



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

**INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA**

**LA 3,5-T<sub>2</sub> COMO POSIBLE HORMONA  
TIROIDEA ACTIVA**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
**DOCTORA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

PRESENTA

M. en C. María Carlota García Gutiérrez

DIRECTORA DE TESIS: DRA. AUREA OROZCO RIVAS

*Campus Juriquilla, Querétaro.*

Enero 2009



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

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 54282

Proyecto PAPIIT IN 202807-19

Proyecto PAPIIT IN 218307-19

A Vic y Armando Eliseo por su amor y paciencia.

A Mary y Armando por todo.

*La ciencia es respecto del alma lo que es la luz respecto de los ojos, y si las raíces son amargas, los frutos son muy dulces.*

*Aristóteles*

## AGRADECIMIENTOS

A Aurea por depositar en mi su confianza. Por ser guía, maestra y amiga.

Al Doctor Carlos Valverde por todos sus consejos y críticas.

A los miembros del comité tutorial, Dra Carmen Clapp Jimenez y Dr. Andrés Quintanar, por acompañarme en mi camino de formación y por todos las valiosas aportaciones a este trabajo.

A los miembros del jurado, Dra. Patricia Joseph, Dra. Maricela Luna, Dra. Luz Navarro y Dra. Verónica Guarner por sus sugerencias y comentarios.

A todos los que han sido compañeros y amigos dentro del laboratorio, Paty, Angeles, Miguel, Lucia, JC, Lidia, Laurita, Arturo, Aurora.

A Leo y Carmen por su paciencia a mis veintemil dudas en la ciencia de la tramitología.

A Jose Nuñez por todo el apoyo dentro y fuera del laboratorio durante mi estancia en el Whitney Laboratory, Florida.

A Mary, Pati y Vic por su ayuda con mi pequeñin.

## ÍNDICE.

	Página
Resumen.	1
Abstract.	2
Introducción.	3
Antecedentes.	5
I. II. La glándula tiroides.	5
A. La glándula tiroides en los peces.	6
II. Las hormonas tiroideas.	7
A. E. Estructura química y características las HT.	10
III. Biosíntesis de las hormonas tiroideas.	11
IV. Control de la función tiroidea.	13
V. Transporte de las hormonas tiroideas.	17
A. Proteínas transportadoras en peces.	18
VI. Efectos de las HT.	19
A. Efectos sobre el metabolismo energético.	19
B. Efectos sobre el crecimiento.	20
C. Efectos sobre el desarrollo del SNC.	21
D. Efectos de las TH en peces.	22
VII. Mecanismo de acción de las TH.	22
A. Mecanismo genómico.	22
1. Autorregulación de los TR.	26
2. TR en peces.	27
B. Mecanismos no genómicos.	27
VIII. Metabolismo de las hormonas tiroideas.	28
A. Sulfoconjugación.	29
B. Glucoronidación.	30
C. Desaminación oxidativa.	31
D. Rompimiento del enlace éter.	32
E. Desyodación.	33
1. Desyodasa tipo 1 (D1).	37

a. Localización.	37
b. Función.	38
c. Características cinéticas.	39
d. Características moleculares.	40
e. Regulación.	41
2. Desyodasa tipo 2 (D2).	42
a. Localización.	42
b. Función.	42
c. Características cinéticas.	43
d. Características moleculares.	43
e. Regulación.	44
3. Desyodasa tipo 3. (D3).	45
a. Localización.	45
b. Función.	46
c. Características cinéticas.	47
d. Características moleculares.	47
e. Regulación.	47
IX. La 3,5-diyodotironina (3,5-T <sub>2</sub> ).	48
A. Evidencias de la bioactividad de la 3,5-T <sub>2</sub> .	50
1. Efectos sobre el metabolismo energético.	50
2. Otros efectos.	55
a. Efectos sobre las desyodasas.	56
Justificación.	58
Hipótesis.	59
Objetivos.	59
Material y métodos.	60
I. Animales.	60
II. Cuantificación de la concentración hepática de T <sub>3</sub> .	60
III. Cuantificación de la actividad desyodativa tipo 2.	61
IV. Cuantificación de la concentración de los mRNAs D2, GH, TRβ1 y Na,K-ATPasa α1.	61
A. Extracción del RNA.	61
B. Obtención de los cDNAs.	62
C. PCR competitivo para la cuantificación del mRNA D2.	62

D. PCR en tiempo real para la cuantificación de los mRNAs GH, TR $\beta$ 1 y Na,K-ATPasa $\alpha$ 1.	63
1. Clonación de los cDNAs	63
2. Preparación de las curvas estándar.	64
3. Cuantificación de los mRNAs GH, TR $\beta$ 1 y Na,K-ATPasa $\alpha$ 1.	65
V. Diseños experimentales.	65
A. Modelo de hipertiroidismo.	65
1. Curva dosis respuesta.	65
2. Curso temporal.	66
B. Modelo de hipotiroidismo farmacológico y reemplazo con hormonas tiroideas.	66
C. Modelo de hipotiroidismo secundario al reto hidroosmótico.	66
D. Modelo de hipotiroidismo por hipercortisolismo.	67
Resultados y discusión.	68
I. Modelo de hipertiroidismo.	68
II. Modelo de hipotiroidismo farmacológico y reemplazo con hormonas tiroideas.	69
III. Modelo de hipotiroidismo secundario al reto hidroosmótico.	74
IV. Modelo de hipotiroidismo por hipercortisolismo.	78
Conclusiones.	85
Referencias.	86
Abreviaturas	109
Anexos.	111
I. Control endocrino de la osmoregulación.	111
II. Producción.	127

García-G C, Jeziorski M, Valverde C y Orozco A. (2004). Effects of iodothyronines on the hepatic outer ring deiodinating pathway in killifish. *Gen. Comp. Endocrinol.* **135**, 201-209.

García-G C, López-Bojorquez LN, Nuñez J, Valverde-R C, Orozco A. (2007). 3,5-Diiodothyronine *in vivo* maintains euthyroidal expression of type 2 iodothyronine deiodinase, growth hormone, and thyroid hormone receptor  $\beta$ 1 in the killifish. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **293**, 877-883.



López-Bojórquez L, Villalobos P, García-G C, Orozco A y Valverde-R C. (2007) Functional identification of an osmotic response element (ORE) in the promoter region of the killifish deiodinase 2 gene (*FhDio2*). *J. Exp. Biol.* **210**, 3126-3132.

## RESUMEN

La desyodación de la prohormona tiroxina a la triyodotironina ( $T_3$ ) -yodotironina activa- es el paso determinante en la activación de las hormonas tiroideas (TH). La desyodasa tipo 2 (D2), enzima que cataliza esta conversión, es el principal tipo enzimático presente en el hígado del *Fundulus heteroclitus* (*Fh*) y es finamente regulada por las propias yodotironinas. Hasta hace pocos años, la 3,5-diyodotironina ( $3,5-T_2$ ), TH que se genera a partir de la desyodación de la  $T_3$  a través de esta vía enzimática, había sido considerada un catabolito. Sin embargo, estudios recientes han mostrado que la  $3,5-T_2$  tiene efectos no genómicos específicos sobre la respiración celular en la mitocondria. Se sabe poco sobre los posibles efectos genómicos de la  $3,5-T_2$ . En estudios previos mostramos que dosis suprafