <p>Secreción de GH.</p> <p>Metabolismo lipídico.</p> <p>INHIBE:</p> <p>Secreción de TSH.</p> <p>Proliferación celular en cáncer.</p>	<p>Cimmino <i>et al.</i>, 1996; Moreno <i>et al.</i>, 2002.</p> <p>Lombardi <i>et al.</i>, 2000.</p> <p>Baur <i>et al.</i>, 1997; Baur y Kohrle, 1999.</p> <p>Lombardi <i>et al.</i>, 2000.</p> <p>Lanni <i>et al.</i>, 1998.</p> <p>Kadenbach <i>et al.</i>, 2000; Lanni <i>et al.</i>, 1996; Lombardi <i>et al.</i>, 2000; Moreno <i>et al.</i>, 1997; Moreno <i>et al.</i>, 2002.</p> <p>Davey K, 2000</p> <p>Moreno <i>et al.</i>, 1998; Moreno <i>et al.</i>, 2002.</p> <p>Varghese <i>et al.</i>, 2001; Varghese y Oommen, 1999.</p> <p>Ball <i>et al.</i>, 1997; Everts <i>et al.</i>, 1995; Horst <i>et al.</i>, 1995.</p> <p>Martinez <i>et al.</i>, 2000.</p>

Modificado de Lanni *et al.*, 2001.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

II. LA GLÁNDULA TIROIDES.

Las TH son sintetizadas y secretadas por la glándula tiroides. La forma de la glándula varía a lo largo de todas las diferentes clases de vertebrados, pero cada clase conserva una forma característica (Fig. 2). En los ciclóstomos y la mayoría de los teleósteos, el tejido tiroideo se encuentra como folículos dispersos o como grupos de folículos en la región faríngea. En algunos teleósteos los folículos tiroideos pueden migrar a otras regiones del cuerpo y permanecen funcionales en su localización ectópica (Gorbman *et al.*, 1983).

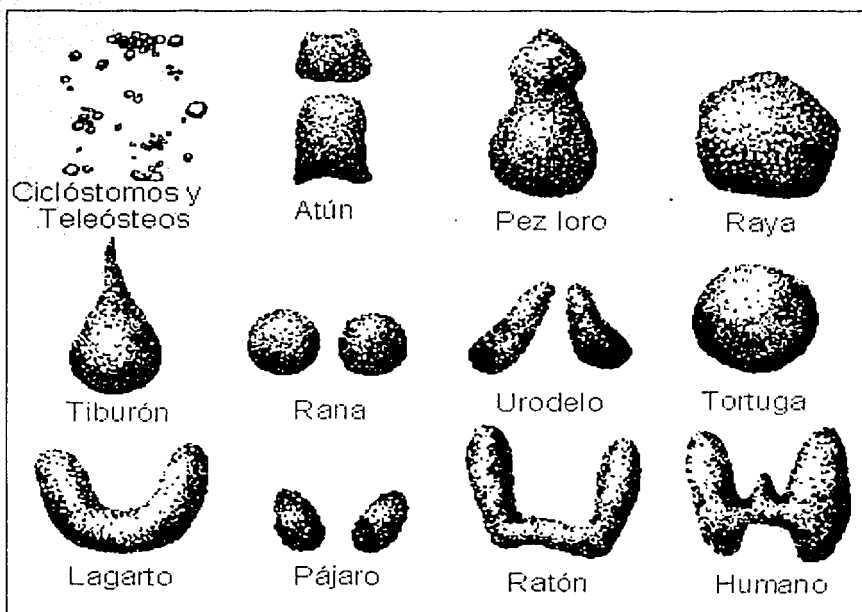


Fig. 2. Morfología de la glándula tiroides en distintos vertebrados (Modificada de Gorbman *et al.*, 1983).

En todos los casos, la unidad estructural y funcional básica de la glándula tiroides es el folículo tiroideo y la estructura de estas células foliculares presenta una uniformidad considerable en todas las clases de vertebrados. El folículo consiste en una estructura esférica formada por una capa de células epiteliales que rodea a un espacio

extracelular relleno de un gel de proteínas (coloide) donde se pueden almacenar grandes cantidades de TH (Fig. 3).

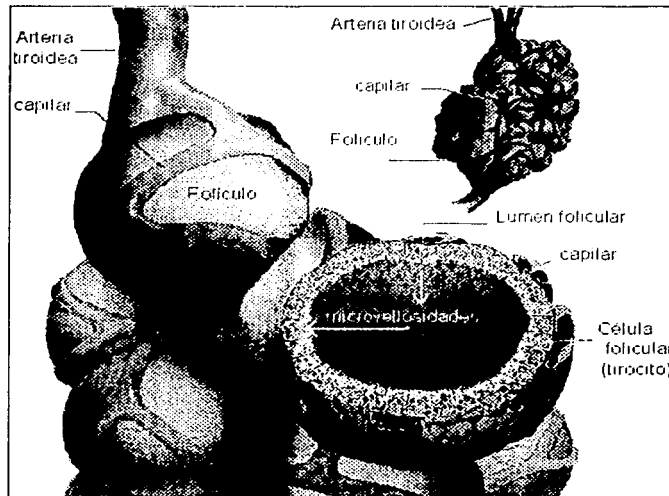


Fig. 3. Folículo tiroideo, unidad funcional de la glándula tiroidea. Destacan las células foliculares y el lumen folicular, en el cual se encuentra el coloide (modificada de Matsumoto y Ishii, 1992).

El coloide tiroideo está principalmente formado por la tiroglobulina (Tg), una glicoproteína de gran tamaño molecular (660 kD) que contiene en su estructura a las hormonas T4 y T3. Además, el coloide contiene otras proteínas yodadas y albúmina. Las células epiteliales o tirocitos que forman al folículo presentan características especiales, las cuales les permiten sintetizar, almacenar y secretar a las hormonas tiroideas. A diferencia del resto de células endocrinas conocidas en los vertebrados, los tirocitos exhiben una organización funcional que es característica de los tejidos exocrinos. Los tirocitos se organizan en el folículo de acuerdo a su polaridad funcional, así la superficie luminal de la célula protruye hacia la luz folicular a través de microvellosidades que incrementan la superficie de contacto con el coloide. La Tg sintetizada por el tirocito es transportada vectorialmente hacia el borde apical. A lo largo de esta vía de transporte, la Tg se pliega y dimeriza, y es glucosilada, fosforilada y sulfatada. Además entre estas modificaciones postraduccionales, la molécula de Tg es

yodada por la acción de la peroxidasa tiroidea (TPO) que se localiza en el borde apical del tirocito. (Capen, 1996; McNabb, 1992).

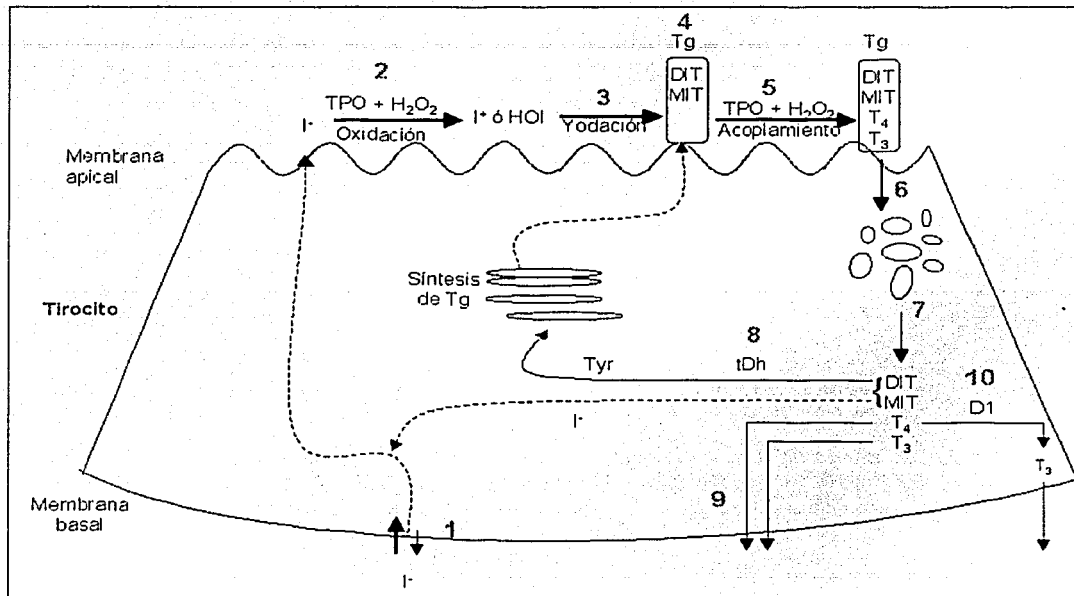


Fig. 4. Biosíntesis de las TH. 1) Captación o transporte activo del yodo al interior del tirocito. 2) Por acción de las peroxidases el ión yoduro (I^-) es convertido en "yodino" (I^*) o ácido hipoyodoso (HIO), una forma reactiva capaz de unirse o "yodar" a los residuos de tirosina presentes en la tiroglobulina (Tg). 3) La tiroperoxidasa (TPO) cataliza la yodación de la Tg en la membrana apical y se forman las yodotirosinas: monoyodotirosina (MIT) y diyodotirosina (DIT). 4) MIT y DIT permanecen unidas a Tg en el coloide constituyendo un reservorio de precursores de las TH. 5) Se forman las yodotironinas mediante el acoplamiento de dos residuos yodotirosilo (MIT o DIT). En esta reacción de acoplamiento participa el peróxido de hidrógeno y la TPO y depende de la estructura terciaria de la Tg. 6) En respuesta a la demanda de TH el coloide es endocitado y las vesículas endocitadas se fusionan con lisosomas. 7) Se liberan de la Tg por proteólisis específica. 8) Las yodotirosinas son desyodadas por la enzima deshalogenasa tiroidea (tDh) la cual favorece el reciclaje del yodo. 9) Las TH al llegar a la membrana basal se liberan aparentemente por difusión. 10) Parte de la T_4 puede ser desyodada hacia T_3 por acción de la desyodasa tipo 1 (D1) tiroidea para consumo local del tirocito (Modificada de Taurog, 1996).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

III. BIOSÍNTESIS DE LAS HORMONAS TIROIDEAS.

El metabolismo del yodo que conduce a la biosíntesis de las TH (Fig. 4) ocurre en tres etapas secuenciales: el transporte activo del yoduro al interior de los tirocitos (bomba de yodo), la oxidación del yoduro (tiroperoxidasa ó TPO) y la yodación de los residuos tirosilo de la molécula de tiroglobulina. Esta yodación resulta en la síntesis de los yodoaminoácidos: monoyodotirosina o MIT y diyodotirosina o DIT. El acoplamiento de estos yodoaminoácidos, con la participación de la TPO, da origen a la T4 y a la T3, yodotironinas hormonalmente activas. La liberación de estas hormonas entraña dos reacciones adicionales: la hidrólisis de la tiroglobulina, en los lisosomas, por proteasas tiroideas que al romper a la proteína liberan, por un lado, a las yodotironinas que son secretadas al torrente sanguíneo, y por otro lado a las yodotirosinas que experimentan desyodación intratiroidea, rescatándose la mayor parte del yoduro libre resultante para su posterior reutilización (Taurog, 1996).

IV. CONTROL DE LA FUNCIÓN TIROIDEA.

La principal vía de regulación de la función tiroidea se da a través de una cascada de señales neuroendocrinas llamada "eje hipotálamo-hipófisis-tiroides" (Fig. 5). Esta vía se inicia a nivel del hipotálamo con la liberación de dos hormonas, una estimuladora, la hormona liberadora de tirotropina (TRH), y una inhibidora, la somatostatina (SRIH), las cuales se transportan a través del sistema porta hipofisiario hacia la hipófisis anterior. En este sitio ejercen su acción sobre los tirotropos para estimular (TRH) o bien, para inhibir (SRIH) la síntesis y secreción de la hormona estimulante de la tiroides (TSH). La TSH estimula en la glándula tiroides tanto la producción como la liberación de las TH. Finalmente, a nivel de los órganos periféricos, la desyodación órgano-específica de las yodotironinas determina la concentración intracelular de la hormona activa e inactiva.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

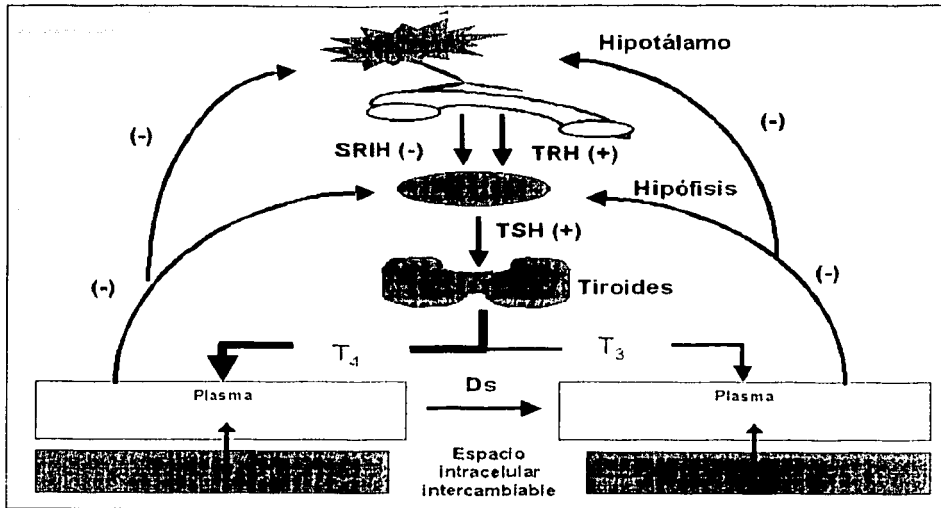


Fig. 5. Control de la función tiroidea. Se muestran con (+) las vías de estimulación, y con (-) las vías de retroalimentación negativa. TRH: Hormona liberadora de tirotrópica; SRIH: Somatostatina; TSH: hormona estimulante de tiroides o tirotrópica; T₄: tiroxina; T₃: triyodotironina; Ds: desyodadas.

En el control de esta vía intervienen diferentes señales neurohumorales que llevan información tanto de las condiciones del medio ambiente como del estado fisiológico del organismo. De estas, las principales son la disponibilidad del yodo, los cambios en el flujo sanguíneo, efectos directos del sistema nervioso simpático y parasimpático, así como el efecto de otras hormonas. Estas señales actúan a través de mecanismos de retroalimentación. El mecanismo de retroalimentación más importante es de tipo negativo, y está dado por los niveles circulantes y la concentración intracelular de T₃ y T₄ (Mc Nabb, 1992).

V. TRANSPORTE DE LAS HORMONAS TIROIDEAS.

Las TH son moléculas altamente hidrofóbicas, por lo que circulan en la sangre unidas a proteínas transportadoras. Se conocen tres diferentes proteínas capaces de unir y transportar a las yodotironinas: la globulina transportadora de tiroxina o TBG, la

transtiretina o TTR y la albúmina (Alb). Estas proteínas presentan diferente afinidad por las distintas yodotironinas. La TBG presenta la mayor afinidad a T4, uniéndose alrededor del 70 al 75% de esta hormona y se encuentra únicamente en los mamíferos. La TTR muestra una mediana afinidad y alta capacidad a T4 (15 a 20%). Esta proteína se expresa en todos los vertebrados. Por último, la albúmina se une a T4 con alta capacidad, pero baja afinidad (5 a 10%). En general, la T4 tiene mayor constante de afinidad (K_i) por estas proteínas, que la T3 y la rT3. Así, en condiciones normales, la concentración de hormona libre es de 0.02%, y menor de 0.3% para T4 y T3, respectivamente. La unión a estas proteínas, permite la distribución de las TH a sus órganos blanco y su retención a nivel circulatorio previniendo su pérdida renal o fecal (Köhrle, 1999).

VI. MECANISMO DE ACCIÓN DE LAS HORMONAS TIROIDEAS.

Los efectos de las TH están mediados principalmente por su unión a receptores nucleares específicos. Estos receptores forman parte de la superfamilia de receptores nucleares a hormonas tiroideas (TR), hormonas esteroideas, vitamina D y ácido retinoico, entre otros. Estos TR se unen a secuencias específicas de DNA, conocidas como elementos responsivos a hormonas tiroideas (TRE), los cuales se localizan en la región promotora de los genes cuya expresión es regulada por TH. Estos TREs se componen de dos o más medios-sitios de unión a los receptores, a los cuales se unen los TR ya sea como homodímeros o heterodímeros. El modelo más aceptado para explicar el mecanismo de acción de la T3, incluye su unión ya sea a un homodímero formado por TR-TR o a un heterodímero formado por TR-RXR, siendo éste último el receptor a 9-cis ácido retinoico. Así, la T3, con una afinidad 10 veces mayor que la T4 ejerce su acción reprimiendo o promoviendo la expresión de diferentes genes (Muñoz y Bernal, 1997; Oppenheimer, 1999; Wu y Koenig, 2000).

Aún cuando el principal mecanismo de acción para la mayoría de los efectos de las TH está mediado a través de receptores a T3, modulando la transcripción de genes, las TH también ejercen efectos rápidos actuando a nivel de la membrana celular, o por modulación directa ligando-dependiente de funciones de enzimas y proteínas

citoplasmáticas. Estos mecanismos rápidos no están plenamente dilucidados (Köhrle, 1999).

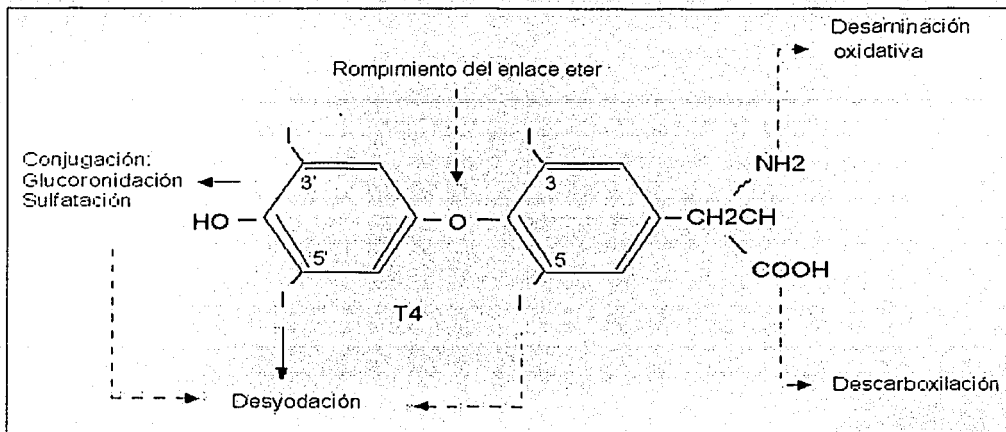


Fig. 6. Vías metabólicas de la Tiroxina. Todas las vías metabólicas señaladas con líneas discontinuas inactivan a la tiroxina. La desyodación en la posición 5' ó 3' constituye la única vía metabólica de activación.

VII. METABOLISMO DE LAS HORMONAS TIROIDEAS.

El metabolismo de las TH involucra una compleja serie de reacciones enzimáticas que resultan en su desyodación, conjugación y/o desaminación y en la descarboxilación oxidativa (Fig. 6). El grado en que estas reacciones ocurran en un órgano tendrá un efecto importante sobre los niveles circulantes y tisulares de las TH y sus metabolitos. Estas reacciones metabólicas no se excluyen mutuamente, más bien pueden ocurrir secuencialmente e incluso una aumentar la tasa de reacción de la otra (St. Germain y Galton, 1997). Las principales vías metabólicas de las hormonas tiroideas son la desyodación y la conjugación. La conjugación de las TH incluye la esterificación del grupo fenólico hidroxilo con ácido sulfúrico o con ácido glucurónico y funcionalmente incrementa la solubilidad de las TH en agua, facilitando de esta manera su eliminación biliar y urinaria (Visser, 1996). En términos de bioactividad, la más importante de estas vías es la desyodación. A continuación y debido a los intereses particulares de esta tesis, se describirá en detalle la vía de desyodación de las TH.

A. DESYODACIÓN.

La desyodación es el mecanismo predominante del metabolismo de las TH ya que de ella depende la activación o inactivación de las mismas. Consiste en la remoción de un átomo de yodo bien del anillo externo o fenilo (en la posición 5' ó su equivalente bioquímico 3') ó del anillo interno o tirosilo (en la posición 3 ó 5) de la molécula de yodotironina. De esta manera, la desyodación del anillo externo u ORD por sus siglas en inglés (outer-ring deiodination) de T4 resulta en la formación de T3, molécula hasta 20 veces más activa. Así, esta vía desyodativa representa un paso de activación clave en la acción de las TH. Por otro lado, la remoción de un átomo de yodo de T4 ó T3 en el anillo interno o IRD por sus siglas en inglés (inner-ring deiodination) resulta en la formación de yodotironinas inactivas (St. Germain y Galton, 1997). Numerosos estudios bioquímicos han identificado tres tipos de desyodasas que catalizan a estas dos vías metabólicas (activación e inactivación). Se conocen dos diferentes isoenzimas que catalizan la vía de activación (D1 y D2) y una enzima que cataliza la vía de inactivación (D3) (Fig.7). Estas enzimas muestran un distinto patrón de expresión durante el desarrollo, así como especie y órgano-específico. Además, estas enzimas están reguladas diferencialmente por factores fisiológicos, patofisiológicos y medio ambientales. Así, son estas tres desyodasas las responsables del aporte de hormona activa o inactiva a la célula blanco. Esto las convierte en el último eslabón de la regulación del eje hipotálamo-hipófisis-tiroides (Bianco *et al.*, 2002; Köhrle, 1996; Köhrle, 1999).

Hasta el momento ninguna de las tres desyodasas ha sido aislada o purificada, sin embargo, a la fecha se han clonado los cDNAs que codifican para las tres desyodasas en diferentes especies de vertebrados (Köhrle, 1999). A partir de estos datos se ha encontrado que las enzimas responsables de esta vía metabólica pertenecen a una familia de selenoproteínas altamente conservadas a lo largo de la filogenia en términos de estructura y función. Para los fines de este trabajo se revisan las características de las enzimas que catalizan la vía de activación (5' desyodación).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

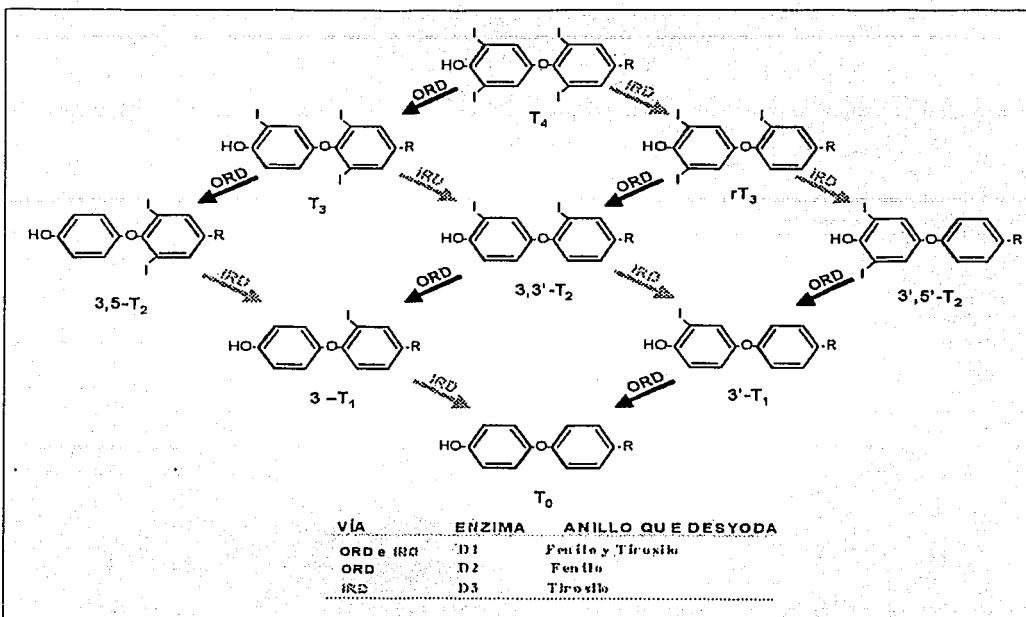


Fig. 7. Vías de desyodación de las hormonas tiroideas. Se muestra la desyodación secuencial de las TH a partir de T4. ORD, desyodación del anillo externo; IRD, desyodación del anillo interno

1. DESYODASA TIPO 1 (D1).

a. Localización. La D1 es la enzima más estudiada de las tres y se localiza predominantemente en el hígado, el riñón, la tiroides, glándula mamaria lactante y la hipófisis anterior (Aceves y Valverde, 1989; Bianco *et al.*, 2002; Köhrle, 1996; Köhrle, 1999). Esta enzima está compuesta por dos subunidades idénticas de aproximadamente 27,000 daltones y solo puede funcionar como dímero en un ambiente fosfolipídico. Su localización subcelular es semejante en la mayoría de los tejidos que la contienen. El monómero de D1 es una proteína integral de membrana tipo 1 con un único dominio transmembranal, y el extremo amino-terminal orientado hacia la luz del retículo endoplásmico. Sin embargo, aunque aun es un aspecto debatido, la localización subcelular de la D1 madura pareciera ser la membrana plasmática, con el sitio activo orientado hacia el citosol. Esto confirmaría los datos reportados en riñón y

tiroides acerca de la localización membranal de esta enzima (Murayama *et al.*, 1985). Además, esta localización está de acuerdo con la función propuesta para la D1 de proveer T3 circulante, ya que ofrece un acceso rápido a la T4 circulante, a la vez que facilita la exportación de la T3 producida hacia la circulación (Bianco *et al.*, 2002; Köhrle, 1996; Köhrle, 1999).

b. Función. Se piensa que la función de la D1 es la de proveer T3 al compartimiento vascular, ya que se sabe que en humanos sanos más del 70% de la T3 circulante proviene de la desyodación extratiroidea, principalmente del hígado, órgano que en mamíferos únicamente expresa D1 (Köhrle, 1996; Köhrle, 1999).

c. Características cinéticas. La D1 es una enzima relativamente abundante en tejidos como el hígado, el riñón y la tiroides, a juzgar por los valores de V_{max} en dichos órganos (2 a 5 pmol/mg/h). Aún cuando el sustrato de la D1 *in vivo* es la T4, su sustrato preferencial *in vitro* es: $rT3 > T4 > 3',5'-T2 > 3,3'-T2$ con valores de K_m aproximados en el rango μ molar. A diferencia de las otras desyodasas, la D1 es capaz de desyodar tanto el anillo externo como el interno de la molécula de T4, y así formar tanto T3 como $rT3$. Se ha observado que la preferencia por desyodar uno u otro anillo depende del ambiente celular de hidrogeniones, siendo la desyodación del anillo interno favorecida en pH alcalino y facilitada por la sulfatación de las yodotironinas (Köhrle, 1999). El mecanismo catalítico de la D1 es de tipo ping-pong bisustrato, siendo la yodotironina el sustrato primario y el cofactor el secundario. Debido a este mecanismo de acción, la D1 tiene un requerimiento alto de sustrato y bajo de cofactor. Aún no se conoce el cofactor endógeno de estas enzimas, pero se ha observado que el ditiotreitól (DTT) es el cofactor más eficiente *in vitro*. El sitio catalítico de las desyodasas está conformado por el aminoácido modificado selenocisteína (SeCys). La mutagénesis dirigida de esta SeCys por una cisteína altera las características de la reacción de la enzima. Una de las características bioquímicas de la D1 es su susceptibilidad para ser inhibida por agentes como la tioglucosa aúrica y el propiltiuracilo (PTU). Esta característica no es compartida por la D2 y la D3, por lo que el uso de estos agentes permite distinguir experimentalmente a la D1 (Köhrle, 1996).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

d. Características moleculares. Con la clonación del cDNA que codifica para la D1 de rata se descubrió que ésta pertenecía al grupo de las selenoproteínas, ya que, como se mencionó anteriormente, contiene una SeCys en el sitio activo de la molécula. Esto le confiere características únicas al mRNA. Por una parte, la inserción del aminoácido SeCys está codificado por un triplete TGA que se encuentra en el marco abierto de lectura. Este codón es una señal de paro de la traducción en el resto de los mRNAs. Por otra parte, la recodificación de este triplete para la inserción de la SeCys se da a través de una secuencia específica que se encuentra en la región 3' no traducida del mRNA. Esta secuencia se conoce como SECIS o secuencia de inserción de SeCys, y forma una estructura secundaria plegada (tallo-horquilla) que interactúa con un RNA de transferencia específico (selenocisteil-tRNA^{Sec}) y con el ribosoma para su codificación (Berry y Larsen, 1991).

Además de la clonación del cDNA, Toyoda y colaboradores (1992) describieron al gen que codifica para la D1 (*Dio1*) en humano. Su análisis mostró la presencia de 2 TRE funcionales en la región promotora del mismo. Estos hallazgos confirmaron los estudios fisiológicos que a continuación se refieren, en donde se había sugerido que la regulación de la D1 por las TH era a nivel pretraduccional.

e. Regulación. La regulación de las desyodasas parece depender primordialmente de tres factores: el aporte y disponibilidad del sustrato; el balance energético del organismo y la participación de otros mensajeros neuroendocrinos.

De los tres factores, el más importante es el aporte y la disponibilidad de las mismas yodotironinas. Así, se ha observado que en estados patológicos donde se modifican los niveles circulantes de las TH, la actividad desyodativa se ve modificada diferencialmente dependiendo de la enzima que se estudie. En el caso concreto de la D1, estudios tanto *in vitro* como *in vivo* han mostrado que las TH tienen efectos regulatorios directos sobre su actividad. La T4, la T3 y la 3,5-T2 aumentan rápidamente la actividad D1 en el hígado, el riñón, la tiroides y la hipófisis, acelerando de esta forma el metabolismo de las TH (Köhrle, 1996). Además de los efectos sobre la actividad enzimática, los niveles altos de estas hormonas estimulan la transcripción del D1-

mRNA, es decir, el efecto de estas hormonas ocurre a través de mecanismos pretraduccionales que se justifican con la presencia de los TRE en el gen *Dio 1* descrito en humanos (Toyoda *et al.*, 1992).

El aporte energético también regula a la actividad desyodativa. Sin embargo, los efectos observados son secundarios a la disponibilidad del sustrato. Así, el ayuno se ha asociado con la disminución de la actividad D1 hepática debido a un decremento en los niveles circulantes de T3 y T4 (Fig. 8). También, estudios en ratas diabéticas sin tratar, en las cuales, a pesar de presentar niveles altos de glucosa en sangre, ésta no se utiliza, se ha observado una disminución tanto de los niveles sanguíneos de T3 como de la actividad D1 hepática. (O'Mara *et al.*, 1993).

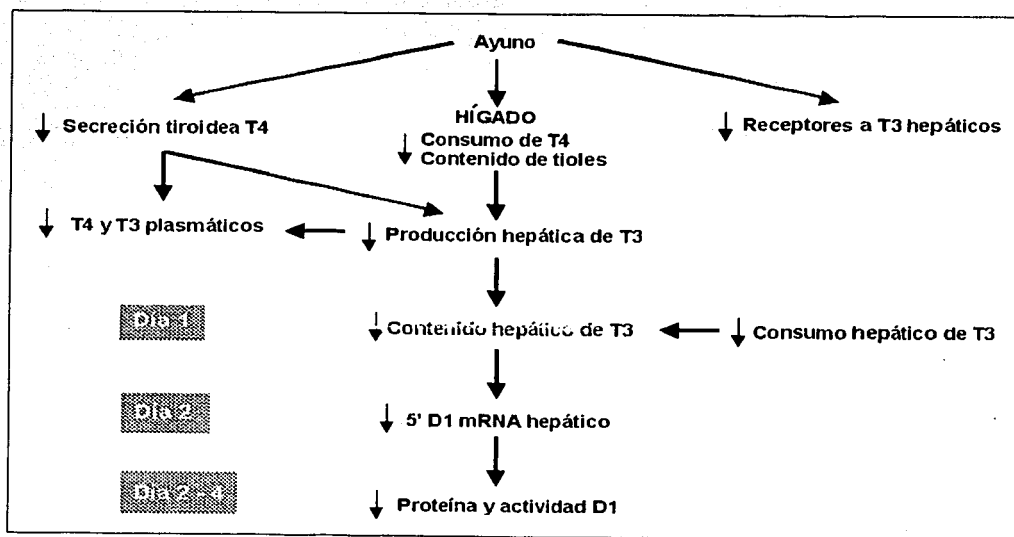


Fig. 8. Secuencia temporal postulada de las alteraciones de la economía tiroidea en hígado de ratas ayunadas (O'Mara *et al.*, 1993).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2. DESYODASA TIPO 2 (D2)

a. Localización. La actividad de esta enzima ha atraído considerablemente la atención posterior a su descripción en el cerebro e hipófisis de rata. La D2 tiene una distribución más limitada que la D1, la mayor actividad se ha reportado en el SNC, la hipófisis, el tejido graso pardo (BAT) y la placenta. Sin embargo, recientemente se ha descrito su localización en tejidos tiroideo, esquelético y cardíaco de humano. Recientemente se describió que la D2 es una selenoproteína integral de la membrana retículo-plasmática. Esta diferente distribución a comparación con la D1 explicaría el acceso celular rápido a la T3 generada a partir de la D2 (Bianco *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 1998; Köhrle, 1996; Köhrle, 1999).

b. Función. Estudios cinéticos utilizando radiomarcaje con doble isótopo han mostrado que la desyodación de T4 a través de la D2 en el SNC e hipófisis hipotiroidea genera T3 que es utilizada localmente por la misma célula. Esto sugiere que la función de la D2 es la de asegurar el aporte de T3 a la célula que la contenga. Esto explica su expresión en el SNC, específicamente durante los periodos críticos de desarrollo fetal en donde el aporte de T3 es indispensable para la neurogénesis y la mielinogénesis. Además, la D2 también juega un papel importante en la regulación de la termogénesis. En el caso del humano, el descubrimiento de la presencia del mRNA-D2 en los tejidos señalados, podría sugerir una importante contribución al reservorio plasmático de T3 (Kim *et al.*, 1998; Köhrle, 1996; Köhrle, 1999).

c. Características cinéticas. A diferencia de la D1, la D2 únicamente desyoda el anillo externo de la molécula de tetrayodotironina, generando a la T3, yodotironina que exhibe la mayor actividad biológica. La D2 también es capaz de desyodar el anillo externo de la T3 y formar a la 3,5-T2, yodotironina a la cual recientemente se le han descrito efectos tiromiméticos selectos. La Km de la D2 es muy baja (1-2 nM), lo que sugiere que presenta alta afinidad para la T4, su substrato preferencial tanto *in vivo* como *in vitro*. Sin embargo, la baja Vmax de la D2 (fmol/mg/h), sugiere que la expresión de la enzima

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

no es abundante. El mecanismo de acción de la D2 es del tipo secuencial y no es susceptible de ser inhibida por PTU ni tioglucosa áurica (Köhrle, 1996; Köhrle, 1999).

d. Características moleculares. Comparado con los mRNAs que codifican tanto para la D1 como para la D3, el mRNA que codifica para la D2 de mamíferos es el más grande (~8 kb). La clonación del cDNA que codifica para esta enzima en distintas especies de vertebrados ha demostrado que de las tres desyodasas, el mRNA de la D2 es el más conservado (68% de identidad molecular). Además, al igual que las otras desyodasas, la D2 también contiene el codón falso de paro TGA en el marco abierto de lectura, que codifica para la inserción de la SeCys, así como la secuencia SECIS en la región 3' no traducida (St. Germain y Galton, 1997).

Recientemente se clonó la región promotora del gen que codifica para la D2 (*Dio2*). Esta región contiene un sitio responsivo a cAMP (CRE) que está conservado en los genes de rata, de ratón y de humano. Además, este gen tiene varios sitios de unión al factor de transcripción de tiroides 1 (TTF-1), proteínas que regulan la transcripción de genes tiroideos específicos (Gereben *et al.*, 2001). La presencia del sitio CRE en el promotor de la D2 explica los efectos estimulatorios del cAMP observados en BAT y células gliales (ver sección de regulación).

e. Regulación. La D2, al igual que la D1, es regulada por las TH, pero sus efectos son opuestos a los descritos para la D1. En el hipotiroidismo se observa un marcado incremento de la actividad D2 en el SNC, mientras que el hipertiroidismo disminuye su actividad. Se ha observado que las yodotironinas que tienen mayor efecto sobre la actividad de la D2 son la T4 y la rT3, mientras que la T3 tiene un efecto pobre sobre la actividad de esta enzima.

Los mecanismos de acción a través de los cuales actúan estas hormonas son complejos e involucran procesos tanto pre- como postraduccionales. Se han observado cambios rápidos en la actividad de la D2 en respuesta a las yodotironinas que incluyen en principio una regulación postraduccional. Esta regulación puede involucrar modificaciones en la estructura y estabilidad de la enzima, en su vida media,

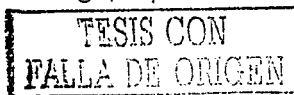
alteraciones en su transporte intracelular y/o aumento de su degradación. Sin embargo, en algunos tejidos como la hipófisis anterior de rata hipotiroidea, los niveles de mRNA-D2 se triplican, mientras que en el hipertiroidismo disminuyen un 30%. (Köhrle, 1996; Leonard *et al.*, 1984; St. Germain y Galton, 1997), lo cual sugiere mecanismos de regulación pretraduccionales. Experimentalmente también se ha descrito una disminución de mRNA-D2 posterior a los efectos sobre la actividad enzimática, principalmente debidos a la administración de T3, lo cual también denota mecanismos de regulación pretraduccionales (Kim *et al.*, 1998; Burmeister *et al.*, 1997; Yasuhiro *et al.*, 1999).

Además del efecto regulatorio de las yodotironinas, la actividad y el mRNA de la D2 aumentan significativamente por la acción de agentes que incrementan la producción de cAMP en BAT, en células gliales en cultivo y en músculo esquelético; por corticoesteroides tales como la dexametasona, y también por varios factores de crecimiento. Otros factores que incrementan la actividad de D2 son el cGMP y las hormonas que incrementan los niveles intracelulares de éste, como son el péptido auricular natriurético y el péptido natriurético tipo C (Köhrle, 1999).

Se ha descrito cierta ritmicidad circádica en la actividad y mRNA D2 de la glándula pineal y suprarrenal a expensas de un incremento nocturno en ambos parámetros, el cual es abolido por la presencia constante de luz y mantenido en condiciones de obscuridad constante. Este incremento se ha sugerido que es debido a mecanismos endógenos β -adrenérgicos propios de este tipo de tejidos (Murakami *et al.*, 1988; Tanaka *et al.*, 1987).

VIII. HORMONAS TIROIDEAS Y PECES.

Como ya se mencionó, en el caso particular de los teleósteos, el tejido tiroideo se encuentra como folículos dispersos o como grupos de folículos en la región faríngea (Gorbman *et al.*, 1983). De todos los vertebrados estudiados hasta la fecha, los peces presentan los niveles circulantes más bajos de T4 y más altos de T3, que resultan en una proporción T3/T4 alta. Sin embargo, a pesar de esta relación, no existe evidencia



de secreción de T3 por la glándula tiroidea de los teleósteos en condiciones normales (Orozco *et al.*, 1997; Morin *et al.*, 1993).

Las TH participan en diferentes aspectos de la fisiología tiroidea teleóstea como son la maduración sexual, la osmorregulación y la conducta migratoria. En especies migratorias, las TH están relacionadas con la esmoltificación, una serie compleja de cambios bioquímicos, morfológicos y de conducta, los cuales preadaptan al individuo para la fase marina de su ciclo de vida. Así, se ha descrito que las yodotironinas parecen facilitar la adaptación del pez al medioambiente marino, y en especies migratorias favorecen la preferencia por este medio, influyendo así en la conducta migratoria (Norris, 1985).

A. DESYODASAS EN TELEÓSTEOS.

La presencia de actividad desyodativa en los peces se describió desde hace dos décadas (Leatherland *et al.*, 1981). Al igual que en mamíferos, el hígado ha sido el órgano más estudiado, sin embargo, la información referente a las características bioquímicas de las desyodasas teleósteas ha sido confusa. Hasta 1992 únicamente se había descrito y caracterizado la actividad 5' total en el hígado de los salmónidos (Shields y Eales, 1986; Eales y Finnsen, 1991). Posteriormente, el mismo grupo de investigadores reportó la presencia de la actividad D1 y D2 en el hígado de estos peces (MacLachy y Eales, 1992). Sin embargo, las características bioquímicas de estos tipos enzimáticos no coincidían con las reportadas para especies mamíferas.

Estudios posteriores en el hígado de la tilapia (Mol *et al.*, 1993) apoyaron la noción de que el hígado de esta especie expresaba una enzima con características cinéticas muy parecidas a la D2 de mamíferos. Estudios en nuestro laboratorio mostraron que el hígado de la trucha (Orozco *et al.*, 1997) y del *F. heteroclitus* (Orozco *et al.*, 2000) co-expresan a las dos enzimas que catalizan la vía ORD. Estas enzimas son semejantes a las descritas en mamíferos, con algunas características propias las cuales seguramente son de importancia fisiológica: la D1 presenta una Km y una Vmax menores a la de su contraparte mamífera y es relativamente insensible a la inhibición

por PTU. En contraste la V_{max} y la tasa V_{max}/K_m de la D2, son 6 y 20 veces mayores que la reportada en el cerebro de rata, sugiriendo que la D2 presente en el hígado de pez es una enzima muy abundante y/o muy eficiente. Así, la co-expresión abundante de estas dos enzimas en el hígado de teleósteos, aunado al tamaño y localización del este órgano permite contar con un modelo ideal para estudiar la regulación de esta vía metabólica.

1. REGULACIÓN.

Los estudios encaminados a conocer los factores que participan en esta regulación en peces son escasos y han comprendido el análisis de la actividad desyodativa hepática total. Al igual que en los mamíferos, aunque existen diferentes factores involucrados en la regulación de la vía desyodativa $5'$, la disponibilidad del sustrato es el principal regulador de esta actividad en teleósteos (Tabla 3).

Estudios en los que se ha analizado la actividad ORD-total durante la esmoltificación han mostrado una correlación entre esta actividad desyodativa y los niveles circulantes de TH. Los cambios observados son diferenciales en los distintos órganos estudiados. Esta correlación principalmente se da entre los niveles circulantes de T3 y la actividad ORD hepática (Morin *et al.*, 1993; Sweeting *et al.*, 1994).

El efecto de la T3 y la GH sobre la actividad ORD hepática total se ha analizado directamente en cultivos primarios de hepatocitos de trucha. Estos estudios han mostrado que mientras la GH no modifica la actividad desyodativa, esta es inhibida por la T3, confirmando hallazgos previos de ese grupo en donde muestran que la T3 inhibe a la ORD hepática total (Eales y Finnson, 1991; Sweeting y Eales 1992). Así, el suplemento en el alimento con T3 durante 2 semanas en truchas aumenta las concentraciones circulantes de esta hormona, pero disminuye la actividad ORD total en el hígado alrededor de un 25%. Este mismo suplemento administrado por 12 semanas inhibe completamente dicha actividad (Eales y Finnson, 1991).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TABLA 3. Regulación de las desyodasas en teleósteos.

Estado tiroideo	Tipo enzimático	Efecto	Especie estudiada
Hipertiroidismo	Actividad ORD hepática total.	Inhibición	Trucha arcoiris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)
	Actividad rT3 ORD hepática	Sin efecto	
	Actividad T4 ORD hepática	Inhibición	
	Actividad D1 renal	Sin efecto	Tilapia del Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>)
	Actividad D2 hepática	Inhibición	
Hipotiroidismo	Actividad D1 renal	Sin efecto	Tilapia del Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>)
		Estimulación	Tilapia (<i>Sarotherodon melanotheron</i>)
	mRNA y actividad D1 hepática	Estimulación	Tilapia (<i>Oreochromis niloticus</i> y <i>Sarotherodon melanotheron</i>)
	mRNA y actividad D2 hepática	Estimulación	

Datos originales tomados de: Eales y Finnsón, 1991; Finnsón y Eales, 1999; Mol *et al.*, 1999; Sweeting y Eales, 1992; Van der Geyten *et al.*, 2001.

Por otra parte, el efecto agudo (1, 2 ó 3 días) del suplemento de T3 y T4 fue estudiado también en la trucha (Sweeting y Eales, 1992). En todos los casos la administración de T3 incrementó los niveles circulantes de T3 y T4, y disminuyó significativamente la actividad ORD hepática total. Sin embargo, la ingesta de una dosis mayor de T4 durante 3 días no modificó a la ORD hepática total en estos organismos. Esto último sugiere una insensibilidad del sistema enzimático a T4.

Más recientemente, Finnsón y Eales (1999), estudiaron los efectos del hipertiroidismo, provocado por la administración de T3 y el alimento racionado en la actividad ORD del hígado de trucha arcoiris. Cabe mencionar que aún cuando hacen una diferencia entre las dos enzimas presentes en el hígado de la trucha, las denominan rT3-ORD (D1) y T4-ORD (D2) ya que no consideran que sean semejantes a las desyodasas mamíferas. Los autores observaron que el ayuno disminuye la actividad T4-ORD, provocando un efecto contrario en la actividad rT3-ORD. Para el caso de la administración de T3, observaron que este tratamiento provoca disminución de la

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

actividad T4-ORD, pero contrario a lo que se observa con este tratamiento en la D1 de mamífero, la actividad rT3 - ORD no se vio modificada.

En este mismo contexto, Mol y colaboradores (1999) estudiaron los efectos del hipertiroidismo y el hipotiroidismo sobre las actividades enzimáticas D1 y D2. Usaron dos modelos de hipertiroidismo: el primero consistió en la administración de T3 en el alimento y el segundo en la administración de FSH porcina (i.p.); esta última provoca un incremento sostenido de la concentración plasmática de T4. Para el modelo de hipotiroidismo utilizaron la administración de metimazol en el alimento. A diferencia de lo que se ha observado en mamíferos, no observaron cambios significativos en la actividad D1 renal en ninguno de los grupos. En contraste, la actividad D2 hepática se vió disminuida en los dos modelos de hipertiroidismo, observándose el efecto contrario, es decir, un incremento pronunciado, en la actividad D2 en el grupo de hipotiroidismo.

Van del Geyten y colaboradores (2001) estudiando los efectos regulatorios del hipotiroidismo crónico (90 días) inducido por metimazol en dos especies de tilapia (*Oreochromis niloticus* y *Sarotherodon melanotheron*) han encontrado una disminución tanto de la expresión como de la actividad de la D2 hepática en ambas especies. En contraste, los efectos sobre la regulación de la D1 han mostrado resultados controversiales. Mientras que la actividad D1 renal incrementó en *O. niloticus*, permaneciendo constante en *S. melanotheron*; tanto la expresión del mRNA como la actividad hepática D1 fueron fuertemente estimuladas por esta condición hipotiroidea. Esto resulta interesante en primer lugar debido a que esta enzima no había sido encontrada en el hígado de las tilapias estudiadas hasta el momento. Además, el efecto regulatorio del estado hipotiroideo en estas especies es contrario a lo reportado en otros vertebrados hasta la fecha.

Las especies de teleósteos que estudiamos son eurihalinas. Esto implica que pueden habitar tanto medios de agua dulce como marina y que tienen la capacidad funcional de encender y apagar mecanismos que les permitan mantener constante su medio interno. Se sabe que la regulación de estos mecanismos está dada principalmente a través de mensajeros endocrinos, entre los cuales se encuentran hormonas como la prolactina, el cortisol, la corticotropina, las catecolaminas, la GH y las

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TH. Estudios en nuestro laboratorio utilizando al reto osmótico han mostrado cambios en la actividad desyodativa de las enzimas hepáticas en respuesta a los cambios en la salinidad medioambiental.

Para el caso particular de la trucha, hemos estudiado el efecto de un reto hiperosmótico ligero (cambio de 0 a 14% de agua marina) sobre la actividad de D1 y D2, tanto en el hígado, como en el riñón y la branquia. Se estudiaron estos dos últimos órganos por ser osmorregulatorios. Los resultados mostraron una disminución sostenida, a corto plazo (8 horas) de la actividad tanto de la D1 renal como de la D2 hepática. En contraste, las actividades D1 del hígado y de branquia no mostraron cambios a lo largo de todo el estudio. A la par de los cambios en la actividad desyodativa, se observó un aumento en los niveles circulantes de T4, T3 y de cortisol. Estos resultados muestran que un cambio ligero en la salinidad es suficiente para provocar respuestas en el eje tiroideo. Los cambios en los niveles hormonales de las TH son similares a los observados en las especies migratorias. Estos resultados demuestran también un efecto órgano-específico diferencial de este reto sobre las actividades D1 y D2, posiblemente mediado por TH (Orozco *et al.*, 2002b).

En contraste con estos resultados, el reto opuesto (de 100% a 50% de salinidad) en el *F. heteroclitus* provocó un incremento en la actividad D2 a las 12 horas post-reto el cual se sostuvo hasta las 48 horas. Mientras que la D1 se incrementa desde los 30 min post-reto (Orozco *et al.*, 1998). Las respuestas observadas durante el reto hiposmótico también son órgano-específicas. Los cambios observados en la actividad desyodativa podrían explicarse por los cambios hormonales que se sabe bien ocurren y son necesarios para la adaptación al medioambiente. Como se mencionó, entre las hormonas que se modifican en respuesta a cambios medioambientales están las mismas TH.

El objetivo del presente trabajo consiste en analizar si las distintas TH, con actividad biológica, regulan la actividad de las enzimas que catalizan su vía de activación en los peces, así como determinar el nivel al cual ejercen esta posible regulación.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

JUSTIFICACIÓN.

Las enzimas que catalizan la vía ORD son reguladas de manera opuesta por las TH en los mamíferos. Los mecanismos a través de los cuales las TH ejercen esta regulación han sido estudiados ampliamente en estas especies. En el caso particular de la enzima D1, estos efectos regulatorios se dan a nivel pretraduccional y se explican por la presencia de dos sitios TRE en la región promotora del gen *Dio 1* de humano. Por otra parte, los mecanismos a través de los cuales las TH ejercen sus efectos sobre la D2 son tanto a nivel pre- como postranscripcional. Estos mecanismos aun no se han podido dilucidar debido a que no se ha demostrado la presencia de sitios TRE funcionales en el gen *Dio 2*.

Por otra parte, recientemente se ha descubierto que la 3,5-T2, un metabolito de las TH, tiene efectos biológicos selectos, por lo que ahora se incluye entre las yodotironinas activas. En el único trabajo en el que han estudiado el efecto de dicha hormona sobre la regulación de la D1 de mamíferos, se ha descrito que la 3,5-T2 aumenta la actividad de esta enzima de la misma manera que lo hace la T3, pero con una afinidad 10 veces menor.

Los recientes estudios en teleósteos en relación a la regulación de estas enzimas por las yodotironinas han mostrado resultados novedosos. Mientras que las TH regulan a la D2 de manera similar en teleósteos y en mamíferos, los resultados en relación a la regulación de la D1 por estas hormonas parecen ser muy distintos: 1) La D1 de teleósteos parece ser refractaria al hipertiroidismo, 2) El hipotiroidismo contrario a lo observado en mamíferos, aumenta la actividad D1 en teleósteos.

Por todo lo anterior y aunado al hecho de que el hígado del *F. heteroclitus* coexpresa tanto D1 como D2, resulta un excelente modelo para el estudio de la regulación de ambas desyodasas en un mismo órgano, y permite plantear la siguiente hipótesis de trabajo:

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

HIPÓTESIS.

Las distintas tironinas tendrán efectos regulatorios diferenciales sobre la actividad y la expresión de las dos enzimas que catalizan la vía de activación de las TH en el hígado del *F. heteroclitus*.

OBJETIVOS.

OBJETIVO GENERAL.

Analizar el efecto de las tironinas sobre la regulación de la D1 y D2 en el hígado del *F. heteroclitus*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

1. Estandarizar un PCR cuantitativo para medir la cantidad de mRNA expresado por los hepatocitos de *F. heteroclitus*.
2. Estudiar el efecto de la T4, T3 y 3,5-T2 sobre la D1 y D2 hepática, evaluando si el efecto observado es a nivel pre- o postraduccionaL.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

MATERIAL Y MÉTODOS.

I. Animales

Se utilizaron un total de 90 animales, *F. heteroclitus* (Anexo 1) adultos machos de 3 a 6 gr. de peso. Los organismos se colectaron en el río Matanzas en el estado de Florida, E.U.A. y posteriormente se mantuvieron en el laboratorio Whitney de la Universidad de Florida, en estanques con agua corriente de mar (Anexo 2), y se alimentaron con hojuelas para peces (Silver Cup, Nelson & Sons Inc.) complementado con alimento vivo (almeja, camarón, pescado). Los peces se mantuvieron en condiciones ambientales similares a las de su hábitat: temperatura entre 26 a 28°C y bajo ciclos de luz:oscuridad de 14:10 h. Después del tratamiento experimental, los animales se sacrificaron por decapitación y en todos los casos se disecó y extirpó el hígado (peso promedio de 100 ± 7 mg), congelándose inmediatamente en nitrógeno líquido y almacenándose a -70 °C hasta su posterior análisis. Los hígados utilizados ($n = 5$ por grupo) para la determinación de la actividad desyodativa se homogenizaron en amortiguador HEPES 10 mM (Sigma); sacarosa 0.25 M (Sigma); EDTA 1 mM (Sigma) a pH 7 en una proporción 1:10 peso/volumen y la determinación se llevó a cabo como se describe más adelante. Los hígados utilizados para la cuantificación del mRNA se reunieron en un "pool" ($n = 5$ por grupo) y el RNA se extrajo como se describe en la sección correspondiente.

II. Validación del método de administración de yodotironinas por inmersión.

Los peces que habitan en los océanos pierden continuamente agua por la piel, debido a que el medio externo tiene una mayor osmolaridad comparada con su milieu interno. Para confrontar el estrés osmótico al que están continuamente expuestos, estas especies de teleósteos beben continuamente agua. Tomando ventaja de esta situación fisiológica, los experimentos de la presente tesis se diseñaron para administrar oralmente las distintas tironinas adicionando éstas al agua. Estudios previos en los que se ha utilizado este método de administración (Omeljaniuk y Eales, 1985) han mostrado

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

que 0.1 μM de T3 en el agua aumenta las concentraciones circulantes de esta hormona en la trucha arcoiris alrededor de 10 veces a las 24 horas de inmersión.

Para corroborar que este método de administración de tironinas efectivamente provoca un hipertiroidismo a corto plazo, se trató a un grupo de *F. heteroclitus* con 0.1 μM de T4 y T3 de la siguiente manera: Se colocó a los peces en tres estanques: control (n = 8), tratamiento con T3 (n = 4) y tratamiento con T4 (n = 12) y se mantuvieron en ayuno a partir de ese momento. Los peces se sacrificaron a las 6, 12 y 24 horas post-tratamiento (PT) y se les extirpó el hígado para la posterior extracción y cuantificación de la concentración de T4 y T3, según el grupo de tratamiento.

A. Cuantificación de la concentración hepática de T4 y T3.

Se realizó la extracción de las hormonas tiroideas de cada uno de los hígados utilizando una modificación al método descrito por Pinna y col. (2002). En resumen consiste en lo siguiente: los hígados fueron homogenizados en una solución de metanol/amonio (99:1) en una proporción 1/10 (peso/vol). El homogenado obtenido se centrifugó a 3000 rpm por 10 minutos a 4°C y el sobrenadante fue desecado en un concentrador al vacío y posteriormente reconstituido en 200 μL de buffer Tris HCl (0.05M; pH 8.6). La determinación de la concentración de T4 y T3 se realizó por radioinmunoanálisis, utilizando las condiciones de ensayo previamente estandarizadas en nuestro laboratorio las cuales se muestran en la Tabla 4 (Orozco *et al.*, 1992). Los coeficientes de variación inter- e intra-ensayo fueron de 8.9 y 8.3%, y de 9.5 y 6.6% para T4 y T3, respectivamente. El porcentaje de recobro de hormonas tiroideas por este método fue de 70-90% para T3 y de 50-70% para T4.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla 4. Condiciones de ensayo para la cuantificación de T4 y T3 por el método de radioinmunoanálisis.

Condiciones RIA T4		
Incubación 4°C por 24 h	¹²⁵ I-T4 (NEN)	10 pg
	Concentración estándares T4 (Sigma)	0.25 a 8 ng/ml
	Anticuerpo T4 (Sigma)	Dilución 1:2500
	Acido 8-anilino-1-naftalensulfónico (Sigma)	10 mg / 10 ml
Separación TA 2 h	2° Anticuerpo anti-conejo (ICN)	Dilución 1:7
	EDTA (Sigma)	0.1 M
	Polietilenglicol (Sigma)	18% (peso/vol)
	Suero normal de conejo	5 µL/tubo
Condiciones RIA T3		
Incubación 4°C por 24 h	¹²⁵ I-T3 (NEN)	10 pg
	Concentración estándares T3 (Sigma)	7.8 a 500 pg/ 100µL
	Anticuerpo T3 (Sigma)	Dilución 1:200
	Acido 8-anilino-1-naftalensulfónico (Sigma)	40 mg / 10ml
Separación 4°C por 30 min.	Solución carbón / dextran 0.5% (Sigma)	1ml / tubo

Como se observa en la Tabla 5, el método de administración de tironinas por inmersión efectivamente provoca un incremento de éstas en el hígado del pez tratado. Así, la administración por inmersión de 0.1 µM de T4 provoca un incremento (1.6 veces) de la concentración hepática de esta hormona a partir de las 6 horas PT con respecto al grupo control ($p < 0.05$). Este elevación de la concentración de T4 se mantiene durante las 24h de tratamiento. Mientras que en el tratamiento con 0.1 µM de T3 se observa una elevación significativa de la concentración hepática de T3 a partir de las 12 horas de tratamiento ($p < 0.001$), aumentando esta concentración ~6 veces, con respecto al control, a las 24 horas de tratamiento.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Tabla 5. Concentración de T4 y T3 hepáticas en *F. heteroclitus* tratados por inmersión con 0.1 μM de esta hormona.

Grupo Experimental		Concentración T4 (nM)	Concentración T3 (nM)
Control	12h	2.86 \pm 0.05	8.43 \pm 0.98
	24h	2.6 \pm 0.2	4.29 \pm 0.31
Tratamientos	6 h	4.57 \pm 0.65 *	---
	12 h	4.62 \pm 0.65 *	11.9 \pm 0.59 **
	24 h	4.3 \pm 0.11	24.47 \pm 1.87 **

(*p < 0.05, **p < 0.001)

III. Cuantificación de la actividad desyodativa.

La actividad desyodativa se cuantificó mediante una modificación de la técnica de liberación de radioyodo (Leonard y Rosemberg, 1980). Esta técnica ha sido ampliamente validada por nuestro grupo de trabajo. Específicamente para el caso de las desyodasas de *F. heteroclitus*, las condiciones para su determinación han sido previamente establecidas en nuestro laboratorio (Orozco *et al.*, 2000) y se describirán brevemente a continuación: En todos los casos, la actividad enzimática en los homogenados fue medida por duplicado. La mezcla de reacción (volumen total de 100 μL) contiene homogenado de tejido a la concentración óptima de proteína ($\sim 100 \mu\text{g}$) y la mezcla de reactantes requeridos para la determinación de cada tipo enzimático: ^{125}I -T4 ó ^{125}I -rT3 (actividad específica 1200 y 1174 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ respectivamente, New England nuclear), más la concentración correspondiente de tironina no radiactiva (Henning Co.) y DTT (Calbiochem) como se indica en la Tabla 6. La mezcla se incuba a 37°C por una hora. La reacción se detiene por la adición de 50 μL de una solución que contiene suero normal bovino al 50% y 10 mM de PTU. Después de agregar 350 μL de ácido tricloroacético al 10%, la mezcla se centrifuga en frío (4°C) a 2500 rpm por 15 minutos. El ^{125}I liberado soluble en ácido es separado por cromatografía en columnas con una resina de intercambio catiónico (Dowex-50X2), eluído con 2 ml de ácido acético al 10% y cuantificado en un espectrómetro de emisiones gamma. Este valor permite calcular la

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

actividad específica de las enzimas que se expresa como fmoles o pmolas de yodo liberado/mg de proteína/hora (fmol ó pmol¹²⁵I/mg/h). La determinación de las proteínas de la muestra se realizó por el método de Bradford (Bradford, 1976). Esta técnica se basa en la correlación directamente proporcional de las diferentes concentraciones de proteína totales y el virre en el color del reactivo de azul de Coomassie G-250 en un medio ácido, que se lee en un espectrofotómetro a 595nm.

En los casos en los cuales se determinaron los valores aparentes de Km y Vmax, se realizaron cinéticas de sustrato utilizando un pool correspondiente de homogenizados de hígado. Las concentraciones de sustrato (T4) utilizadas fueron 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8 y 10 nM; el resto de las condiciones fueron según lo señalado en la tabla 6.

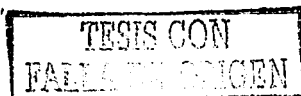
Tabla 6. Condiciones óptimas para cuantificar la actividad D1 y D2 en el hígado del *F. heteroclitus*.

	TIPO 1	TIPO 2
Sustrato	rT3	T4
Concentración de sustrato	100 nM	1 nM
Concentración de DTT	5 mM	25 mM
Tiempo de incubación	1 hr.	1 hr.
Temperatura de incubación	37 °C	37°C

III. Cuantificación de la cantidad de mRNA que codifica para la D1 y la D2.

Para poder cuantificar confiablemente la concentración de mRNA expresado en cada grupo experimental fue necesario diseñar y validar un método de PCR cuantitativo. Para estos fines, se siguió el siguiente protocolo:

- A. Diseño y construcción de competidores específicos para FhD1 y FhD2.
- B. Extracción del RNA



C. RT-PCRs de los hígados de *F. heteroclitus* experimentales utilizando oligonucleótidos anti-sentido específicos correspondientes a FhD1 y FhD2, respectivamente.

D. Realización del PCR competitivo para FhD1 y FhD2

A. Diseño y construcción de competidores específicos para FhD1 y FhD2.

Previamente en nuestro laboratorio se clonaron los cDNAs que codifican para la D1 y la D2 hepáticos de *F. heteroclitus* (Orozco *et al.*, 2002a; Orozco *et al.*, 2003; Valverde *et al.*, 1997; Villalobos, 2000). Estos dos cDNAs se insertaron en vectores que sirvieron para la construcción de los cDNAs competidores, como se muestra a continuación.

1. Inserción del sitio de restricción para la enzima Hind III.

El diseño de los competidores para la FhD1 y FhD2 se realizó de manera similar. A continuación se describirá con detalle la construcción de dichos competidores.

A partir de un vector que contiene el cDNA que codifica para la desyodasa correspondiente, se insertó un sitio único de restricción para la enzima Hind III. Para este fin, se diseñaron dos oligonucleótidos complementarios, uno en la dirección 5'-3' y el otro en dirección 3'-5', los cuales contenían la secuencia para el sitio de restricción de Hind III. Estos oligonucleótidos fueron utilizados junto con oligonucleótidos de los extremos 5' y 3' de cada desyodasa para amplificar por PCR dos fragmentos que contenían ahora el sitio de restricción para Hind III como se ilustra en la Fig. 9. Los dos productos de las amplificaciones anteriores se corrieron en un gel de agarosa y las bandas generadas se cortaron y purificaron. Utilizando técnicas de PCR, los DNAs purificados se hibridaron y amplificaron para obtener nuevos cDNAs modificados los cuales ahora incluían un sitio de restricción para Hind III. Estas nuevas construcciones se ligaron al vector pGEM-T y se transformaron en células habilitadas de *E. coli*.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2. Inserción del fragmento de 44 pb.

Después de purificar los plásmidos que contenían las construcciones con la secuencia modificada de las desyodasas, éstos se digirieron con la enzima de restricción Hind III. De otro plásmido conocido se cortó un fragmento de DNA de 44 pb con esta misma enzima de restricción el cual se ligó a las construcciones previamente digeridas. Una vez ligado el fragmento de 44 pb, los vectores se transformaron en células habilitadas de *E. coli*. Estas construcciones serán referidas en el texto como FhD1c y FhD2c.

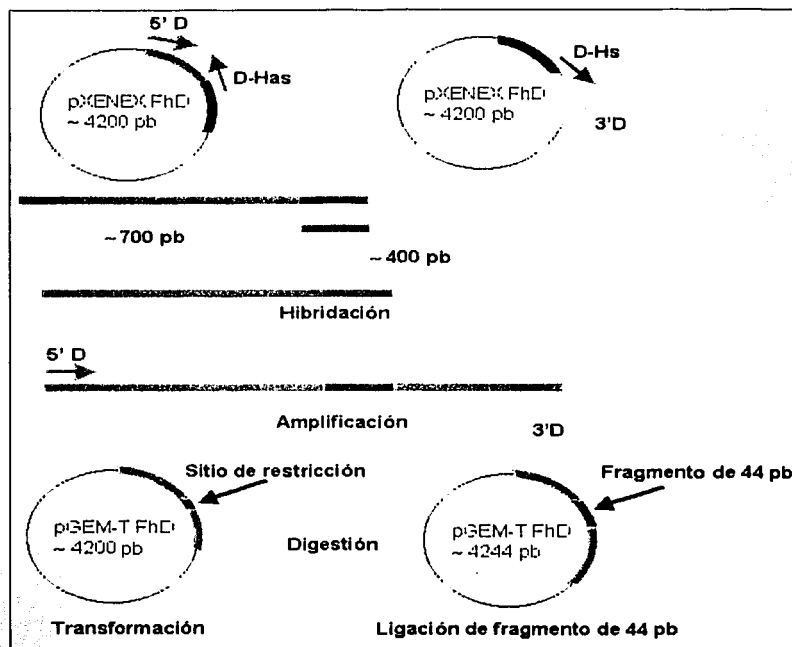


Fig. 9. Construcción de los plásmidos competidores de FhD1c y FhD2c. (FhD: cDNAs que codifican para las desyodasas; 5'D y 3'D: oligonucleótidos de los extremos 5' y 3', respectivamente, de las desyodasas; D-Has y D-Hs: oligonucleótidos antisentido y sentido, respectivamente, que contienen la secuencia para el sitio de restricción de la enzima Hind III)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Para corroborar la inserción exitosa del fragmento de 44 pb se realizaron amplificaciones por PCR utilizando oligonucleótidos específicos que nos permitían amplificar la zona de la inserción de dicho fragmento. La amplificación utilizando como templados los cDNAs de FhD1 y FhD2 nativos y oligonucleótidos específicos para cada desyodasa generó fragmentos de ~240 y ~270 pb, respectivamente. Cuando FhD1c y FhD2c se utilizaron como templados, los fragmentos generados con los mismos oligonucleótidos fueron de ~280 y ~310 pb, respectivamente (Fig. 10).

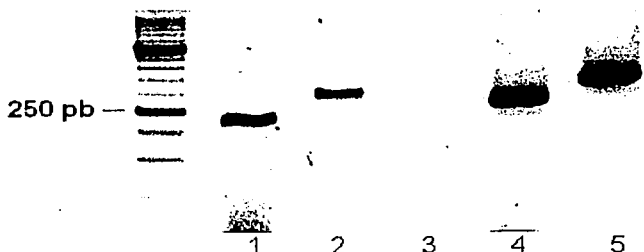


Fig. 10. Fragmentos amplificados por PCR utilizando como templados: 1) FhD1, 2) FhD1c, 3) control negativo, 4) FhD2 y 5) FhD2c.

3. Preparación de la curva estándar de los competidores FhD1c y FhD2c.

La determinación de la concentración de los competidores se realizó a través de la lectura de la absorbancia a una longitud de onda de 260 nm. A partir de las concentraciones obtenidas ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$), se calculó la concentración de los plásmidos en moléculas/ μL con la siguiente fórmula:

$$\text{Moléculas}/\mu\text{L} = (\text{concentración en g/L}) / \text{PM (no. Avogadro)} / 1 \times 10^6$$

En donde el peso molecular (PM) = (número de pares de bases) * (635 Da/pb)

Con base en las concentraciones calculadas, preparamos diluciones con las siguientes concentraciones en escala logarítmica:

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Concentración (moléculas/μL)	1×10^9	1×10^8	3×10^6	1×10^6	3×10^5	1×10^5	3×10^4	1×10^4
Logaritmo	9	8	6.5	6	5.5	5	4.5	4

Estas diluciones son las que se utilizaron como equivalente a una curva estándar para determinar las concentraciones de los mRNA de las desyodasas en los hígados de *F. heteroclitus* experimentales.

B. Extracción del RNA.

Como ya se mencionó, se preparó un pool de hígados de *F. heteroclitus* por grupo experimental y se extrajo el RNA utilizando el reactivo de TRIZOL (GibcoBRL). Este es un método modificado del original de Chomczynski y Sachi (1987) que contiene fenol e isotiocianato de guanidina, este último es un agente desnaturizante que permite la separación del RNA de los tejidos. La eficiencia de extracción de este método, particularmente para el hígado, es de 6 a 10 μ g/mg de tejido con una relación A260/A280 >1.8.

C. Obtención del cDNA FhD1 y FhD2 hepático.

Para la realización de los PCRs cuantitativos (ver siguiente sección) fue necesario obtener el cDNA de la D1 y D2 a partir de una misma concentración de RNA total (10 μ g), para todos los grupos experimentales. Para este fin, se utilizó la enzima transcriptasa reversa (Gibco, BRL) y para evitar la amplificación de fragmentos inespecíficos se utilizaron oligonucleótidos anti-sentido específicos complementarios a una región del extremo 3' de la secuencia de cada desyodasa de nuestro interés.

TESIS CON
FALLA DE INGEN

D. PCR cuantitativo para FhD1 y FhD2.

El PCR cuantitativo es una técnica que, como se ha mencionado con anterioridad, permite la cuantificación del número de moléculas de un mRNA determinado presente en una muestra problema. Para este propósito, se construye una curva estándar con concentraciones conocidas de un competidor (ver sección anterior) preparándose así una reacción de PCR para cada uno de los puntos de la curva estándar y conteniendo todas las reacciones una concentración constante del cDNA problema (RT). El PCR incluye un par de oligonucleótidos específicos con los que se amplifica una región tanto del competidor, como la región homóloga del cDNA problema.

Los productos de los PCR generados son resueltos por electroforesis en un gel de agarosa al 3% (Invitrogen) y analizados por densitometría (Electrophoresis Documentation and Análisis System, Kodak). Esto permite observar dos fragmentos, en este caso con una diferencia de tamaño de 44 pb. La co-amplificación con la misma intensidad de los dos productos en un punto dado de la curva estándar indica la concentración a la cual se encuentra la muestra problema. Para hacer una determinación más precisa de la concentración de las muestras problema se determina la intensidad relativa de los dos fragmentos obtenidos en todos los puntos de la curva y se calcula la concentración a partir de estos resultados.

Para corroborar la eficiencia de este método se realizaron PCRs cuantitativos control para la FhD1 y FhD2. Se utilizó como muestras problema cDNAs purificados a partir de plásmidos con las secuencias de cada una de las desyodasas, diluyéndolas a una concentración de 1×10^7 moléculas/ μL . Estas secuencias se combinaron en una serie de reacciones de PCR con los competidores correspondientes a concentraciones de entre 1×10^4 a 1×10^8 moléculas/ μL . En la Fig. 11 se muestran las electroforesis de las bandas generadas a partir de estas reacciones. La concentración del problema se determinó con base en el análisis densitométrico y de las bandas generadas. Como se muestra en la Tabla 7, las concentraciones estimadas con el método de PCR cuantitativo, para estas secuencias fueron de 1.07×10^7 y 1.27×10^7 moléculas/ μL para FhD1 y FhD2, respectivamente, concentraciones cercanas a la real. Además se realizó el análisis de regresión lineal de los datos de intensidad relativa de cada punto ($r^2 =$

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

0.994 y 0.993 para D1 y D2, respectivamente) así como de la reproducibilidad del método (coeficiente inter-ensayo = 13.4 para D1 y 12.5% para D2). Estos resultados demuestran que el método desarrollado en esta tesis es capaz de medir confiablemente las concentraciones de los mRNAs estudiados.

Los resultados de los PCRs cuantitativos experimentales se normalizaron de acuerdo a la cantidad total de RNA utilizado, así como por el factor de corrección de 1.07 y 1.27 para D1 y D2, respectivamente, valores que surgieron a partir de los experimentos de validación de PCR cuantitativo.

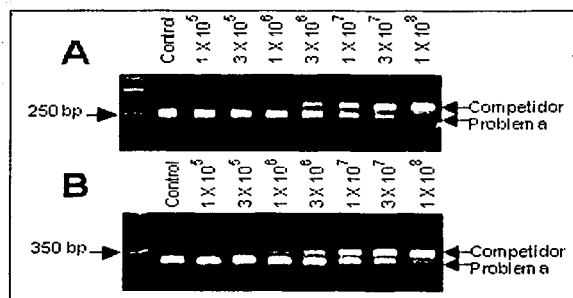


Fig. 11. PCR competitivo control para (A) FhD1 y (B) FhD2. En ambos caso cDNAs de las respectivas desyodasas, purificados a partir de un plásmido y en concentración 1×10^7 moléculas/ μ L se mezclaron con el competidor correspondiente en concentraciones crecientes entre 1×10^5 a 1×10^8 moléculas/ μ L y se amplificaron por PCR. La reacción de control no contiene competidor. A partir de las intensidades de las dos bandas identificadas por densitometría se generó una curva estándar. La extrapolación del punto en que las bandas tienen la misma intensidad es un estimado de la concentración del problema.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla 7. Concentración de los templados control obtenidos por PCR competitivo.

Línea		Control	1×10^5	3×10^5	1×10^6	3×10^6	1×10^7	3×10^7	1×10^8
FhD1	Bandas	Intensidad relativa							
	Competidor				0.0852	0.2749	0.5052	0.6777	1
	Problema	1	1	1	0.9148	0.7251	0.4948	0.3223	
	Concentración estimada	10,677,916 moléculas / μL							
FhD2	Competidor					0.1033	0.2943	0.5057	1
	Problema	1	1	1	0.8967	0.7057	0.4943	0.3691	
	Concentración estimada	12,619,317 moléculas / μL							

Resultados del análisis densitométrico de las bandas generadas por PCR cuantitativo control para FhD1 y FhD2 (Fig. 11), expresado como intensidad relativa; y concentración estimada para las muestras, calculada en base al análisis densitométrico.

V. DISEÑO EXPERIMENTAL

A. Tratamiento por inmersión con T4, T3 ó 3,5-T2.

Se prepararon 4 estanques con 5 L de agua marina cada uno. Posteriormente, el agua de tres de los cuatro estanques fue suplementada con $0.1 \mu\text{M}$ de T4, T3 ó 3,5-T2, respectivamente. El estanque sin tratamiento sirvió como grupo control. En cada estanque se colocaron 20 peces los cuales se mantuvieron en ayuno a partir de ese momento y a lo largo del tratamiento. Un grupo de peces ($n=10$) de cada estanque fue sacrificado por decapitación a las 12 y 24 horas PT. Los hígados se procesaron como se describió previamente.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

RESULTADOS

I. Efecto de la T4 en la actividad enzimática y la expresión de los mRNAs FhD1 y FhD2 hepáticos .

Como se observa en la Fig. 12, 0.1 μ M de T4 en el medio no modificó la actividad D1 hepática a ninguno de los dos tiempos de exposición. Sin embargo, esta misma dosis provocó una disminución significativa en la cantidad del FhD1-mRNA de 6 veces con respecto al control a las 24 h de exposición (Fig. 13). En contraste, la T4 disminuyó 2.3 veces ($p < 0.05$) la actividad D2 a las 24 h PT con respecto al grupo control. Esta disminución en actividad de la enzima se acompañó de un decremento en la cantidad del FhD2-mRNA de alrededor de 2 veces a las 12 y 24 h PT (Fig. 14 y 15).

II. Efecto de la T3 en la actividad enzimática y la expresión de los mRNAs FhD1 y FhD2 hepáticos .

Al igual que T4, la T3 no modificó la actividad D1 hepática a ninguno de los dos tiempos de exposición (Fig. 12). Sin embargo, la cantidad de FhD1-mRNA se vio modificada a partir de las 12 h de tratamiento, observándose una reducción significativa de este mensajero de 3 y 10 veces respectivamente, en los dos tiempos estudiados (Fig. 13). En contraste a lo anterior, esta tironina disminuyó 2.8 veces la actividad D2 en el hígado del *F. heteroclitus* ($p < 0.05$) a las 24 h de exposición, al igual que la cantidad de FhD2-mRNA tanto a las 12 (3 veces) como a las 24 h (8 veces) PT (Fig. 14 y 15).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

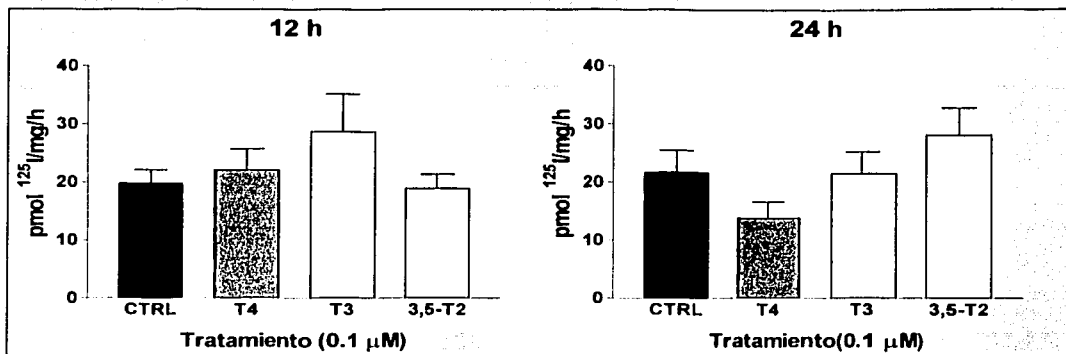


Fig. 12. Actividad Desyodativa D1 hepática de *F. heteroclitus* tratados con 0.1 μ M de T4, T3 ó 3,5-T2.

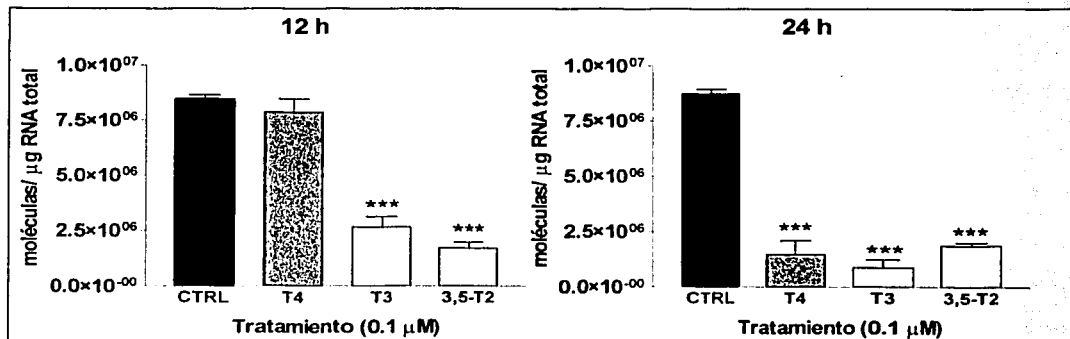


Fig. 13. Cantidad de FhD1-mRNA hepático en *F. heteroclitus* tratados con 0.1 μ M de T4, T3 ó 3,5-T2. ($p < 0.001$).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

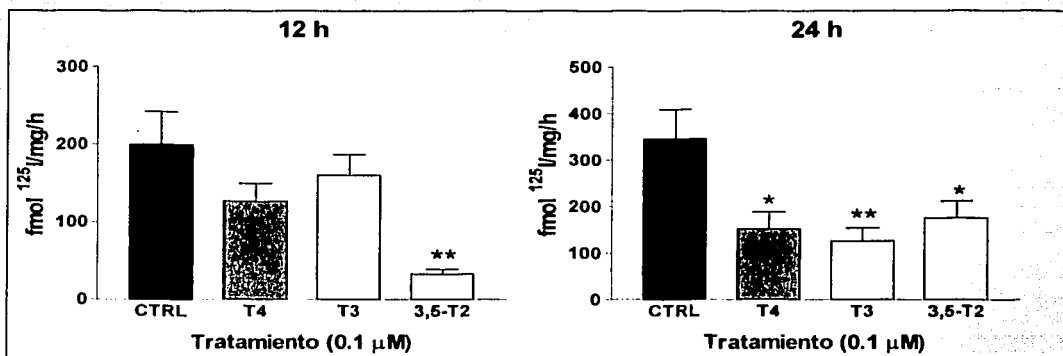


Fig. 14. Actividad Desyodativa D2 hepática de *F. heteroclitus* tratados con 0.1 μM de T4, T3 ó 3,5-T2. (**p<0.01, *p<0.05).

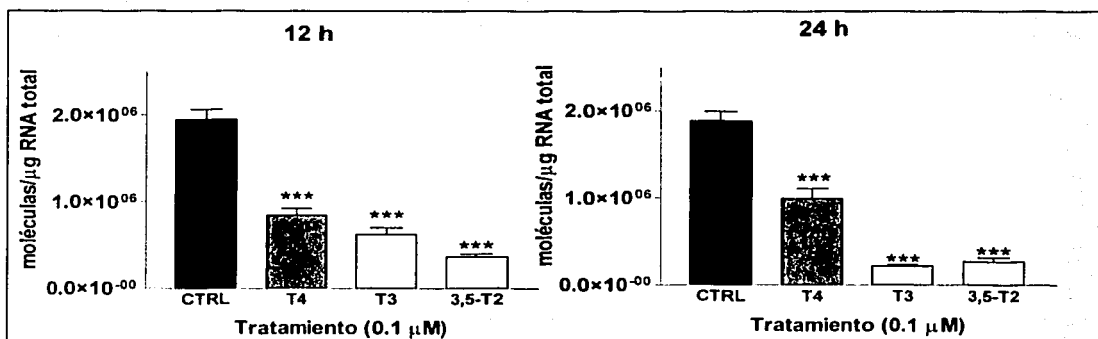


Fig. 15. Cantidad de FhD2-mRNA hepático en *F. heteroclitus* tratados con 0.1 μM de T4, T3 ó 3,5-T2. (p<0.001).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

III. Efecto de la 3,5-T2 en la actividad enzimática y la expresión de los mRNAs FhD1 y FhD2 hepáticos .

Como se muestra en la Fig. 12, y al igual que el resto de las tironinas, la 3,5-T2 no modificó la actividad D1 hepática del *F. heteroclitus*. Sin embargo, con la administración de esta tironina se observó una disminución significativa del FhD1-mRNA de 4.4 veces con respecto al control, en los dos tiempos estudiados (Fig 13). Por otra parte, la exposición a esta yodotironina provocó un decremento significativo ($p < 0.05$) de 6 veces en la actividad D2 a las 12 h PT, con respecto a su grupo control, que se mantuvo a las 24 h PT (Fig. 14). La cantidad de FhD2-mRNA también disminuyó significativamente a ambos tiempos de exposición mostrando un decremento de 6 y 7 veces a las 12 y 24 h, con respecto a sus grupos control, respectivamente (Fig. 15).

IV. Efecto de la administración de yodotironinas sobre la actividad desyodativa D2 hepática.

Los efectos de los distintos tratamientos observados sobre la actividad enzimática D2 pudieran atribuirse a lo siguiente: i) a un cambio en la afinidad de la misma por su sustrato; ii) a una modificación en la cantidad de enzima presente y/o iii) a cambios en su tasa de degradación. Con objeto de dilucidar los posibles mecanismos a través de los cuales ejercen las yodotironinas los efectos observados sobre la D2, se realizaron cinéticas de sustrato y se calcularon los valores de K_m y V_{max} aparentes en cada uno de los grupos experimentales. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 8 y en las graficas de la Figura 16. Como se puede observar, el tratamiento con tironinas no modificó significativamente los valores de K_m aparente en los distintos grupos experimentales, permaneciendo ésta en el mismo orden de magnitud. En contraste, los valores de V_{max} aparente disminuyeron paralelamente con la actividad desyodativa. Esta disminución fue significativa en los tratamientos con T3 y 3,5-T2 ($p < 0.05$ y $p < 0.01$, respectivamente) a las 12 horas de tratamiento, y en los tratamientos con T4 y T3 ($p < 0.05$ y $p < 0.01$, respectivamente) a las 24 horas PT.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

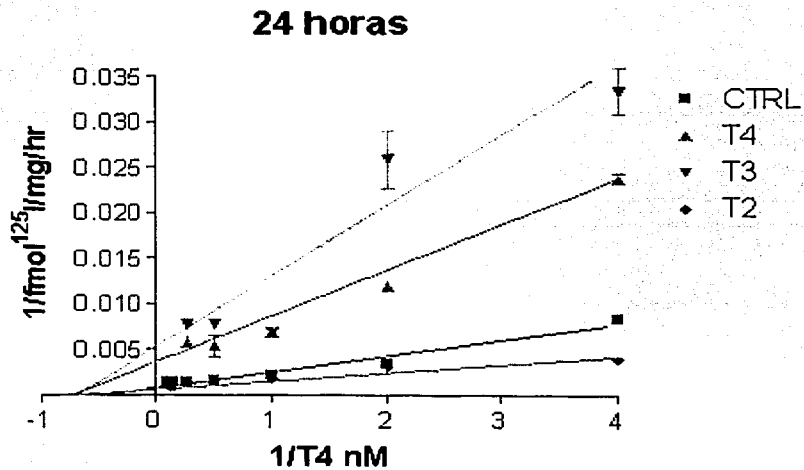
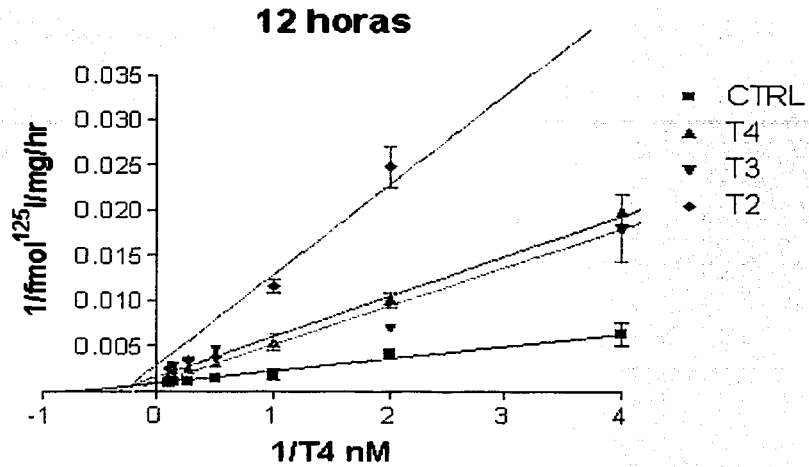


Fig. 16. Cinéticas sustrato de la enzima D2 hepática. Gráficas de doble recíproca para cada uno de los tiempos de tratamiento (12 y 24 horas).

Tabla 8. Velocidad máxima y constantes de Michaelis-Menten aparentes obtenidas para la enzima D2 en los distintos grupos experimentales.

Grupo experimental	Vmax (fmol ¹²⁵ I/mg/hr)		Km (nM)	
	12 h	24 h	12 h	24 h
Control	1340 ± 260	1340 ± 260	2.0 ± 0.37	2.4 ± 0.47
T4	660 ± 90	440 ± 85 *	2.8 ± 0.37	2.3 ± 0.44
T3	600 ± 70 *	245 ± 140 **	2.3 ± 0.28	2.3 ± 1.34
3,5-T2	160 ± 70 **	850 ± 110	2.8 ± 1.23	1.2 ± 0.16

(* p < 0.05; ** p < 0.01)

DISCUSIÓN.

I. Tratamiento por inmersión.

Aunque existe una gran variedad de métodos para inducir hipertiroidismo en animales experimentales, el tratamiento por inmersión es un método ideal en peces especialmente de agua salada, ya que permite aumentar los niveles hormonales provocando un estrés mínimo. Efectivamente, en el presente trabajo se mostró que la administración por inmersión de la tiroxina es capaz de elevar más de un 50% la concentración hepática de esta a partir de las 6 horas de inmersión y que este incremento se mantiene hasta las 24 horas PT.

Aún cuando en la presente tesis únicamente se midió la concentración de T3 y T4 hepática, otros investigadores han reportado la eficacia de este método para administrar otras hormonas hidrofóbicas (Eales, 1974; Etkin, 1935; Yamamoto *et al.*, 1966). Estudios en *F. heteroclitus* tratados por inmersión con dosis de T3 ó T4 similares a las utilizadas en el presente trabajo y durante 24 horas de exposición, mostraron que la captura tiroidea de ^{125}I presenta un comportamiento dosis-dependiente, siendo menor la captura del radioisótopo a mayor dosis de la TH (Brown y Stetson, 1985). En este mismo contexto, se ha observado que en animales previamente tratados por inmersión con yodotironinas, la captura de ^{125}I -T3 por los núcleos celulares hepáticos disminuye significativamente (Omeljaniuk y Eales 1985). Esto sugiere una saturación sistémica de yodotironinas. Otros estudios han descrito un incremento en los niveles circulantes de T3 a partir de las 8 horas de inmersión, alcanzándose la máxima concentración (~10 veces mayor al control) a las 24 horas con una dosis similar a la utilizada en este estudio. Cabe mencionar que estos estudios se realizaron utilizando a la trucha arcoiris, un teleosteo de agua dulce. Esto puede explicar las diferencias observadas en la presente tesis en la cual observamos un incremento máximo de la concentración hepática de T4 a las 6 hr PT. En efecto, se sabe que mientras que los teleosteos de agua de mar, por encontrarse en un medio de mayor osmolaridad que su medio interno, requieren beber agua continuamente para mantener el balance hidrosmótico; las

especies teleósteas de agua dulce, por encontrarse en la situación contraria no requieren del consumo de agua por vía oral ya que ésta difunde a través de la piel (Evans, 1993). Por esta razón, en estas especies la incorporación y saturación de las yodotironinas es más lenta ya que ocurre por este mecanismo de difusión.

II. Estandarización de los PCRs cuantitativos.

El uso de algunas modalidades de la técnica de RT-PCR ha ganado aceptación en últimas fechas como un método semi-cuantitativo. La mayoría de los casos descritos consisten en la coamplificación de genes de "Housekeeping" como estándares. Sin embargo, esta metodología resulta poco específica debido a diferencias de amplificación que existen entre las secuencias "estandar" y las experimentales. Las posibles causas de estas diferencias pueden ser originadas por: i) concentraciones iniciales distintas de los dos templados; ii) la diferente eficiencia de anidación de los oligonucleótidos para cada una de las secuencias; iii) diferencias en el tamaño del fragmento amplificado. El uso del RT-PCR en el campo de las desyodasas se ha limitado a técnicas semi-cuantitativas en las que se ha utilizado como estándar interno una proteína estructural como la ciclofilina (Kim *et al.*, 1998) y en el que la cuantificación se basa en la relación desyodasa/ciclofilina obtenida en los distintos tratamientos. Otro caso es el estudio simultáneo de la expresión del mRNA para dos desyodasas (D2 y D3) en un mismo RT-PCR (Stulp *et al.*, 1998) en el cual se calculó la relación D2/D3 en distintas etapas del desarrollo. Sin embargo, se trata nuevamente de un método de valoración de la cantidad de mRNA indirecto.

En la presente tesis se implementó una modalidad de RT-PCR en la cual se pretende minimizar las diferencias en la eficiencia de amplificación de los templados. Así, esta técnica consiste en la utilización de un competidor construido a partir de la misma secuencia de mRNA de la desyodasa de interés, el cual contiene un inserto de solo 44 pb, por lo que cubre el requisito de similitud en tamaño que permite la amplificación equiparable de ambos templados. Además, al utilizar este competidor en concentraciones crecientes de manera equivalente a una curva estándar, es posible determinar la concentración de las muestras problema. Se trata de un método analítico reproducible que permite la cuantificación del mRNA de ambas desyodasas en número

moléculas por μg de RNA total. Aunque esta técnica no es completamente cuantitativa, en este trabajo nos permitió cuantificar cambios de concentración del mRNA entre los diferentes grupos experimentales de una manera confiable. Además como una medida relativa, resulta ser más exacta que las técnicas de RT-PCR convencionales.

Así, hasta donde sabemos, este trabajo es el primero en el cual se diseña un PCR cuantitativo para medir la cantidad de mRNA que codifica para las desyodasas, tanto en peces como en el resto de los vertebrados.

III. Efectos de las yodotironinas sobre la regulación de la D1 hepática de *F. heteroclitus*.

Los efectos regulatorios de las hormonas tiroideas sobre las desyodasas son bien conocidos en los mamíferos, en donde se ha observado que estas yodotironinas tienen efectos opuestos sobre la regulación de las distintas desyodasas. Así, estados hipertiroideos producen un aumento en la actividad D1, mientras que esta enzima disminuye durante el hipotiroidismo. Los efectos observados sobre la actividad D1 se acompañan de modificaciones en la cantidad de su mRNA. Esto se ha explicado por la presencia de 2 sitios TRE en la región 5' promotora del gen *Dio1* en el humano. Aún cuando no se ha descrito la presencia de estos sitios de regulación genómica en otras especies de vertebrados, los estudios sobre la regulación de la D1 realizados en otras especies mamíferas sugieren también que ésta ocurre a nivel pretranscripcional (Köhrlé, 1996; O'Mara *et al.*, 1993; Toyoda *et al.*, 1992).

En contraste con lo anterior, los resultados de este trabajo muestran que el aumento en la concentración hepática de las distintas yodotironinas no modificó significativamente la actividad D1 hepática en el *F. heteroclitus*. Más aún, la concentración de FhD1-mRNA en los tres grupos experimentales disminuyó, lo que sugiere una regulación en sentido inverso a lo observado en especies mamíferas.

La actividad 5' desyodasa total hepática ha sido estudiada en peces desde hace dos décadas en las cuales se ha observado la íntima relación que existe entre esta

actividad tanto con los niveles circulantes de TH (Morin *et al.*, 1993; Sweeting *et al.*, 1994), como con las yodotironinas administradas exógenamente (Eales y Finnson, 1991; Sweeting y Eales, 1992). Sin embargo, estos estudios no son comparables con los del presente trabajo ya que en ellos únicamente se determinó la actividad desyodativa 5' total, sin diferenciar a las dos enzimas que catalizan dicha actividad. Estudios recientes de nuestro grupo de trabajo (Orozco *et al.*, 1997; Orozco *et al.*, 2000) demostraron que el hígado de ciertos peces coexpresa actividad enzimática D1 y D2. Así, los estudios posteriores encaminados al análisis de la regulación de la desyodación hepática en peces han revelado resultados novedosos.

En efecto, y en congruencia con los resultados de la presente tesis, Finnson y Eales en 1999 describieron que la actividad ORD de Km alta para rT3 en hígado de trucha –equiparable a la actividad D1 de mamífero– no presentaba cambios ante la administración de T3 en el alimento. Más aún, estos resultados eran similares a los obtenidos durante el ayuno, estado fisiológico en el que los niveles séricos de TH se aumenta y en el que la actividad D1 de mamífero presenta también modificaciones. Por otro lado, en estudios realizados en tilapia (*Oreochromis niloticus*), Mol y colaboradores (1999) también encontraron resultados en la actividad D1 comparables a los observados en este trabajo. Así, en estados tanto hipotiroideos, como en hipertiroideos inducidos ya sea por T4 o por T3, la actividad D1 renal no se modifica.

En contraste y a pesar de la falta de respuesta de la actividad D1 ante el tratamiento con TH, en la presente tesis se muestra que las tres yodotironinas utilizadas disminuyen la cantidad de FhD1-mRNA después de 24 horas de exposición. Estos resultados fueron sorprendentes debido a que son contrarios al patrón de regulación descrito en mamíferos. En este mismo contexto, estudios en otras especies de tilapia (*Oreochromis niloticus* y *Sarotherodon melanotheron*) mostraron que el hipotiroidismo prolongado incrementa tanto la actividad D1 como su mRNA en el hígado, ejerciendo el efecto contrario al descrito en mamíferos (Van der Geyten *et al.*, 2001). Estos resultados, al igual que los presentados en este trabajo apoyan la noción de la regulación diferencial que exhiben las yodotironinas sobre la D1 en teleósteos.

En mamíferos hipertiroideos el aumento tanto en la actividad D1 como de su mRNA se ha explicado como un mecanismo de inactivación de las TH ante el exceso de sustrato catalizado por la propia D1 al desyodar el anillo interno de las yodotironinas (Bianco *et al.*, 2002). Sin embargo, en relación a los peces, Sanders y col. (1997) han reportado que la desyodación del anillo interno de la T3 y T3 sulfatada por la D1 renal de tilapia es despreciable. Por lo tanto, una posible explicación a la falta de respuesta de la actividad D1 observada en el presente trabajo podría ser que al no ser desyodado el anillo interno de las TH por la D1 hepática, un exceso de sustrato resultaría en una respuesta de regulación negativa de la vía de activación de las TH por la D1. Este mismo mecanismo ha sido el propuesto para explicar la regulación negativa por sustrato de la D2. Por otra parte, se ha reportado que la enzima D1 tiene una vida media larga (> 12 h) (St Germain *et al.*, 1989), lo que podría explicar la discrepancia encontrada en este trabajo entre la disminución de la transcripción de la D1 y la estabilidad de dicha actividad ante un estado hipertiroideo agudo.

Por todo lo anterior, nuestros resultados se agregan a la lista de características operacionales y funcionales que son peculiares a la D1 de teleosteos. Así y con respecto a su contraparte mamífera, entre las características operacionales podemos mencionar: i) mayor afinidad por el sustrato (K_m baja) que seguramente están en íntima relación con los bajos niveles circulantes de T4 descritos en estas especies; ii) V_{max} baja, que indica una menor expresión de esta enzima. Esto pudiera estar compensado por la singular y alta expresión de la D2 en este mismo órgano. (Orozco *et al.*, 1997; Orozco *et al.*, 2000); iii) relativa insensibilidad a la inhibición por PTU, que se pudiera explicar por la presencia de algunos aminoácidos no conservados en el sitio activo de la enzima D1 (Orozco *et al.*, 2003; Sanders *et al.*, 1997). En cuanto a las características funcionales, y como ya se mencionó, la D1 no es regulada a la alta por las TH como en el resto de los vertebrados (presente tesis; Van der Geyten *et al.*, 2001). Esto aunado al hecho de que no hay evidencia de desyodación del anillo interno por esta enzima en peces (Sanders *et al.*, 1997) sugiere que la D1 podría haber surgido como una enzima que únicamente catalizaba la activación de las yodotironinas, y que posteriormente (a partir de los reptiles) adquirió la doble función de activación/inactivación de estos mensajeros.

IV. Efectos de las yodotironinas sobre la regulación de la D2 hepática de *F. heteroclitus*.

En contraste con la actividad D1, la actividad enzimática D2 mostró decrementos significativos ($p < 0.05$) secundarios a la administración de las tres yodotironinas estudiadas. Estos resultados concuerdan con lo observado en mamíferos, en donde el estado hipertiroides provoca una inhibición aguda de la actividad D2, atribuido a los niveles circulantes de T4, y en menor medida a los de T3 (Burmeister *et al.*, 1997; Köhrle, 1996; Leonard *et al.*, 1984; St. Germain y Galton, 1997).

En este contexto se ha descrito un efecto órgano y yodotironina-específico de estas hormonas sobre la regulación de la actividad D2, mostrándose una mayor respuesta a T4 en la corteza cerebral y el BAT en comparación con la hipófisis, mientras que la administración de T3 únicamente ejerce efecto sobre la actividad D2 hipofisiaria (Escobar-Morreale *et al.*, 1997). Contrario a esta regulación dependiente de la yodotironina utilizada, nuestros resultados muestran que los efectos de las tres yodotironinas sobre la actividad D2 fueron del mismo orden de magnitud a partir de las 24 horas. Sin embargo 3,5-T2 resultó más potente a las 12 h PT. En cuanto a la expresión del mensajero, las tres yodotironinas presentaron la misma potencia a las 12 horas, mientras que T3 y 3,5-T2 fueron más potentes en ejercer su efecto inhibitorio a las 24 horas PT.

A la fecha existen muy pocos estudios acerca de la regulación de la actividad D2 por las yodotironinas en teleósteos. Finsson y colaboradores (1999), reportaron una disminución de la actividad T4-ORD hepática (correspondiente a la actividad D2 de mamífero) tanto posterior a la administración de T3 en el alimento, como después del ayuno en la trucha arcoiris. Así mismo, Mol y colaboradores (1999) también encontraron que el hipertiroidismo secundario a elevación de los niveles séricos de T4 disminuye significativamente la actividad D2 hepática, mientras que el hipertiroidismo secundario a la administración de T3 la suprime. Aún cuando los estudios anteriores se realizaron bajo un protocolo de hipertiroidismo a mediano plazo (tratamientos por 7 y 11 días, respectivamente), estos resultados son congruentes con los reportados en la presente tesis. Así, en nuestro estudio se muestra que los efectos de las yodotironinas sobre la

actividad D2 hepática se pueden observar desde las 12 h PT, es decir, a muy corto plazo.

Se ha descrito que los efectos que ejercen las TH sobre la D2 en mamíferos son tanto a nivel pre- como postraduccional. Leonard y colaboradores (1984) describieron que la T3 ejerce efectos rápidos (4 h) inhibitorios sobre la actividad D2 de corteza cerebral de rata, los cuales no fueron inhibidos con cicloheximida, un inhibidor de la síntesis proteica. Esto sugiere efectos a nivel postraduccional. En este mismo contexto, Burmeister y colaboradores (1997) analizando la corteza cerebral de ratas previamente hipotiroideas reportaron un decremento del nivel de mRNA-D2 posterior a la administración crónica tanto de T3 como de T4. Sin embargo, los efectos agudos de dicho tratamiento provocaron efectos diferenciales según la yodotironina empleada: mientras que en ratas a las que se les administró T3 se observó un decremento tanto en la actividad enzimática D2 como en su mRNA, en las ratas tratadas con T4 únicamente se observaron efectos sobre la actividad. Estos datos sugieren que los efectos observados son tanto a nivel pre- como postraduccional.

En el presente estudio, los resultados obtenidos a partir del tratamiento con T3 y T4 sugieren efectos regulatorios sobre la D2 a nivel pretraduccional. Las evidencias experimentales que apoyarían esta hipótesis son: i) en ambos casos, la disminución de la actividad D2 hepática fue precedida por una disminución significativa en la cantidad del Fh D2-mRNA; ii) las concentraciones de FhD2-mRNA se mantuvieron inhibidas a lo largo del tratamiento; iii) los valores aparentes de V_{max} , que son un reflejo de la cantidad relativa de la enzima, disminuyeron en los grupos tratados con respecto a los grupos control mientras que la afinidad de la enzima por el sustrato (K_m) no se modificó. Sin embargo, no descartamos la posibilidad de que los efectos ejercidos por las yodotironinas estudiadas en este trabajo puedan deberse en parte a mecanismos postraducionales, ya que se ha descrito que la vía de degradación de D2 mediada por ubiquitina es estimulada por las TH en mamíferos (Gereben *et al.*, 2000; Steisapir *et al.*, 1998; Steisapir *et al.*, 2000). Por lo tanto, los resultados de la presente tesis sugieren que los efectos de la administración aguda de yodotironinas pudieran ser tanto a nivel pretraduccional, disminuyendo la transcripción del mRNA y/o disminuyendo su

estabilidad, como a nivel postraduccional, aumentando la tasa de degradación enzimática.

Otros estudios en especies de tilapia (*Oreochromis niloticus* y *Sarotherodon melanotheron*), en los cuales se ha estudiado la regulación de las desyodasas a nivel del mRNA han mostrado una mayor expresión tanto de la actividad D2 como de su mRNA durante estados hipotiroideos, y sugieren que este efecto ocurre a nivel pretraduccional (Van de Geyten *et al.*, 2001). Mas aún, se ha sugerido que el control de la regulación de la D2 en células tumorales de hipófisis de rata es a nivel pretraduccional al demostrarse que la supresión de mRNA-D2 inducida por T3, no afecta la vida media de dicho mensajero (Kim *et al.*, 1998). Es difícil explicar los mecanismos a través de los cuales ocurre la regulación pretraduccional de la D2 tanto en mamíferos como en teleosteos. Mientras que el gen *Dio1* claramente contiene sitios TRE en la región promotora, hasta la fecha no se han encontrado estos reguladores responsivos a TH ni en el gen *Dio2* mamífero ni en su contraparte en *F. heteroclitus* (Orozco *et al.*, 2002a) o en trucha arcoiris (Sambroni *et al.*, 2001). Más aún, se ha inferido la presencia de un sitio TRE negativo en la región 5' del gen *Dio2* humano, aunque hasta el momento no se demostrado que sea funcional (Bianco *et al.*, 2002). Por otro lado, mientras que el gen *Dio2* mamífero contiene un sitio responsivo a cAMP (sitio CRE), éste no se ha encontrado en los genes *Dio2* de teleosteos. Todo lo anterior sugiere que aún cuando el efecto final observado es el mismo, los mecanismos de regulación entre el gen *Dio2* mamífero y de teleosteo parecen ser distintos.

V. Efectos de 3-5-T2 sobre las enzimas que catalizan la vía ORD.

El aspecto más novedoso de nuestros resultados fue el potente efecto regulatorio que la 3,5-T2 ejerció sobre los mRNA D1 y D2 y la actividad D2. Hasta donde sabemos, se trata del primer estudio en el cual se evalúa el efecto de este mensajero sobre la actividad desyodativa de un teleosteo. Como se mencionó con anterioridad, la 3,5-T2 es un producto natural del metabolismo de las TH que se produce por la desyodación de T3 en el anillo externo. Hasta hace poco se pensaba que esta desyodación formaba

parte de la vía de inactivación de yodotironinas, ya que el metabolito generado a través de ella carecía de actividad biológica. Sin embargo, estudios recientes han mostrado que mientras la 3',5'-T₂ y la 3,3'-T₂, productos de la desyodación del anillo interno de la rT₃ y la T₃, respectivamente, no tienen efecto biológico conocido, la 3,5-T₂ ha resultado ser una yodotironina más con actividad biológica.

Los estudios acerca de los efectos de 3,5-T₂ se han enfocado principalmente a la mitocondria y el papel que juega esta yodotironina en el metabolismo energético tanto en mamíferos (Cimmino *et al.*, 1996; Lombardi *et al.*, 2000) como en teleosteos (Leary *et al.*, 1996; Varghese *et al.*, 2001; Varghese y Oommen, 1999). Así, los efectos que ejerce la 3,5-T₂ sobre la calorigénesis a través de mecanismos a nivel mitocondrial parecen tener relevancia fisiológica (Goglia *et al.*, 1999). En fechas recientes se ha demostrado la existencia de dos mecanismos de acción de las TH en el establecimiento del metabolismo basal en rata, un mecanismo genómico tardío resultado de la acción de T₃, y otro aparentemente no genómico rápido, ejercido por la 3,5-T₂ generada a través de la desyodación de T₃ (Moreno *et al.*, 2002). Además de los efectos bien establecidos sobre la calorigénesis, la 3,5-T₂ tiene otros efectos tiromiméticos que parecen estar relacionados con el tipo de regulación ejercido por las TH. Así, esta hormona parece tener una potencia similar a la de T₃ en aquellas funciones donde las TH ejercen un efecto regulatorio negativo, como son la inhibición de la secreción de TSH (Moreno *et al.*, 1998) y la expresión de los receptores TRβ₂ (Ball *et al.*, 1997). En contraste, en aquellos sistemas estimulados por las TH, la potencia de la 3,5-T₂ es hasta 100 veces menor que la de T₃. Tal es el caso de la estimulación de la síntesis del mRNA de GH (Moreno *et al.*, 1998), la actividad D1 (Baur *et al.*, 1997; Baur y Köhrle, 1999) y el incremento en el consumo de oxígeno en células hepáticas de ratas hipotiroideas (Horst *et al.*, 1989).

Así, y en consonancia con esta noción, los resultados muestran un claro y agudo efecto inhibitorio de la 3,5-T₂ tanto sobre la cantidad de FhD1-mRNA y FhD2-mRNA, como sobre la actividad D2. Estos efectos resultaron ser de la misma potencia que los ejercidos por T₃. Más aun, los resultados observados en relación a la actividad D2 preceden al efecto provocado por T₃ y T₄ sobre dicha actividad enzimática. Los efectos

ejercidos por la 3,5-T2 sobre la actividad de la enzima D2 son comparables a los reportados por Baur y colaboradores (1997) en la hipófisis de rata en estudios tanto *in vivo* como *in vitro*. Ellos encuentran una inhibición de la actividad D2 secundaria al tratamiento con 3,5-T2 similar a la presentada ante la administración de T3, mientras que la actividad D1 aumentó aunque en menor medida que con el tratamiento con T3. Es importante destacar que la dosis de 3,5-T2 utilizada por este grupo fue de 5 a 10 ordenes de magnitud mayor que la dosis utilizada de T3. En nuestros estudios la misma dosis de ambas yodotironinas ejerció efectos con una potencia similar en las dos enzimas estudiadas. Estos resultados también mostraron que el tratamiento con 3,5-T2 provoca un decremento importante en la expresión de los dos mensajeros que catalizan la vía de activación de las yodotironinas a los dos tiempos estudiados. Estos resultados son innovadores ya que hasta el momento no se han realizado estudios sobre la regulación del RNA mensajero por esta yodotironina en ninguna de las desyodasas.

El mecanismo de acción por el cual la 3,5-T2 actúa sobre la regulación de las desyodasas aún se desconoce. Una posibilidad es que esta yodotironina interactúe directamente con los receptores nucleares a TH. A nuestro saber, no existe información acerca de la afinidad de 3,5-T2 por los TR en peces. Sin embargo, y aún cuando escasa, la información en mamíferos muestra un índice bajo de la unión de 3,5-T2 a receptores nucleares de hígado y corazón, comparado con T3 (Leeson *et al.*, 1988); por otra parte, Cheng y colaboradores (1994) mostraron, en cultivos celulares, que la afinidad de la 3,5-T2 por la isoforma del receptor TR β 1 es muy similar a la afinidad reportada para T4. Más aún, Baur y colaboradores (1997) han mostrado la activación de proteínas que se unen a secuencias de DNA correspondientes al TRE funcional del promotor D1 humano, posterior al tratamiento con 3,5-T2.

Por otra parte, los efectos de la administración de 3,5-T2, principalmente en relación a la actividad D2, fueron tempranos en comparación con los efectos de T3 y T4. Aunque la latencia de respuesta no es un indicador absoluto del nivel de acción hormonal, puede considerarse una característica distintiva entre las acciones nucleares o extranucleares de las TH. En este contexto, la rapidez de la respuesta a la administración de 3,5-T2 pudiera sugerir una regulación de esta yodotironina a través

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

de efectos no genómicos. Es necesario realizar más estudios en relación a este punto para dilucidar los posibles mecanismos de regulación que la 3,5-T2 ejerce sobre las desyodasas de la vía de activación de las TH.

VI. Comentarios finales y reflexiones.

Como ya se mencionó, a nuestro conocimiento éste es el primer trabajo en el que se estudian los efectos de la 3,5-T2 sobre la actividad desyodativa en teleósteos. Los efectos que ejerce dicha yodotironina tanto sobre la actividad enzimática como sobre su mRNA son contundentes. Tomando en cuenta que entre las particularidades de la fisiología tiroidea en teleósteos se encuentran: i) una relación T3/T4 circulante muy alta (Morin *et al.*, 1993; Orozco *et al.*, 1997.); ii) la coexpresión en el hígado de las dos enzimas que catalizan la vía ORD de las desyodasas y iii) a partir de esta desyodación se obtiene normalmente la 3,5-T2, es probable esperar niveles circulantes de esta yodotironina tan altos como los niveles de T3 que se observan. Además, cabe la posibilidad de que esta yodotironina tenga efectos fisiológicos en estas especies. Esto se ve apoyado por los resultados obtenidos en el presente estudio, en los cuales la 3,5-T2 ejerció los efectos más agudos y significativos, en comparación con las otras dos yodotironinas, sobre la regulación de la D2.

TESIS CON
FALSA DE ORIGEN

CONCLUSIONES.

- El método de administración de yodotironinas utilizado en la presente tesis prueba ser un método no invasivo efectivo de administración en teleósteos.
- El método de PCR cuantitativo implementado para medir los cambios en la concentración de los mRNAs de la D1 y D2 es sensible, exacto, reproducible y lineal.
- Las tres yodotironinas estudiadas tuvieron efectos temporalmente diferentes sobre la D1 y D2; siendo 3,5-T2 la hormona que presentó los efectos más tempranos. Sin embargo, contrario a lo esperado, los efectos ejercidos sobre ambas enzimas fueron de tipo inhibitorio.
- En contraste con lo previamente reportado en mamíferos, y en consonancia con los datos existentes en peces, las TH no ejercen efectos significativos sobre la actividad D1; más aún, producen una disminución en la concentración del FhD1-mRNA.
- Las tres yodotironinas estudiadas disminuyeron significativamente tanto la actividad D2 como la cantidad de FhD2-mRNA, ejerciendo sus efectos en el siguiente orden: T2>T3>T4.
- En conjunto, los resultados presentados sugieren la generación de la hormona biológicamente activa 3,5-T2, a partir de la vía desyodativa de activación de las TH en teleósteos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

PERSPECTIVAS.

Los hallazgos de la presente tesis son innovadores y aportan conocimiento nuevo al campo de la fisiología tiroidea. Así, los resultados presentados aportan evidencia experimental que sugiere que la D1 de teleosteo es regulada de manera distinta por las yodotironinas. Sin embargo, el hallazgo más novedoso fue el demostrar que la 3,5-T2 es bioactiva y regula la vía enzimática que la genera. Así, de la presente tesis surge una nueva hipótesis de trabajo en la cual proponemos que la vía de activación de TH al menos en teleosteos no culmina con la formación de T3, siendo ésta otro precursor más de una hormona con mayor potencia biológica, la 3,5-T2.

En este contexto, algunos de los acercamientos para la confirmación de esta nueva hipótesis podrían ser:

- Identificar la presencia y cuantificar la concentración de la 3,5-T2 circulante en teleosteos.
- Realizar curvas dosis-respuesta para determinar los efectos específicos de la 3,5-T2 sobre la vía de activación de las TH en teleosteos.
- Determinar el posible mecanismo de acción de la 3,5-T2 sobre la regulación de la vía de activación de las TH en teleosteos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

REFERENCIAS.

- Aceves C y Valverde C. (1989). Type I 5'-monodeiodinase activity in the lactating mammary gland. *Endocrinology* **124**, 2818-2820
- Ball SG, Sokolov J y Chin WW. (1997). 3,5-Diiodothyronine (T2) has selective thromimetic effects *in vivo* and *in vitro*. *J Mol Endocrinol* **19**, 137-147.
- Baur A, Bauer K, Jarry H y Köhrle J. (1997). 3,5-Diiodo-L-thyronine stimulates type 1 5' deiodinase activity in rat anterior pituitaries *in vivo* and in reaggregate cultures and GH3 cells *in vitro*. *Endocrinology* **138**, 3242-3248.
- Baur A y Köhrle J. (1999). Type 1 deiodinase is stimulated by iodothyronines and involved in thyroid hormone metabolism in human somatomammotroph GX cells. *Eur J Endocrinol* **140**, 367-370.
- Berry MJ y Larsen PR. (1991). Type I iodotironine deiodinase is a selenocysteine enzyme. *Nature* **349**, 438-440.
- Bianco AC, Salvatore D, Gereben B, Berry MJ y Larsen PR. (2002). Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases. *Endocr Rev* **23**, 38-89.
- Bradford M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 249-254.
- Brown C y Stetson M. (1985). Photoperiod-dependent negative feedback effects of thyroid hormones in *Fundulus heteroclitus*. *Gen Comp Endocrinol* **58**, 186-191.
- Burmeister LA, Pachucki J y St. Germain D. (1997). Thyroid hormones inhibit type 2 iodothyronine deiodinase in the rat cerebral cortex by both pre- and posttranslational mechanisms. *Endocrinology* **138**, 5231-5237.

Casas F, Doommenijoud L, Rochard P, Hatier R, Rodier A, Daury L, Bianchi A, Kremarik-Bouillard P, Philippe B, Keller J, Shohn H, Wrutniak-Cabello C, Cabello G y Dauca M. (2000). A 45kDa protein related to PPAR γ 2, induced by peroxisome proliferators, is located in the mitochondrial matrix. *FEBS Lett.* **478**, 4-8.

Capen C. (1996). Anatomy, comparative anatomy and histology of the thyroid. En: Braverman L y Utiger R(Eds.). *Werner and Ingbar's The Thyroid. A fundamental and clinical text*. J.B.Lippincot Company. EUA. pp 22-28.

Cheng S, Ransom S, McPhie P, Kumar M, Mixson J y Weintraub B. (1994). Analysis of the binding of 3,3',5-triiodo-L-thyronine and its analogues to mutant human β 1 thyroid hormone receptors: a model of the hormone binding site. *Biochem* **33**, 4319-4326.

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

Cimmino M, Mion F, Goglia F, Minaire Y y Gélouin A. (1996). Demonstration of *in vivo* metabolic effects of 3,5-T2 diiodothyronine. *J Endocrinol* **149**, 327-333.

Davey KG. (2000). Do thyroid hormones function in insects? *Insect Biochem Mol Biol* **30**, 877-884.

Eales JG. (1974). Creation of chronic physiological elevations of plasma thyroxine in brook trout *Salvelinus fontinalis* (Mitchill) and other teleosts. *Gen Comp Endocrinol* **22**, 209-217.

Eales JG y Finnson KR. (1991). Response of hepatic thyroxine 5' deiodinase of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, to chronic ingestion of 3,5,3'-triiodo-L-thyronine. *J Exp Zool* **257**, 230-235.

Escobar H, Escobar F y Morreale G. (1999). La Glándula Tiroides. En: Tresguerres JAF (Eds). *Fisiología Humana*. 2ª ed. Mc Graw-Hill. Interamericana. Madrid. pp 967-969.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Escobar-Morreale H, Obregón J, Hernández A, Escobar F y Morreale G. (1997). Regulation of iodothyronine deiodinase activity as studied in thyroidectomized rats infused with thyroxine or triiodothyronine. *Endocrinology* **138**, 2559-2568.

Etkin W. (1935). The mechanism of anuran metamorphosis pattern. *J Exp Zool* **71**, 217-240.

Evans D. (1993). Osmotic and ionic regulation. En: Evans D (Eds). *The physiology of fishes*. Marine science series. EUA. pp 315-337.

Everts ME, Visser TJ, Moering EP, Tempelars AM, Van Toor H, Docter R, de Jong M, Krenning EP y Hennemann G. (1995). Uptake of 3,3',5,5'-tetraiodothyroacetic acid and 3,3',5'-triiodothyronine in cultured rat anterior pituitary cells and their effects on thyrotropin secretion. *Endocrinology* **136**, 4454-4461.

Finsson K y Eales J. (1999). Effect of T3 treatment and food ration on hepatic deiodination and conjugation of thyroid hormones in rainbow trout, *Oncorhynchus kisutch*. *Gen Comp Endocrinol* **115**, 379-386.

Gereben B, Goncalves C, Harney JW, Larsen PR y Bianco AC. (2000). Selective proteolysis of human type 2 deiodinase: a novel ubiquitin-proteosomal mediated mechanism for regulation of hormone activation. *Mol Endocrinol* **14**, 1697-1708.

Gereben B, Salvatore D, Harney JW, Tu HM y Larsen PR. (2001). The human, but not rat, Dio2 gene is stimulated by thyroid transcription factor-1 (TTF-1). *Mol Endocrinol* **15**, 112-124

Goglia F, Lanni A, Barth J y Kadenbach B. (1994a). Interaction of diiodothyronines with isolated cytochrome c oxidase. *FEBS Lett* **346**, 295-298.

Goglia F, Lanni A, Horst C, Moreno M y Thoma R. (1994b). In vitro binding of 3,5-diiodo-L-thyronine to rat liver mitochondria. *J Mol Endocrinol* **13**, 275-282.

Goglia F, Moreno M y Lanni A. (1999). Action of hormones at the cellular level: the mitochondria target. *FEBS Lett* **452**, 115-120.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Gorbman A, Dickhoff WW, Vigna SR, Clark NB y Ralph CL. (1983). The thyroid gland. En: *Comparative Endocrinology*. New York: John Wiley & Sons pp. 185-276.

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

Horst C, Harneit A, Seitz HJ y Rokos H. (1995). 3,5-Di-iodo-L-thyronine suppresses TSH in rats in vivo and in rat pituitary fragments in vitro. *J Endocrinol* **145**, 291-297

Hove VD y Broucke MF. (1980). Secretion of thyroid hormone. En: Visscher MD (Eds.), *The Thyroid* Raven Press. New York. pp. 61-79.

Kadenbach B, Huttemann M, Arnold S, Lee I y Bender E. (2002). Mitochondrial energy metabolism is regulated via nuclear-coded subunits of cytochrome c oxidase. *Free Radic Biol Med* **29**, 211-221.

Kim S-W, Harney J y Larsen R. (1998). Studies of the hormonal regulation of type 2 5'-iodothyronine deiodinase messenger ribonucleic acid in pituitary tumor cells using semiquantitative reverse transcription-polimerase chain reaction. *Endocrinology* **139**, 4895-4905.

Köhrle J. (1996). Thyroid hormone deiodinase – a selenoenzyme family acting as gate keepers to thyroid hormone action. *Acta Med Austriaca* **23**, 17-30.

Köhrle J. (1999). Local activation and inactivation of thyroid hormones: the deiodinase family. *Mol Cell Endocrinol* **151**, 103-119.

Lanni A, Moreno M, Cioffi M y Goglia F. (1992). Effect of 3,3'-diiodothyronine and 3,5-diiodothyronine on rat liver oxidative capacity. *Mol Cell Endocrinol* **86**, 143-148.

Lanni A, Moreno M, Cioffi M y Goglia F. (1993). Effect of 3,3'-diiodothyronine and 3,5-diiodothyronine on rat liver mitochondria. *J Endocrinol* **136**, 59-64.

Lanni A, Moreno M, Lombardi A y Goglia F. (1996). Calorigenic effect of diiodothyronines in the rat. *J Physiol* **494**, 831-837.

TRUCCO
FABRIZIO ORIGINI

Lanni A, Moreno M, Lombardi A y Goglia F. (1998). 3,5-Diiodo-L-thyronine and 3,5,3'-triiodo-L-thyronine both improve the cold tolerance of hypothyroid rats, but possibly via different mechanisms. *Eur J Physiol* **436**, 407-414.

Lanni A, Moreno M, Lombardi A, de Lange P y Goglia F. (2001). Control of energy metabolism by iodothyronines. *J Endocrinol Invest* **24**, 897-913.

Leary SC, Burton KN y Ballantine JS. (1996). Direct effect of 3,5,3'-triiodothyronine and 3,5-diiodothyronine on mitochondrial metabolism in the goldfish *Carassius auratus*. *Gen Comp Endocrinol* **104**, 61-66.

Leatherland JF. (1981). Endocrine factors affecting thyroid economy of teleost fish. *Amer Zool* **28**, 319-328.

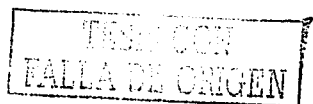
Leeson P, Ellis D, Emmett JC, Shah VP, Showell GA y Underwood AH. (1988). Thyroid hormone analogues. Synthesis of 3'-substituted 3,5-diiodo-L-thyronines and quantitative structure-activity studies of *in vitro* and *in vivo* thyromimetic activities in rat liver and heart. *J Med Chem* **31**, 37-54.

Leonard JL y Rosemberg IN. (1980). Iodothyronine 5'-deiodinase from rat kidney: substrate specificity and 5'-deiodination of reverse triiodothyronine. *Endocrinology* **107**, 1376-1383.

Leonard JL, Silva E, Kapiian M, Mellen S, Visser T y Larsen R. (1984). Acute posttranscriptional regulation of cerebrocortical and pituitary iodothyronine 5'-deiodinases by thyroid hormone. *Endocrinology* **114**, 998-1003.

Lombardi A, Lanni A, Moreno M, Brand MD y Goglia F. (1998). Effect of 3,5-diiodothyronine on the mitochondrial energy-transduction apparatus. *Biochem J* **330**, 521-526.

Lombardi A, Beneduce L, Moreno M, Diano S, Colantuoni V, Ursini MV, Lanni A y Goglia F. (2000). 3,5-Diiodo-L-thyronine regulates glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in the rat. *Endocrinology* **141**, 1729-1734.



MacLatchy DL y Eales JG. (1992). Intra- and extra-cellular sources of T3 binding to putative thyroid hormone receptors in liver, kidney, and gill nuclei of immature rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *J Exp Zool* **262**, 22-29.

Martinez MB, Ruan M y Fitzpatrick LA. (2000). Altered response to thyroid hormones by breast and ovarian cancer cells. *Anticancer Res* **20**(6B), 4141-4146.

Matsumoto A y Ishii S. (1992). *Atlas of endocrine organs, vertebrates and invertebrates*. Ed. Berlin, New York: pp 307.

McNabb A. (1992). *Thyroid Hormones*. Prentice Hall EUA. pp 6-20.

Mol K, Kaptein E, Darras V, de Greef W, Kühn E y Visser T. (1993). Different thyroid hormone-deiodinating enzymes in tilapia (*Oreochromis niloticus*) liver and kidney. *FEBS* **321**, 140-144.

Mol KA, Van der Geyten S, Kühn ER y Darras VM. (1999). Effects of experimental hypo- and hyperthyroidism on iodothyronine deiodinase in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Fish Physiol Biochem* **20**, 201-207.

Moreno M, Lanni A, Lombardi A y Goglia F. (1997). How the thyroid controls metabolism in the rat: different roles for triiodothyronine and diiodothyronines. *J Physiol* **505**, 529-538.

Moreno M, Lombardi A, Beneduce L, Silvestri E, Pinna G, Goglia F y Lanni A. (2002). Are the effects of T3 on resting metabolic rate in euthyroid rats entirely caused by T3 itself? *Endocrinology* **143**, 504-510.

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

Morin P, Hara T y Eales J. (1993). Thyroid hormone action in brain, liver, heart and muscle of Atlantic salmon (*Salmo salar*) during photoperiodically-induced parr-smolt

transformation. I. Outer and inner-ring thyronine deiodination. *Gen Comp Endocrinol* **90**, 142-156.

Muñoz A y Bernal J. (1997). Biological activities of thyroid hormone receptors. *Eur J Endocrinol* **137**, 433-445.

Murakami M, Greer MA, Greer SE, Hulstad S y Tanaka K. (1988). Effect of short-term constant light or constant darkness on the nyctohemeral rhythm of type-II iodothyronine 5'-deiodinase activity in anterior pituitary and pineal. *Life Sci* **42**, 1875-1879.

Murayama N, Yoshida K, Torikai S, Sakurada T, Asano Y y Yoshinaga K. (1985). Localization of thyroxine 5'-monodeiodinase activity in the renal proximal tubules in rabbits and rats. *Horm Metab Res* **17**, 197-200.

Norris DO. (1985). *Vertebrate Endocrinology*. Capítulo 8. Lea & Febiger. USA. pp 161-202.

O'Mara B, Dittrich W, Lauterio T y St. Germain D. (1993). Pretranslational regulation of type I 5'-deiodinase by thyroid hormones and in fasted and diabetic rats. *Endocrinology* **133**, 1715-1723.

O'Reilly I y Murphy MP. (1992). Studies on the rapid stimulation of mitochondrial respiration by thyroid hormones. *Acta Endocrinol (Copenh.)* **127**, 542-546.

Omeljaniuk RJ y Eales JG. (1985). Immersion of rainbow trout in 3,5,3'-triiodothyronine (T3): effects on plasma T3 levels and hepatic nuclear binding. *Gen Comp Endocrinol* **58**, 81-88.

Oppenheimer J. (1999). Evolving concepts of thyroid hormone action. *Biochem* **81**, 539-543.

Orozco A, Jeziorski M, Linser P, Greenberg R y Valverde-R C. (2002a). Cloning of the gene and complete cDNA encoding a type 2 deiodinase from *Fundulus heteroclitus*. *Gen Comp Endocrinol* **128**, 162-167.

TESIS CON
ORIGEN

Orozco A, Linser P y Valverde-R C. (1998). Salinity modifies outer-ring deiodinating activity in *Fundulus heteroclitus*. Trends in Comparative Endocrinology and Neurobiology. En: *Annals of the New York Academy of Sciences* **839**, 409-411.

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

Orozco RA, Ruiz-Juvera A y Valverde-R C. (1992). The importance of employing homologous serum free of thyronines in radioimmunoassays to asses circulating thyroid hormones in rainbow trout. *Bol Estud Med y Biol.* **1-4**: 41-49.

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

Orozco A, Villalobos P y Valverde-R C. (2002b). Environmental salinity modifies outer-ring deiodinating activity of liver, kidney and gill in the rainbow trout. *Comp Biochem Physiol Part A* **131**, 387-395.

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

Pinna G, Brodel O, Visser T, Jelitner A, Grau H, Eravci M, Meinhold H y Baumgartner A. (2002). Concentrations of seven iodothyronine metabolites in brain regions and the liver of the adult rat. *Endocrinology.* **143**:1789-800.

Pinna G, Meinhold H, Hiedra L, Thoma R, Hoell T, Graf KJ, Stollenburg-Didinger G, Eravci M, Prengel H, Brodel O, Finke R y Baumgartner A. (1997). Elevated 3,5-diiodothyronine concentrations in the sera of patients with nonthyroidal illnesses and brain tumors. *J Clin Endocrinol Metab* **82**, 1535-1542.

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

TESIS CON
ORIGEN

Sanders J, Van der Geyten S, Kaptein E, Darras V, Kühn E, Leonard J y Visser T. (1997). Characterization of a propylthiouracil-insensitive type I iodothyronine deiodinase. *Endocrinology* **138**, 5153-5160.

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

St. Germain D y Galton VA. (1997). The deiodinase family of selenoproteins. *Thyroid* **7**, 655-668.

St. Germain D y Croteau W. (1989). Ligand-induced inactivation of type I iodothyronine 5'-deiodinase: protection by propylthiouracil *in vivo* and reversibility *in vitro*. *Endocrinology* **125**, 2735-2744.

Steisapir J, Bianco AC, Buettner C, Harney J y Larsen PR. (2000). Substrate-induced down-regulation of human type 2 deiodinase (hD2) is mediated through proteosomal degradation and requires interaction with the enzymes active center. *Endocrinology* **141**, 1127-1135.

Steisapir J, Harney J y Larsen PR. (1998). Type 2 iodothyronine deiodinase in rat pituitary tumor cells is inactivated in proteosomes. *J Clin Invest* **102**, 1895-1899.

Sterling K, Tsuboyama G y Grenner MA. (1988). Thyroid hormone action: early calorogenic effect on dispersed rat liver cells in the absence of protein synthesis. *Endocr Res* **14**, 109-116.

Stulp M, Vijlder J y Ris-Stalpers C. (1998). Placental iodothyronine deiodinase III and II ratios, mRNA expression compared to enzyme activity. *Mol Cell Endocrinol* **142**, 67-73.

Sweeting R y Eales J. (1992). Thyronine 5'-monodeiodinase activity in microsomes from isolated hepatocytes of rainbow trout: effects of growth hormone and 3,5,3'-triiodo-L-thyronine. *Gen Comp Endocrinol* **88**, 169-177.

Sweeting R, Alexander G, Eales J y McKewon B. (1994). Hepatic and branchial thyroid hormone deiodinase activities associated with the parr-smolt transformation of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Gen Comp Endocrinol* **94**, 171-181.

Tanaka K, Murakami M y Greer MA. (1987). Rhythmicity of triiodothyronine generation by type-II 5'-deiodinase in rat pineal is mediated by a β -adrenergic mechanism. *Endocrinology* **121**, 74-77.

Taurog A. (1996). Hormone synthesis: thyroid iodine metabolism. En: Braverman L y Utiger R. (Eds.). *Werner and Ingbar's The Thyroid. A fundamental and clinical text*. J.B. Lippincot Company. EUA. pp 47-74.

Toyoda N, Nishikawa M, Mori Y, Gondola A, Ogawa Y, Yonemoto T, Yoshimura M, Masaki H y Inada M. (1992). Thyrotropin and triiodothyronine regulate iodothyronine 5'-deiodinase messenger ribonucleic acid levels in FRTL-5 rat thyroid cells. *Endocrinology* **131**, 389-394.

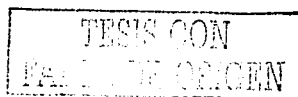
Valverde-R C, Croteau W, Lafleur G, Orozco A y St. Germain DL. (1997). Cloning and expression of a 5'-iodothyronine deiodinase from the liver of *Fundulus heteroclitus*. *Endocrinology* **138**, 642-648.

Van der Geyten S, Toguyeni A, Baroiller JF, Fauconneau B, Fostier A, Sanders JP, Visser TJ, Kuhn ER y Darras VM. (2001). Hypothyroidism induces type I iodothyronine deiodinase expression in tilapia liver. *Gen Comp Endocrinol* **124**, 333-342.

Varghese S y Oommen OV. (1999). Thyroid hormones regulate lipid metabolism in a teleost *Anabas testudineus* (Bloch). *Comp Biochem Physiol Part B* **124**, 445-450.

Varghese A, Shameena B y Oommen OV. (2001). Thyroid hormones regulate lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in *Anabas testudineus* (Bloch). *Comp Biochem Physiol Part B* **128**, 165-171.

Villalobos P. (2000). Trabajo de tesis para obtener el grado de maestría, intitulado: Clonación y caracterización del DNA complementario (cDNA) que codifica para la



desyodasa tipo 1 en el hígado de *F. heteroclitus*. Centro de Neurobiología, UNAM-Campus Juriquilla.

Visser T.J. (1996). Pathways of thyroid metabolism. *Acta Med Austriaca* **23**, 10-16.

Wu Y y Koening R. (2000). Gene regulation by thyroid hormones. *TEM* **11**, 207-211.

Yamamoto K, Kanski D y Frieden E. (1966). The uptake and excretion of thyroxine, triiodothyronine and iodine in bullfrog tadpoles after immersion or injection at 25° and 6°C. *Gen Comp Endocrinol* **6**, 312-324.

Yasuhiro H, Mmasami M, Haruo M, Takayuyi O, Makoto I y Masamoto M. (1999). Expression and regulation of type II iodothyronine deiodinase in cultured human skeletal muscle cells. *J Clin Endocrinol Met* **84**, 3293-3300.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

ÍNDICE DE TABLAS.

1.	Principales efectos de las hormonas tiroideas en mamíferos.	pp 8
2.	Efectos tiromiméticos reportados para la 3,5-T2.	pp 10
3.	Regulación de las desyodasas en teleósteos.	pp 29
4.	Condiciones de ensayo para la cuantificación de T4 y T3 por el método de radioinmunoanálisis.	pp 35
5.	Concentración de T4 y T3 hepática en <i>F. heteroclitus</i> tratados por inmersión con 0.1 μ M de esta hormona.	pp 36
6.	Condiciones óptimas para cuantificar la actividad D1 y D2 en el hígado del <i>F. heteroclitus</i> .	pp 37
7.	Concentración de los templados control obtenidos por PCR competitivo.	pp 44
8.	Velocidad máxima y constantes de Michaelis-Menten obtenidas para la enzima D2 en los distintos grupos experimentales.	pp 50

ÍNDICE DE FIGURAS

1.	Estructura general de las yodotironinas.	pp 9
2.	Morfología de la glándula tiroidea en distintos vertebrados.	pp 11
3.	Folículo tiroideo.	pp 12
4.	Biosíntesis de las TH.	pp 13
5.	Control de la función tiroidea.	pp 15
6.	Vías metabólicas de la tiroxina.	pp 17
7.	Vías de desyodación de las hormonas tiroideas.	pp 19
8.	Secuencia temporal postulada de las alteraciones de la economía tiroidea en el hígado de ratas ayunadas.	pp 22
9.	Construcción de los plásmidos competidores de FhD1c y FhD2c.	pp 39
10.	Fragmentos amplificados por PCR.	pp 40
11.	PCR competitivo control para FhD1 y FhD2.	pp 43
12.	Actividad desyodativa D1 hepática de <i>F. heteroclitus</i> tratados con 0.1 μ M de T4, T3 ó 3,5-T2.	pp 46
13.	Cantidad de FhD1-mRNA hepático de <i>F. heteroclitus</i> tratados con 0.1 μ M de T4, T3 ó 3,5-T2.	pp 46

- | | | |
|-----|---|-------|
| 14. | Actividad desyodativa D2 hepática de <i>F heteroclitus</i> tratados con 0.1 μ M de T4, T3 ó 3,5-T2. | pp 47 |
| 15. | Cantidad de FhD2-mRNA hepático de <i>F heteroclitus</i> tratados con 0.1 μ M de T4, T3 ó 3,5-T2. | pp 47 |
| 16. | Cinéticas de sustrato de la enzima D2 hepática. | pp 49 |

ABREVIATURAS

5 D	5 desyodasa	Km	Constante de Michaelis-Menten
5' D	5' desyodasa	LH	Hormona luteinizante
aa	Aminoácidos	MIT	Monoyodotirosina
Alb	Albúmina	mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
BAT	Tejido graso pardo	ORD	Desyodación del anillo externo
cDNA complementario	Ácido desoxirribonucleico complementario	PCR	Amplificación en cadena de la polimerasa
CRE	Elemento responsivo a cAMP	PRL	Prolactina
D	Desyodasas	PTU	Propiltiuracilo
D1	Desyodasa tipo 1	RNA	Ácido ribonucleico
D2	Desyodasas tipo 2	rT3	Triyodotironina
D3	Desyodasa tipo 3	RT-PCR	Transcripción inversa y amplificación en cadena de la polimerasa
<i>Dio 1</i>	gen que codifica para la D2	RXR	Receptor a 9-cis ácido retinóico
<i>Dio 2</i>	gen que codifica para D1	Se	Selenio
DIT	Diyodotirosina	SECIS	Secuencia de inserción para Se-cys
DNA	Ácido desoxirribonucleico	Se-cys	Seleno-cisteina
DTT	Ditiotreitol	SRIH	Somatostatina
FhD	cDNA que codifica para desyodasa de <i>Fundulus heteroclitus</i>	$t_{1/2}$	Vida media
FhDc	Competidor específico para FhD	T2	Diyodotironina
FSH	Hormona foliculo estimulante	T3	Triyodotironina
GH	Hormona de crecimiento	T4	Tiroxina
HHT tiroides	Eje hipotálamo-hipófisis-tiroides	TBG	Globulina transportadora de hormonas tiroideas
IRD interno	Desyodación del anillo interno	TBPA	Prealbúmina
Ki	Constante de inhibición		

tDh	Deshalogenasa tiroidea	TRH	Hormona liberadora de tiotropina
Tg	Tiroglobulina	TSH	Hormona estimulante de la tiroides ó tiotropina
TH	Hormonas tiroideas	TTF	Factor de transcripción tiroideo
TPO	Tioperoxidasa	TTR	Transtiretina
TR tiroideas	Receptores a hormonas tiroideas	Vmax	Velocidad máxima
TRE	Elemento responsivo a hormonas tiroideas		

TESIS CON
ORIGEN

FALTA

PAGINA

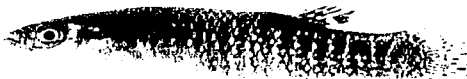
78 |

FALTA

PAGINA

79|

ANEXO 1.
Fundulus heteroclitus.



NOMBRE COMÚN – mummichog.

OTROS NOMBRES COMUNES (en inglés): Killifish común, saltwater minnow, mummy, chub, mummichog común, barbell, mud minnow, pike minnow, mud dabbler, gudgeon, killie, mummie, marsh minnow, brackish water chub

Filum – Cordata.

CLASE – Osteictio.

ORDEN – Ateriniforme.

FAMILIA – Ciprinodontidae.

GÉNERO – *Fundulus*.

ESPECIE – *heteroclitus*.

NOMBRE CIENTÍFICO - *Fundulus heteroclitus*.

TALLA: Promedio 12.5cm con un máximo de 15 cm.

MEDIO AMBIENTE: Bentopelágico, marinos, salóbricos y dulce-acuáticos.

CLIMA: Temperaturas de 10 a 28 °C dependiente de su distribución geográfica.

DISTRIBUCIÓN: Se distribuye en el Atlántico oeste; desde el Golfo de St. Lawrence, en Canadá hasta el Noreste de Florida, E.U.A. También se ha reportado su presencia en las Bermudas.

TESIS CON.
FALLA DE ORIGEN

El *F. heteroclitus* es una especie estuarina que puede tolerar un amplio rango de salinidad medioambiental. Frecuentemente se le puede encontrar en grupo junto con otras especies de *Fundulus* en agua dulce o en áreas de baja salinidad. Puede soportar también amplios rangos de temperatura.

La etapa reproductiva abarca los meses de abril a agosto. La ovulación es cíclica, y se relaciona en gran medida, con la luna nueva y la luna llena. Los huevos son depositados en aguas vivas. Los huevos son depositados en cantidades que varían de 10 a 300 y son escondidos en hojas, o conchas vacías. En estas circunstancias están protegidos de secarse, permitiendo su eclosión posterior en dos semanas.

Los *F. heteroclitus* consumen una gran variedad de plantas y productos animales incluyendo diatomeas, anfípodos, moluscos, crustáceos, peces más pequeños y huevos de peces.

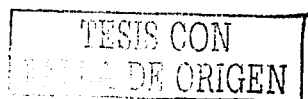
Como grupo, los *Fundulus* han sido utilizados para estudios experimentales de embriología, genética, fisiología, endocrinología, citología y comportamiento. Parte de la información generada a través de estos estudios ha tenido importantes implicaciones médicas, como es el caso de la acción de las hormonas esteroides sobre la regulación y el desarrollo sexual, el desarrollo de tejidos cancerosos y la genética de histocompatibilidad en tejidos y órganos transplantados.

REFERENCIAS

Checked: Torres, Armi G. Modified: Garilao, Cristina V. Entered: Froese, Rainer Last modified by Eli, 08.11." Species Summary for *Fundulus heteroclitus* heteroclitus Mummichog" <http://www.fishbase.org/Summary/SpeciesSummary.cfm?ID=3192&genusname=Fundulus&speciesname=heteroclitus%20heteroclitus>

Lavett Smith "The Inland Fishes of New York State" publicadopor: New York State Department of Environmental Conservation, 1985.;

<http://www.sarep.cornell.edu/Sarep/fish/Cyprinodontidae/mummichog.html>



Anexo 2.

COMPOSICIÓN DEL AGUA DE MAR.

La salinidad del agua de mar varía ligeramente de mar a mar, conservándose un promedio de 34-36 ppm (partes por mil), a excepción del mar muerto en el que la salinidad alcanza las 200 ppm. La salinidad del agua de mar cerca de la línea costera puede fluctuar en su composición debido al agua proveniente de ríos que desembocan en él. Los principales elementos constitutivos promedio del agua de mar se muestran a continuación:

Elemento	ppm
Cloro	19500
Sodio	10770
Magnesio	1290
Azufre	905
Calcio	412
Potasio	380
Bromo	67
Carbón	28
Nitrógeno	11.5
Estroncio	8
Oxígeno	6
Boro	4.4
Silicio	2
Flúor	1.3
Argón	0.43

Elemento	ppm
Litio	0.18
Rubidio	0.12
Fósforo	0.06
Yodo	0.06
Bario	0.02
Molibdeno	0.01
Arsénico	0.0037
Uranio	0.0032
Vanadio	0.0025
Titanio	0.001
Zinc	0.0005
Níquel	0.00048
Aluminio	0.0004
Cesio	0.0004
Cromo	0.0003

Elemento	ppm
Antimonio	0.00024
Criptón	0.0002
Selenio	0.0002
Neón	0.00012
Manganeso	0.0001
Cadmio	0.0001
Cobre	0.0001
Tungsteno	0.0001
Fierro	0.000055
Xenón	0.00005
Zirconio	0.00003
Bismuto	0.00002
Niobio	0.00001
Talio	0.00001
Osmolalidad	862 +/- 1 mOs

Elementos encontrados en el agua de mar en una concentración $> 0 = a \cdot 10^{-5}$ ppm

REFERENCIAS.

Editor: Bearman G., Ocean chemistry and deep-sea sediments, Pergamon:Sydney, 1989.
<http://www.aquarium.psu.edu/ASD.htm>
<http://ozreef.org/reference/composition.html>

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Anexo 3

CIRCULACIÓN SANGUÍNEA EN TELEÓSTEOS.

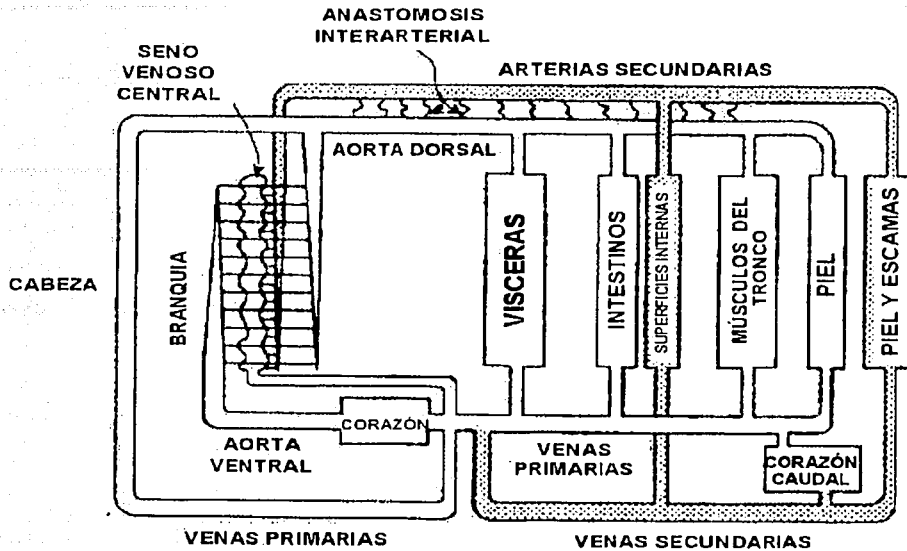
El corazón de los peces es una bomba simple, formada por 4 cavidades distintas entre sí. La sangre venosa que se dirige al corazón es colectada primero en el **seno venoso**, esta estructura funciona como el marcapaso donde se genera el latido cardiaco. Posteriormente la sangre pasa al **atrio**; la contracción de esta estructura es el principal medio por el cual se da el llenado ventricular. El **ventrículo** es la cavidad de mayor tamaño y donde se genera la mayor presión. El **bulbo arterioso**, última estructura cardíaca presente en los teleósteos, es una cavidad elástica que permite que la sangre expulsada por el ventrículo mantenga un flujo constante en las arterias mayores.

A diferencia de los mamíferos, en los peces el gasto cardiaco se distribuye a partir del bulbo arterioso hacia la circulación respiratoria de la branquia a través de arterias branquiales aferentes. Esta sangre no regresa al corazón, sino que es enviada directamente a la circulación sistémica, por lo tanto, el corazón de los peces es capaz de generar suficiente presión para bombear la sangre desoxigenada primero hacia la circulación branquial, y posteriormente hacia la circulación sistémica. Ambos sistemas están arreglados en serie, y por esta razón, la presión a nivel de la circulación branquial es mucho mayor que la presión en la circulación sistémica.

La circulación sistémica en peces, a diferencia de los otros vertebrados, se divide en circulación primaria y secundaria. La aorta dorsal, y en menor medida la aorta ventral, son las principales arterias de distribución sanguínea de la circulación primaria, y a partir de estas arterias la sangre es distribuida a lo largo de todo el organismo.

El retorno de la sangre proveniente de la cabeza y las branquias va directamente hacia el corazón, a través de las venas de la circulación primaria. Sin embargo, las sangre proveniente de los músculos del tronco y del tracto gastrointestinal pasa primero a través del riñón y el hígado, respectivamente, antes de llegar al corazón.

TEMAS CON
FALTA DE ORIGEN



La circulación secundaria se origina a partir de las arterias primarias en diversos puntos de la circulación sistémica y branquial, formando vesículas arteriales enroscadas. La circulación secundaria es un sistema de bajo hematocrito y baja presión. Las conexiones entre las circulaciones primaria y secundaria reducen la presión sanguínea considerablemente. De esta manera, el volumen de la circulación secundaria es tan grande como el de la primaria, pero la presión sanguínea es menor, por lo tanto, el tiempo de circulación de ésta se encuentra en el orden de minutos a horas. El papel que juega la circulación secundaria en branquias, piel y escamas parece estar relacionado con la nutrición, debido a que estos órganos por su cercanía con la superficie, pueden intercambiar gases directamente con el agua. Sin embargo, los intestinos también reciben arterias provenientes de la circulación secundaria. En este sitio se desconoce la función de este tipo de circulación. La circulación secundaria drena hacia las venas de la circulación primaria. Como la presión venosa es muy baja, en ocasiones más baja que el subambiente del pez, algunas especies cuentan con

TIENE CON
CAUSA EL ORIGEN

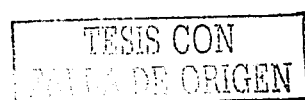
corazones accesorios, que permiten el retorno de la sangre a través de estos vasos hacia el corazón branquial.

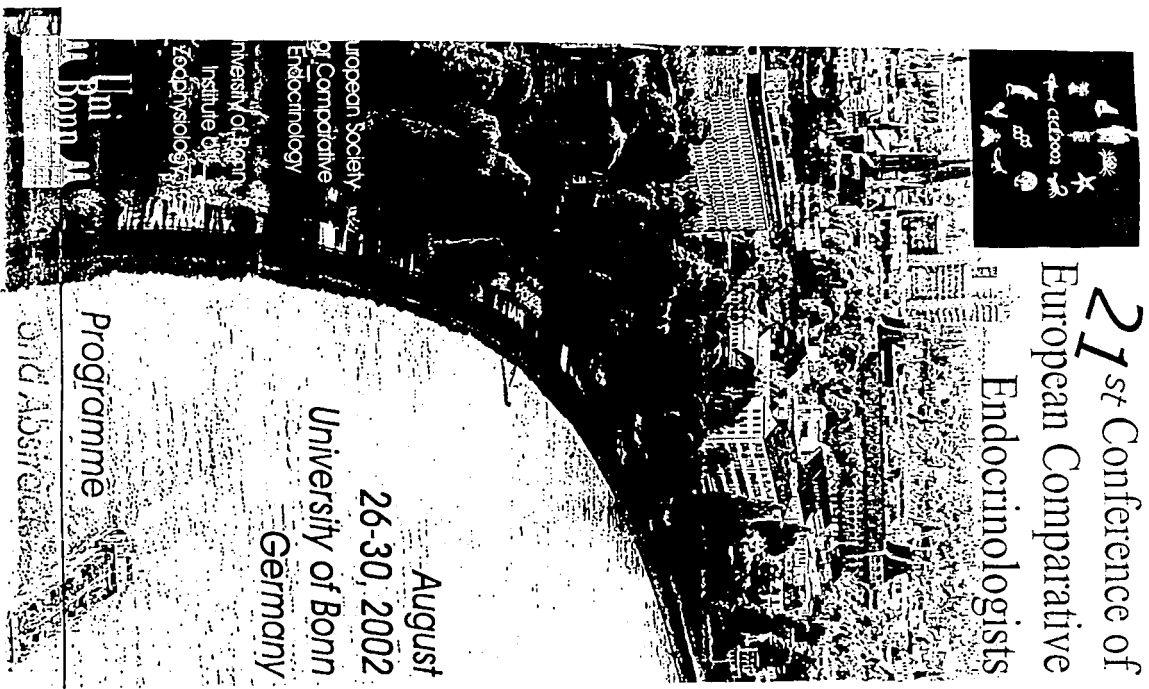
Con estos datos podemos concluir, que el hígado recibe dos tipos de riego sanguíneo, ambos provenientes de la región intestinal, uno perteneciente a la circulación sistémica primaria, de mayor presión así como valor de hematocrito, y otra perteneciente a la circulación sistémica secundaria, más lenta, de menor presión y menor valor de hematocrito. Estas características deben tener cierta relevancia en relación con la fisiología hepática, la cual aún es desconocida.

REFERENCIAS.

Farrell A. (1993). Cardiovascular System. En: Evans D. Ed. The Physiology of Fishes. Marine Science Series. E.U.A. pp 219-246.

Ladd Prosser. Ed. Environmental and metabolic animal physiology. Comparative Animal Physiology. 4ª ed. Wiley-Liss. E.U.A. 1991. pp 517-529.





**27th Conference of
European Comparative
Endocrinologists**

**August
26-30, 2002
University of Bonn
Germany**

**Programme
and Abstracts**

**3,5-T2 DIFFERENTIALLY REGULATES THE HEPATIC ORD PATHWAY IN
KILLIFISH**

García-G C., Jeziorski M.C., Orozco A.
Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México. Querétaro, México.
E-mail: aureao@servidor.unam.mx

Although it is considered to be an inactive product of thyronine (TH) metabolism, 3,5-T2 has recently been described as bioactive when tested at high doses (~5x the dose for T3). These results and our recent data showing that killifish liver expresses the two enzymes that catalyze the TH ORD pathway led us to compare the effect of the three known bioactive thyronines in killifish liver. To this end, we designed a competitive PCR technique to measure D1 and D2 mRNA levels, which were compared to their enzymatic activity. Fish were treated by immersion (12 or 24 h) with 0.1 µM of T4, T3, or 3,5-T2. In contrast to what has been reported in mammals, no TH exerted a significant effect on D1 activity. However, all three THs significantly decreased D2 activity and mRNA levels in the following order: T2 > T3 > T4. Thus, the six-fold decrease in both activity and D2 mRNA expression observed after 3,5-T2 exposure suggests a putative regulatory role exerted by this thyronine on the fine tuning of the hypothalamus-pituitary-thyroid axis. Furthermore, these data are consistent with the high circulating levels of T3 characteristic of marine teleosts, suggesting the possible role of this TH as a precursor for a more bioactive thyronine. Together, our results suggest that teleost ORD-pathway include the generation of a biologically active 3,5-T2. [Partially supported by grants CONACYT 34311-N and 37866-N].

86

COPIES CON
DE ORIGEN

B.B.B.

3,5-DIIODOTHYRONINE (T₂) REGULATES THE HEPATIC OUTER RING DEIODINATING PATHWAY IN KILLIFISH

Carlota García-G., Michael C. Jeziorski, Carlos Valverde-R., and Aurea Orozco.

Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México. Campus UNAM-UAQ-Juriquilla. Querétaro 76230, Qro., México

ABSTRACT

Although it is widely considered to be an inactive product of thyronine (TH) metabolism, 3,5-T₂ has recently been described as bioactive. However, its effects upon deiodinases type 1 and 2 (D1 and D2), the two enzymes that catalyze the TH outer ring-deiodinating (ORD) pathway, are not yet known. We compared the effect of 3,5-T₂ to that of the known bioactive thyronines T₄ and T₃ upon deiodinase mRNA levels and enzymatic activity in killifish liver, which expresses both D1 and D2. Fish were treated by immersion (12 or 24 h) in 0.1 μM T₄, T₃, or 3,5-T₂. In contrast to what has been reported in mammals, no TH exerted a significant effect on D1 enzymatic activity. However, all three THs significantly decreased D2 activity and D1 and D2 mRNA levels. The comparative potency of 3,5-T₂ in decreasing both D2 activity and D1 and D2 transcription suggests that this iodothyronine may indeed play a physiological role in teleost thyroidal systems.

INTRODUCTION

Deiodinases are the major determinants of iodothyronine availability and disposal. This family of selenoenzymes selectively removes iodine atoms from the iodothyronine molecule, which results in the activation or inactivation of the thyroid hormone (TH). Two deiodinases, types 1 (D1) and 2 (D2), serve the activating or outer ring-deiodinative pathway (ORD) by converting T₄ to T₃. The inactivating inner ring-deiodinating (IRD) pathway is catalyzed by the enzyme 5-deiodinase type 3 (D3), which converts T₄ and T₃ to inactive metabolites (reverse triiodothyronine [rT₃] and 3,3' diiodothyronine [T₂] respectively).

Deiodinases have differing catalytic properties, are expressed in a tissue- and development-specific fashion, and are tightly and differentially regulated by TH. Thus, in mammals, D1 activity and/or its mRNA are up-regulated by hyperthyroidism and down-regulated by hypothyroidism. These regulatory effects of TH upon D1 involve alterations in transcription, which in human can be attributed to the presence of two thyroid hormone response elements (TREs) in the 5' flanking region of the *Dio1* gene. In contrast, D2 transcription and/or activity exhibit the opposite changes in response to increased or decreased TH levels. These effects are not clearly understood, and both pre- and posttranslational mechanisms have been postulated (for review see Bianco *et al.*, 2002).

Fish thyroid physiology is distinct among vertebrates. Fish thyroid gland does not secrete T₃ under physiological conditions, suggesting that extra-thyroidal iodothyronine deiodination is the main source of this hormone (Eales, 1985). Consonantly, the liver of some fish species co-expresses the two enzymes that catalyze the activating iodothyronine ORD pathway (Orozco *et al.*, 1997; 2000). Although these enzymes are similar to their mammalian counterparts both kinetically and in molecular structure (Orozco *et al.*, 1997; Valverde *et al.*, 1997; Orozco *et al.*, 2000; 2002b,c), fish hepatic D2 is expressed more abundantly, exhibiting V_{max} values up to four times higher than those found in hypothyroid rat pituitary (Orozco *et al.*, 1997; 2000). Thus, the high specific activity of teleost D1 and D2, combined with their co-expression in a large-sized organ, make fish liver an advantageous model in which to study aspects of the regulation of these ORD pathway enzymes.

As in mammalian species, substrate availability has been thought to be a major regulator of the ORD pathway in fish. However, current information strongly suggests that while fish D2 responds to thyroïdal status in the same manner as its mammalian counterpart, fish D1 exhibits a distinct response. Long-term T₃-hyperthyroidism down-regulates hepatic D2 both in the rainbow trout (Finsson *et al.*, 1999) and in tilapia (Mol *et al.*, 1999) while D1 remains unmodified. Furthermore, long-term MMI-induced hypothyroidism acutely increases both hepatic D1 and D2 activities and their corresponding levels of mRNA in tilapia (Van der Geyten *et al.*, 2001).

Recent studies indicate that 3,5-diiodothyronine (3,5-T₂), an iodothyronine generated through the ORD of T₃, exhibits a rapid mitochondrial-mediated effect upon the oxidative capacity and respiration rate in mammals (Horst *et al.*, 1989; O'Reilly and Murphy, 1992; Lanni *et al.*, 1993; Moreno *et al.*, 1997) and fish (Leary *et al.*, 1996). 3,5-T₂ has also been implicated in other thyromimetic effects; for example, 3,5-T₂ inhibits TSH secretion and the expression of TR β 2 receptors (Ball *et al.*, 1993) and stimulates mRNA synthesis of GH (Moreno *et al.*, 1998) and D1 activity (Baur *et al.*, 1997). Depending on the response assessed, these effects of 3,5-T₂ are equipotent or up to 100-fold lower than those observed with the equivalent dose of T₃.

The present study was designed to further understand the regulatory effect that thyroïdal status exerts on the hepatic ORD pathway in fish. Specifically, we analyzed the effect of short-term T₄, T₃, and 3,5-T₂-hyperthyroidism (12 and 24 hours) on both D1 and D2 activities and on the levels of expression of D1 and D2 mRNAs.

MATERIAL AND METHODS

Animals. Male *Fundulus heteroclitus* (killifish) ranging from 2 to 6 g were collected from the estuarine creeks of the Matanzas River (St. Augustine FL). The salinity of the river at the collection site is very similar to that of sea water (SW). After capture, fish were kept in tanks with running SW piped directly from the ocean at a temperature of around 28 °C. A total of 100 animals were deparasitized after capture, fed *ad libitum* 24 h later (Silver Cup, Nelson & Sons Inc.) and maintained at a light:dark cycle of 14:10. Collection of the tissues for the different experiments was performed as follows: Fish were decapitated and the liver was rapidly removed. Livers used for deiodinase activity determination were homogenized in 1:10 (w/v) ice-cold homogenizing buffer (Hepes 10 mM (SIGMA), 0.25 M sucrose (SIGMA), 10 mM EDTA (SIGMA), pH 7). Aliquots were quick-frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C until assayed. Livers used for mRNA quantification were pooled.

Determination of Hepatic Iodothyronines. Individual livers used for T₄ and T₃ determination were homogenized, and iodothyronines were extracted using a modification of a method described by Pinna *et al.* (2002). In brief: livers (average wet weight; 100 ± 7 mg) were homogenized in 1:10 (w/v) of a methanol:ammonium (99:1) solution. The homogenates were centrifuged for 10 min at 700 g. The supernatants were collected, evaporated in a speed vacuum and suspended in 200 μ l of trout serum free of iodothyronines (Orozco *et al.*, 1992). To measure the recovery efficiency of the method, 10 nM of either iodothyronine was added to single killifish livers (n = 4). Iodothyronines were extracted as described, and measured by RIA (see below). The recovery rates of the liver homogenates ranged from 70 – 90% for T₃ and 50 – 70 % for T₄.

Experimental Design. To validate the method of hormonal administration by immersion, tanks were supplemented with 0.1 μM of either T_4 or T_3 from a 0.1 mM stock dissolved in 0.01 N NaOH. Another tank containing an equivalent concentration of NaOH served as the control group. Fish ($n=4$) were placed in each tank and sacrificed at 12 and 24 hours post-immersion. Iodothyronines were extracted from individual livers (see above) and hepatic T_4 and T_3 were measured by RIA. For the experiment, twenty fish were placed into each of four tanks prepared with running SW and constant aeration. After 12 hours of acclimation, the water supply was shut down and the water volume of each tank was adjusted to 5 litres. The tanks were supplemented with 0.1 μM of T_4 , T_3 , 3,5- T_2 , or an equivalent concentration of NaOH. Groups of ten fish per experimental tank were sacrificed after 12 h of treatment, and the remaining ten after 24 h. Of each group, 5 livers were individually prepared for deiodinase activity determination, and the remaining livers were pooled for mRNA extraction.

Radioimmunoassay of Iodothyronines. Hepatic content of T_4 and T_3 was measured by radioimmunoassay (RIA) as previously described (Orozco *et al.*, 1992). The inter- and intra-assay coefficients of variation were 8.9 and 8.3%, and 9.5 and 6.6 % for T_4 and T_3 , respectively. The assay buffer used was Tris-HCl (0.05 M; pH 8.6). The incubation mixture contained a working dilution of the corresponding anti-thyronine serum, standard (standard curve: T_4 : 12.5 to 800 ng/dl; and T_3 : 6.25 to 1000 pg/dl), and the radioactive solution [10 pg/100 μl of the labeled thyroxine plus 10 mg/10 ml of ANS (SIGMA)], and 50 (T_4) or 25 (T_3) μl of the sample. The standard curves also included an equivalent amount of hypothyroid trout serum. A second antibody (anti-rabbit IgG; SIGMA) was used to separate free from bound fractions.

Deiodination Assay. Enzyme activities were measured in duplicate as previously described (Orozco *et al.*, 2000). In brief, the total volume of the reaction mixture was 100 μl and contained ^{125}I - T_4 or ^{125}I - rT_3 (sp. act. 1200 and 1174 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$, respectively; New England Nuclear), plus a concentration of the corresponding non-radioactive thyronine (Henning Co.), DTT (Calbiochem), and PTU (SIGMA) as indicated below. Liver homogenate was added at a protein concentration of around 100 μg , a concentration that falls within the linear part of the protein curve (optimal protein concentration). Also, 1 μM of unlabeled T_3 was added to the mixture to minimize the IRD of the substrates. The released acid-soluble ^{125}I was isolated by chromatography on Dowex 50W-X2 columns (BioRad). Specific activity was obtained as previously described (Pazos-Moura *et al.*, 1991) and expressed as fmol (D2) or pmol (D1) iodide/h/mg protein. Assay conditions for hepatic D1 and D2 included 2 nM ^{125}I - rT_3 , 200 nM rT_3 , and 5 mM DTT for D1 activity and 1 nM ^{125}I - T_4 , 25 mM DTT and 1 mM PTU for D2 determination. The assays were incubated for 1 hr at 37 °C. For D2 apparent K_m and V_{max} determinations, a pool of liver homogenates was prepared for each experimental group. The concentrations of non-labeled T_4 used were 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8 and 10 nM. Protein content was measured by Bradford's method (BioRad).

Competitive PCR. Using D1 and D2 cDNA fragments previously cloned from *F. heteroclitus* (Orozco *et al.*, 2002b,c), a unique HindIII site was inserted by PCR-mediated site-directed mutagenesis. The altered fragments were subcloned (pGEM-T, Promega), cut with HindIII (NEB), and dephosphorylated, and a 44 bp HindIII fragment from an unrelated cDNA clone was ligated into the cut plasmid. The resulting competitor plasmids were purified, and the cDNA was cut from the vector and its concentration determined on a spectrophotometer. Each isolated cDNA

Table 1. Hepatic concentrations of T₄ or T₃ in killifish treated by immersion in 0.1 μM of the corresponding iodothyronine.

Experimental Group	Hepatic T ₄ (nM) (n=4 +S.E.M.)	Hepatic T ₃ (nM) (n=4 +S.E.M.)
Control 12 h	2.863 ± 0.055	7.050 ± 0.388
Treated 12 h	4.622 ± 0.658 *	11.900 ± 0.594 *
Control 24 h	2.601 ± 0.210	4.293 ± 0.319
Treated 24 h	4.305 ± 0.113 *	24.470 ± 2.657**

(*p<0.05, **p<0.001; as compared to the corresponding control group)

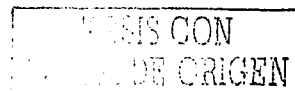
fragment was then diluted in TE buffer to concentrations ranging from 1×10^9 to 1×10^4 molecules/μl. RNA was isolated from pools of treated or control livers (TRizol) and cDNA was reverse-transcribed (Superscript, Invitrogen) from 10 μg RNA using a gene-specific primer. Varying amounts of competitor cDNA were added to constant amounts of liver cDNA in a series of PCRs. Specific oligonucleotide pairs were designed to amplify a product of 240 bp (target) or 284 bp (competitor) from D1 cDNA, and 270 bp (target) or 314 bp (competitor) from D2 cDNA. A high annealing temperature was used to control for nonspecific amplification (40 sec at 94°, 40 sec at 65°, 30 sec at 72° for 35 cycles). In all cases, Taq was combined with Taq antibody (Platinum, Invitrogen) to avoid the need for a hot start. The PCR products were electrophoresed in a 3% agarose gel (Agarose 1000, Invitrogen) and the obtained fragments were analyzed by densitometry using the Electrophoresis Documentation and Analysis System 290 (Kodak). Signal strengths were extrapolated for both target and competitor to determine the point at which amplification was identical for both; the concentration of competitor at this point was used as an estimation of the concentration of target. Although this protocol does not control for slight differences in the efficiency of reverse transcription, and thus cannot be used as an

absolute measure of target cDNA concentration, it accurately reflects relative differences in target concentration among experimental groups.

Statistical analysis. Michaelis-Menten constants and deiodinase (D1 and D2) activity results were analyzed using a one-way analysis of variance coupled with a Bonferroni's Multiple Comparison Test (control vs treatments).

RESULTS

Validation of the Competitive PCR Method. To determine the accuracy of competitive PCR, we conducted control experiments in which 1×10^7 molecules of purified target D1 or D2 cDNA were combined in a series of reactions with the corresponding competitor cDNA in amounts ranging from 1×10^5 to 1×10^8 molecules. The amount of target cDNA was then determined using densitometry followed by regression analysis. In each instance, the competitive PCR technique gave a reasonably accurate measure of the number of target molecules; values of 1.07×10^7 D1 molecules and 1.27×10^7 D2 molecules were obtained. The slight overestimation in the measured values can be attributed to more efficient amplification of the shorter target molecule. To correct for this difference in amplification, in



subsequent experiments the measured number of D1 and D2 target molecules was reduced by a correction factor of 1.07 and 1.27, respectively.

Administration of Iodothyronine by Immersion. To establish the efficacy of immersion in elevating iodothyronine levels in liver, hepatic T_4 and T_3 content was determined at various time points after treatment with $0.1 \mu\text{M}$ of either iodothyronine. As shown in Table 1, T_4 content in liver exhibited a significant ($p < 0.05$) 1.6-fold increase after 12 h of treatment by immersion. This increment was sustained after 24 h of treatment. Hepatic T_3 concentration significantly increased ($p < 0.05$) 1.7 fold and 5.7 fold ($p < 0.001$) after 12 and 24 h of treatment, respectively.

Effect of Iodothyronines on Hepatic D1 Activity and mRNA Expression. As depicted in Fig 2A, T_4 , T_3 , and 3,5- T_2 did not significantly modify D1 activity after either 12 h or 24 h of treatment. In contrast, D1 mRNA levels decreased markedly after exposure to the different iodothyronines. T_4 had no effect on D1 mRNA after 12 h of treatment, but by 24 h induced a 6-fold decrease in transcript levels (Fig 2B). After 12 h, T_3 elicited a 3.4-fold decrease in D1 mRNA, which became a 10-fold decrease after 24 h (Fig 2B), whereas 3,5- T_2 exerted a 4.4-fold decrement in D1 mRNA after 12 h that was sustained at 24 h.

Effect of Iodothyronines on Hepatic D2 Activity and mRNA Expression. Both D2 activity and D2 mRNA levels decreased after iodothyronine treatment. D2 activity was moderately decreased after 12 h of T_4 treatment, then showed a significant ($p < 0.05$) 2.3-fold reduction after 24 h (Fig. 3A). Kinetic analysis showed that the apparent K_m values for hepatic D2 activity were within the same range, whereas the

V_{max} values decreased 50 and 70 ($p < 0.05$) percent after 12 and 24 h of T_4 exposure, respectively (Table 2). The decrease in enzymatic activity was accompanied by an approximately 2-fold decrement in D2 mRNA after either 12 or 24 h (Fig 3B). In the same manner, T_3 treatment significantly decreased ($p < 0.05$) hepatic D2 activity after 24 h (Fig. 3A). The apparent hepatic D2 K_m values for both experimental groups were not modified, but a 55 ($p < 0.05$) and 80 ($p < 0.001$) percent decrease in V_{max} values were observed at 12 and 24 h after T_3 exposure, respectively (Table 2). As with T_4 treatment, the effect of T_3 on D2 mRNA levels was more rapid than the effect on D2 activity. D2 mRNA was decreased 3-fold after 12 h of immersion and 8-fold after 24 h of treatment (Fig 3B).

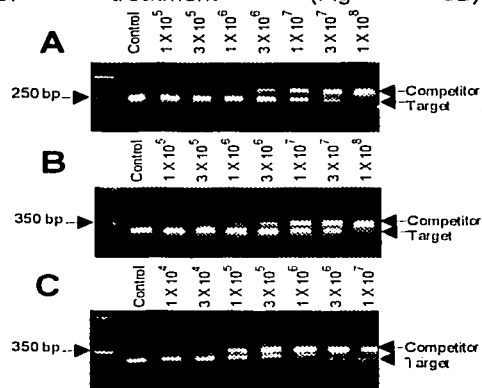


FIGURE 1. Examples of competitive PCR. The upper figures show control experiments for (A) D1 and (B) D2 cDNA. 1×10^7 molecules of target cDNA from a purified plasmid were combined with the corresponding competitor in increasing amounts ranging from 1×10^5 to 1×10^8 molecules and amplified by PCR. The control reaction contained no competitor. A standard curve was generated from the intensities of the two bands by densitometry and regression analysis. The extrapolated point at which both bands would have equal intensities is an estimate of the amount of target. The leftmost lanes contain various molecular weight standards. C) Example of an experiment measuring D2 cDNA reverse-transcribed from killifish liver after 12 h treatment with $0.1 \mu\text{M}$ 3,5- T_2 . The concentration of D2 cDNA in this sample was estimated to be 1.15×10^5 molecules/ μl .

In contrast to the other iodothyronines, the effects of 3,5-T₂ upon D2 activity were evident after 12 h of treatment. Hepatic D2 activity was significantly decreased ($p < 0.05$) by 3,5-T₂ treatment after 12 h of immersion, a decrease that remained significant after 24 h. As for the other iodothyronines, apparent Km values were similar and Vmax values decreased 88 ($p < 0.001$) and 37% at 12 and 24 h, respectively (Table 2). Concomitantly, hepatic D2 mRNA was significantly suppressed after 12 h of treatment, and reached a 7-fold decrease after 24 h (Fig 3B).

DISCUSSION

It is well established that immersion of aquatic vertebrates in water containing dissolved hydrophobic hormones, e.g. TH, provides an efficient, noninvasive, and minimally stressful means of chronically administering these hormones (Etkin, 1935; Eales, 1974; Yamamoto *et al.*, 1966; Omeljaniuk and Eales, 1985). Indeed, in the present work we have shown that by this means, intra-hepatic T₄ and T₃ concentration can be significantly raised after 12 h of immersion and that this increment is sustained for at least 24 h. Despite the fact that both iodothyronines were administered at similar doses, T₃ hepatic concentration reached higher levels at 24 h post-immersion. This is consonant with previous work in which a steady state between ambient and plasma hormone levels in the rainbow trout develops more slowly for T₃ than for T₄, due in part to a different effectiveness of hormone uptake by the gills (Eales and Collicut, 1974; Omeljaniuk and Eales, 1985). The killifish in the present study were kept in SW, thus hormone uptake occurs mainly through gut absorption. Indeed, in the present work we have shown that by this means, intrahepatic T₄ and T₃ concentration can raise 50% higher at 24 h. These findings agree with studies in *F. heteroclitus* treated by immersion with T₃ or T₄ at doses similar to

those used in the present work and with an exposure time of 24 h, showing a dose-dependent decrease in ¹²⁵I uptake by thyroid tissue. This result suggests a systemic saturation of iodothyronines (Brown and Stetson, 1985).

To measure deiodinase mRNA levels, we used competitive PCR, which offers certain advantages over standard RT-PCR techniques. The sensitivity of conventional PCR to subtle variations in initial conditions can result in variability between otherwise identical reactions, and differences in product concentration are highly dependent upon the phase during which products are sampled. The use of a housekeeping gene as an amplified standard can be problematic due to differences between target and standard in both initial template concentration and the efficiency of primer annealing. In competitive PCR, the target competes for amplification with a known amount of a nearly identical template, which tightly controls for variations in amplification efficiency. As implemented here, the technique is not fully quantitative. The competitor was added as a cDNA template, so there was no control for differences in reverse transcription. However, we were interested primarily in measuring changes in concentration of a single mRNA between experimental groups, and as a relative measure the competitive PCR technique is considerably more reliable than conventional RT-PCR. In mammals, TH are among the most potent physiological regulators of deiodinase activity. Hyperthyroidism increases D1 activity and transcription, whereas hypothyroidism exerts the opposite effects. In human, the observed responses to substrate have been explained by the presence of two TREs in the 5' flanking region of the Dio1 gene (Bianco *et al.*, 2002). In contrast, the present results clearly show that T₄, T₃, or 3,5-T₂ do not vary hepatic D1 activity in the killifish within the first 24 h of treatment. These data are in consonance with previous work by our group (Orozco *et al.*, 2002a) and others.

Table 2. Comparison of the apparent kinetic constants of killifish hepatic D2 activity.

Experimental Group	Vmax		Km	
	(fmol ¹²⁵ I/mg/h ± SE)		(nM ± SE)	
	12 h	24 h	12 h	24 h
Control	1340 ± 260	1340 ± 260	2.0 ± 0.37	2.4 ± 0.47
T4	660 ± 90	440 ± 85*	2.8 ± 0.37	2.3 ± 0.44
T3	600 ± 70	245 ± 140**	2.3 ± 0.28	2.3 ± 0.37
3,5-T2	160 ± 70**	850 ± 110	2.8 ± 0.23	2.2 ± 0.16

(*p < 0.05; **p < 0.01)

(Finsson *et al.*, 1999), who have reported that T₄ and T₃ do not acutely up-regulate hepatic D1 activity in the rainbow trout. Furthermore, neither hypothyroidism nor hyperthyroidism alter renal D1 activity in the tilapia *Oreochromis niloticus* (Mol *et al.*, 1999). However, despite the lack of effects upon hepatic D1 activity, the three hormones decreased D1 mRNA levels after 24 h of treatment. These findings were surprising since they are contrary to the regulatory pattern described for mammals. One feasible interpretation could be that D1 in the killifish does not deiodinate the inner ring of the iodothyronine, and thus the excess of substrate would result in a down-regulatory response of its transcription. In support of this interpretation is the observation of negligible IRD deiodination of T₃ and T₃S by D1 in tilapia renal microsomes (Sanders *et al.*, 1997). The fact that this decrease in D1 transcription is not reflected in the activity of the enzyme is intriguing. The longer D1 half-life (St. Germain, 1988; St. Germain and Croteau,

1989) may account in part for this discrepancy. Nevertheless, no effect has been found on hepatic D1 activity in T₄- or T₃- treated fish after up to 11 days of treatment (Finsson *et al.*, 1999; Mol *et al.*, 1999). Together, these results suggest that transcription of the killifish D1 gene displays a distinct response to substrate, being down-regulated during acute hyperthyroidism. This opposite D1 regulatory pattern has also been documented for tilapia liver, in which both D1 activity and mRNA were up-regulated during long-term hypothyroidism (Van der Geysen *et al.*, 2001).

D2 mRNA levels and enzymatic activity were similarly reduced in these experiments. In agreement with the well-described down-regulatory effect of T₄ and T₃ on D2 in mammalian species (Bianco *et al.*, 2002), hepatic D2 activity was more acutely regulated than D1 after immersion in T₄, T₃, or 3,5-T₂, exhibiting a significant

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

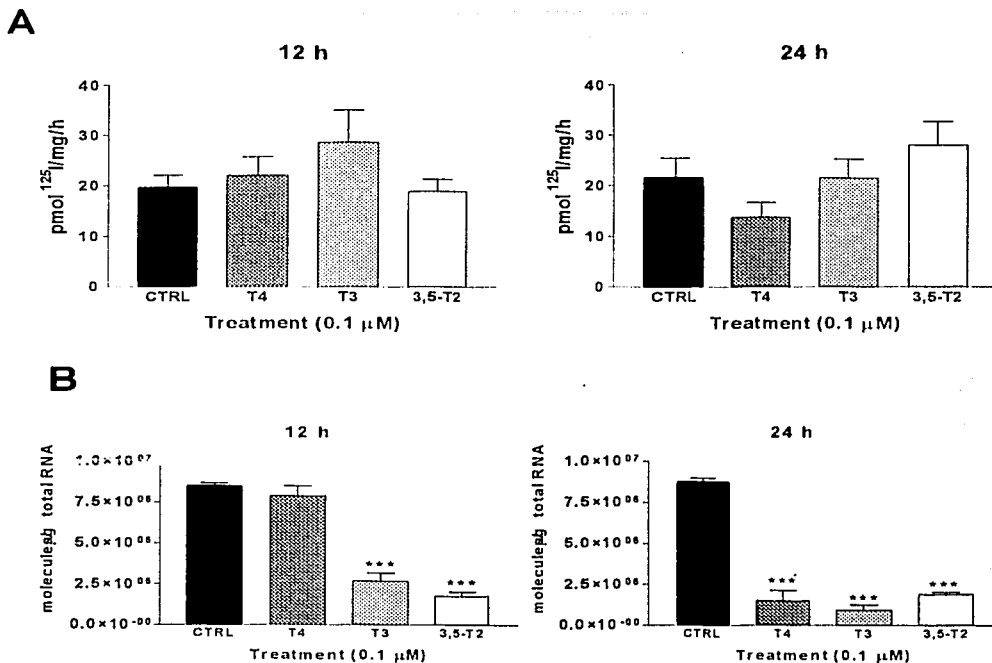


FIGURE 2. Effect of short term T₄-, T₃-, and 3,5-T₂-induced hyperthyroidism on killifish hepatic D1 ORD (A) activity (n = 5 ± S.E.M) and (B) mRNA expression (pooled livers, n = 5) after 12 or 24 h of exposure. For D1 activity determinations, assay conditions included 2 nM ¹²⁵I-rT₃, 200 nM rT₃ and 5 mM DTT. The protein concentration used was approximately 100 μg/tube. The assays were incubated for 1 h at 37 °C. Results are expressed as pmol ¹²⁵I/mg/h. For D1 mRNA quantitation, PCR conditions included cDNA reverse transcribed from 10 μg of total RNA, and a D1 competitor in concentrations ranging from 1 × 10³ to 1 × 10⁴ molecules/μl. Values were determined by densitometry of PCR fragments electrophoresed in a 3% agarose gel. Note that mean values were derived from multiple assays of pooled cDNA. Significance is indicated by *** (p < 0.001).

decrease after 24 h of immersion. Although the studies concerning iodothyronine D2 regulation in fish are scarce, they are all consistent with the present results. A reduction in hepatic T₄ ORD has been reported after administration of T₃-supplemented food as well as after fasting in the rainbow trout (Finsson *et al.*, 1999). Furthermore, T₄-induced hyperthyroidism also significantly lowers hepatic D2 in tilapia liver, while T₃-induced hyperthyroidism abolishes it (Mol *et al.*, 1999). It is important to note that the earlier hyperthyroidism studies were performed under longer terms

of treatment (7 and 11 days, respectively), whereas with the administration protocol used here we observed an effect upon D2 activity after 24 h of treatment. The effects upon transcription were evident earlier, with all three iodothyronines inducing a decrease in D2 mRNA levels after 12 h.

It has previously been documented that thyroid status controls D2 activity at both pre- and posttranslational levels in mammals (Bianco *et al.*, 2002). Indeed, the present results indicate that T₃- and T₄-

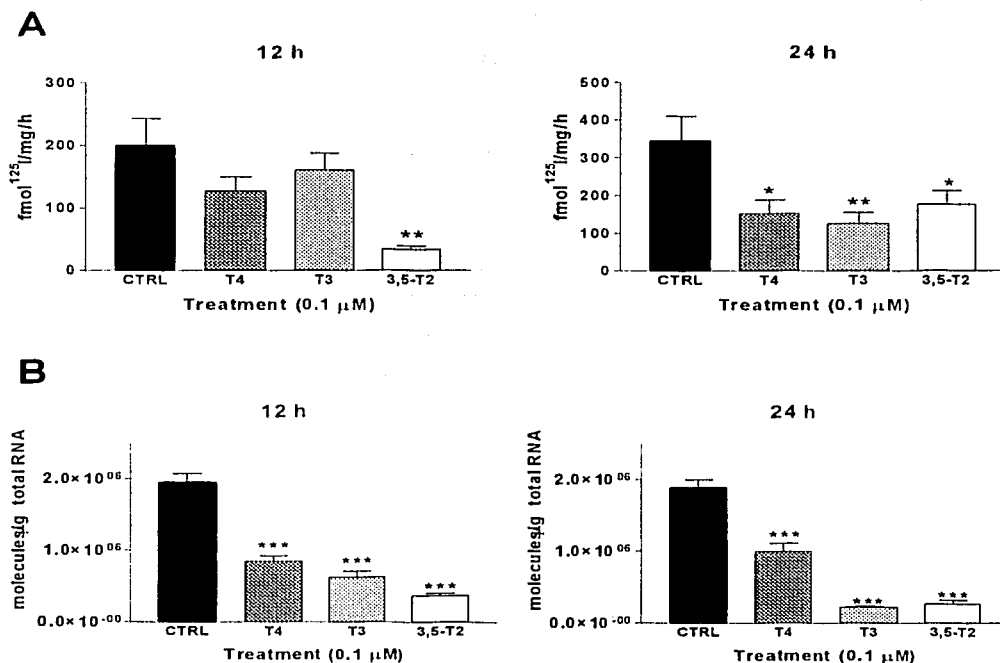


FIGURE 3. Effect of short term T₄-, T₃- and 3,5-T₂-induced hyperthyroidism on killifish liver D2 (A) activity (n = 5 \pm S.E.M) and (B) mRNA expression (pooled livers, n = 5) at 12 and 24 h post-exposure. For D2 activity determinations, assay conditions included 1 nM 125 I-T₄, 25 mM DTT and 1 mM PTU. The protein concentration used was approximately 100 μ g/tube. The assays were incubated for 1 h at 37 $^{\circ}$ C. Results are expressed as fmol 125 I/mg/h. Significance is indicated by * (p < 0.05) and ** (p < 0.01). For D2 mRNA quantitation, PCR conditions included cDNA reverse transcribed from 10 μ g of total RNA, and a D2 competitor in concentrations ranging from 1×10^9 to 1×10^4 molecules/ μ l. Significance is indicated by *** (p < 0.001).

induced regulation of D2 occurs at a pre-translational level. The experimental evidence that would support this hypothesis is: i) the decrease in hepatic D2 activity from T₄- and T₃-treated groups was preceded by a decrease in D2 mRNA at 12 h post-immersion, which remained low throughout the treatment; and ii) the apparent V_{max} values decreased in the treated groups, whereas the substrate affinity was not modified. This finding supports the notion of a decrease in transcription and/or an increase in protein degradation in response to acute administration of iodothyronines. In consonance with this scenario,

hypothyroidism in tilapia liver is accompanied by an increase in D2 activity and mRNA (Van der Geyten *et al.*, 2001). Furthermore, a role for pre-translational control of D2 regulation is strengthened by the observed T₃-induced suppression of D2 mRNA in pituitary tumor cells, which does not affect the short (2 h) D2 mRNA half life (Kim *et al.*, 1998). The molecular mechanisms that could explain the pre-translational D2 regulation by substrate have not been elucidated in mammalian or teleostean species. In this context, the presence of a negative TRE in the human *Dio2* 5'-flanking region has been inferred,

although it has not yet been identified (Bianco *et al.*, 2002). The mammalian *Dio2* gene also contains a cAMP responsive site (CRE) (Bartha *et al.*, 2000), which has not been found in the teleostean homologs (Orozco *et al.*, 2002b). Thus, available information suggests that while the final observed effects of iodothyronines on the D2 enzyme are similar in mammals and fish, the specific mechanisms of this regulation could differ.

The most novel aspect of our results resides in the unexpected potency exhibited by 3,5-T₂ on D1 mRNA and D2 activity and mRNA. Besides its well-established calorogenic mitochondrial actions (Goglia *et al.*, 1999), 3,5-T₂ has other thyromimetic effects that seem to be related to the type of regulation exerted by TH. Thus, 3,5-T₂ and not 3,3-T₂ seems to act at the same potency as T₃ in those functions down-regulated by TH; *i.e.*, inhibiting TSH secretion (Moreno *et al.*, 1998) and the expression of TR β 2 receptors (Ball *et al.*, 1997). In contrast, in the systems up-regulated by TH, the potency of 3,5-T₂ is up to 100-fold lower than that of T₃. Such is the case of the 3,5-T₂ stimulation of GH mRNA synthesis (Moreno *et al.*, 1998) and D1 activity (Baur *et al.*, 1997), and the increment that 3,5-T₂ exerts in oxygen consumption in rat hypothyroid hepatic cells (Horst *et al.*, 1989). This interpretation would be in agreement with the present results in which D2 activity and mRNA are rapidly and significantly decreased. Furthermore, the comparative potency of 3,5-T₂ in decreasing both D2 activity and D1 and D2 transcription suggests that this iodothyronine may indeed play a physiological role in teleost thyroidal systems. Although there has been no demonstration of *in vivo* conversion of T₃ to 3, 5-T₂ in teleosts, recent experimental evidence suggests that this conversion can occur in mammalian species (Moreno *et al.*, 2002). The effects of 3,5-T₂ on deiodinase regulation could be the consequence of an interaction of 3,5-T₂ with TH nuclear receptors (TR). To our knowledge, there is no available information on 3,5-T₂ affinity for

TR in fish. A very low binding of T₂s to mammalian liver and heart nuclei (Leeson *et al.*, 1998) has been reported, as well as a low affinity for the TR β 1 (Cheng *et al.*, 1994). Although the latency of the response is not an absolute indicator, it is considered to be one of the features that differentiate the nuclear from the extra-nuclear actions of iodothyronines (Goglia *et al.*, 1999). In this context, the rapid response elicited by 3,5-T₂ could suggest non-genomic effects. Further work is required to understand the mechanism of action of 3,5-T₂.

In summary, this is to our knowledge the first evidence of a potent and acute regulatory effect of 3,5-T₂ upon deiodinase transcription or enzymatic activity. These data suggest the possible role of T₃ as a precursor for a more bioactive iodothyronine. We propose that the ORD pathway in teleosts includes the generation of biologically active 3,5-T₂.

ACKNOWLEDGMENTS

We gratefully acknowledge Patricia Villalobos for her technical assistance. This work was partially supported by CONACYT grants 34311-N and PAPIIT IN 201202

REFERENCES

- Ball, S.G., Sokolov, J., Chin, W.W., 1997. 3,5-diiodo-L-thyronine (T2) has selective thyromimetic effects *in vivo* and *in vitro*. *J. Mol. Endocrinol.* 19, 137-147
- Bartha, T., Kim, S.W., Salvatore, D., Gereben, B., Tu, H.M., Harney, J.W., Rudas, P., Larsen, P.R., 2000. Characterization of the 5' flanking and 5'-untranslated regions of the cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-responsive human type 2 iodothyronine deiodinase gene. *Endocrinology* 140, 229-237

- Baur, A., Bauer, K., Jarry, H., Köhrle, J., 1997. 3,5-diiodo-L-thyronine stimulates type 1 5'-deiodinase activity in rat anterior pituitaries in vivo and in reaggregate cultures and GH3 Cells in vitro. *Endocrinology* 138, 3242-3248
- Bianco, A.C., Salvatore, D., Gereben, B., Berry, M.J., Larsen, P.R., 2002. Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases. *Endocrine Reviews* 23, 38-89
- Brown, C., Stetson, M., 1985. Photoperiod-dependent negative feedback effects of thyroid hormones in *Fundulus heteroclitus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 58, 186-191
- Cheng, S.Y., Ransom, S.C., McPhie, P., Bhat, M.K., Mixson, A.J., Wintraub, B.D., 1994. Analysis of the binding of 3,3',5-triiodo-L-thyronine and its analogues to mutant human beta 1 thyroid hormone receptors: a model of the hormone binding site. *Biochem.* 33, 4319-4326
- Eales, J.G., 1974. Creation of chronic physiological elevations of plasma thyroxine in brook trout, *Salvelinus fontinalis* (Mitchill) and other teleosts. *Gen. Comp. Endocrinol.* 22, 209-217
- Eales, J.G., 1985. The peripheral metabolism and regulation of thyroidal status in poikilotherms. *Can. J. Zool.* 63, 1217-1231
- Etkin, W., 1935. The mechanism of anuran metamorphosis pattern. *J. Exp. Zool.* 71, 217-240
- Finnson, K.W., McLeese, M., Eales, J.G., 1999. Deiodination and deconjugation of thyroid hormone conjugates and type I deiodination in liver of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 115, 387 - 397.
- Goglia, F., Moreno, M., Lanni, A., 1999. Action of hormones at the cellular level: the mitochondria target. *FEBS Letters* 452, 115-120
- Horst, C., Rokos, H., Seitz, H.J., 1989. Rapid stimulation of hepatic oxygen consumption by 3,5-diiodo-L-thyronine. *Biochem. J.* 261, 945-950
- Kim, S-W., Harney, J.W., Larsen, P.R., 1998. Studies of the hormonal regulation of type 2 5'-iodothyronine deiodinase messenger ribonucleic acid in pituitary tumor cells using semiquantitative reverse transcription-polymerase chain reaction. *Endocrinology* 139, 4895-4905
- Lanni, A., Moreno, M., Cioffi, M., Goglia, F., 1993. Effect of 3,3'- diiodothyronine and 3,5-diiodothyronine on rat liver mitochondria. *J. Endocrinol.* 136, 59-64
- Leary, S.C., Burton, K.N., Ballantyne, J.S., 1996. Direct effect of 3,5,3'-triiodothyronine and 3,5-diiodothyronine on mitochondrial metabolism in the goldfish *Carassius auratus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 104, 61-66
- Leeson, P.D., Ellis, D., Emmett, J.C., Shah, V.P., Showell, G.A., Underwood, A.H., 1988. Thyroid hormone analogues. Synthesis of 3'-substituted 3,5-diiodo-L-thyronines and quantitative structure-activity studies of *in vitro* and *in vivo* thyromimetic activities in rat liver and heart. *J. Med. Chem.* 31, 37-54
- Mol, K.A., Van der Geyten, S., Kühn, E.R., Darras, V.M., 1999. Effects of experimental hypo- and hyperthyroidism on iodothyronine deiodinases in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Fish Physiol. Biochem.* 20, 201-207
- Moreno, M., Lanni, A., Lombardi, A., Goglia, F., 1997. How the thyroid controls metabolism in the rat: different roles for triiodothyronine and diiodothyronines. *J. Physiol. (London)* 505, 529-538

- Moreno, M., Lombardi, A., Lombardi, P., Goglia, F., Lanni, A., 1998. Effect of 3,5-diiodo-L-thyronine on thyroid stimulating hormone and growth hormone serum levels in hypothyroid rats. *Life Science* 62, 2369-2377
- Moreno, M., Lombardi, A., Beneduce, L., Silvestri, E., Pinna, G., Goglia, F., Lanni, A., 2002. Are the effects of T3 on resting metabolic rate in euthyroid rats entirely caused by T3 itself? *Endocrinology* 143, 504-510
- Obregon, M.J., Morreale de Escobar, G., Escobar del Rey, F., 1978. Concentrations of triiodo-L-thyronine in the plasma and tissues of normal rats, as determined by radioimmunoassay: comparison with results obtained by an isotopic equilibrium technique. *Endocrinology* 103, 2145-53.
- O'Reilly, I., Murphy, M.P., 1992. Studies on the rapid stimulation of mitochondrial respiration by thyroid hormones. *Acta Endocrinol. (Copenh)* 127, 542-546
- Omeljaniuk, R.J., Eales, J.G., 1985. Immersion of rainbow trout in 3,5,3'-triiodothyronine (T3): effects on plasma T3 levels and hepatic nuclear binding. *Gen. Comp. Endocrinol.* 58, 81-88.
- Orozco, A., Ruíz-Juvera, A., Valverde-R, C., 1992. The importance of employing homologous serum free of thyronines in radioimmunoassays to assess circulating thyroid hormones in rainbow trout. *Boletín de Estudios Médicos y Biológicos* 1-4, 41-49
- Orozco, A., Silva, J.E., Valverde-R, C., 1997. Rainbow trout liver expresses two iodothyronine phenolic deiodinase pathways with the characteristics of mammalian types I and II 5'-deiodinases. *Endocrinology* 138, 254-258
- Orozco, A., Linser, P.J., Valverde-R, C., 2000. Kinetic characterization of outer-ring deiodinase activity (ORD) in the liver, gill and retina of *Fundulus heteroclitus*. *Comp. Biochem. Physiol. Part B.* 126, 283-290.
- Orozco, A., Villalobos, P., Valverde-R, C., 2002. Environmental salinity selectively modifies the outer-ring deiodinating activity of liver and kidney in the rainbow trout. *Comp. Biochem. Physiol. Part A.* 131, 387-395
- Orozco, A., Jeziorski, M.C., Linser, P.J., Greenberg, R.M., Valverde-R, C., 2002a. Cloning of the gene and complete cDNA encoding a type 2 deiodinase in *Fundulus heteroclitus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 128, 162-167
- Orozco, A., Villalobos, P., Jeziorski, M.C., Valverde-R, C., 2002b. The liver of *Fundulus heteroclitus* expresses deiodinase type 1 mRNA. *Gen. Comp. Endocrinol.* In press
- Pazos-Moura, C. C.; Moura, E.G., Dorris, M.L., Rehnmatk, S., Melendez, L., Silva, J.E., Taurog, A., 1991. Effect of iodine deficiency and cold exposure on thyroxine 5'-deiodinase activity in various rat tissues. *Am. J. Physiol.* 260 E, 175- 182.
- Sanders, J.P., Van der Geyten, S., Kaptein, E., Darras, V.M., Kühn, E.R., Leonard, J.L. and Visser, T.J., 1997. Characterization of a propylthiouracil-insensitive type I iodothyronine deiodinase. *Endocrinology* 138, 5153-5160
- St. Germain, D.L., 1988. Dual regulation of type 1 iodothyronine 5'-deiodinase in the rat kidney, liver and thyroid gland. Implications for the treatment of hyperthyroidism with radiographic contrast agents. *J. Clin. Invest.* 81, 1476-1484
- St. Germain, D.L., Croteau, W., 1989. Ligand-induced inactivation of type 1 iodothyronine 5'-deiodinase: protection by propylthiouracil *in vivo* and reversibly *in vitro*. *Endocrinology* 125, 2735-2744

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

Van der Geyten, S., Toguyeni, A., Baroiller, J.F., Fauconneau, B., Fostier, A., Sanders, J.P., Visser, T.J., Kühn, E.R., Darras, V.M., 2001. Hypothyroidism induces type I iodothyronine deiodinase expression in tilapia liver. *Gen. Comp. Endocrinol.* 124, 333 - 342.

Yamamoto, K., Kanski, D., Frieden, E., 1966. The uptake and excretion of thyroxine, triiodothyronine and iodine in bullfrog tadpoles after immersion or injection at 25 ° and 6°C. *Gen. Comp. Endocrinol.* 6, 312-324

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN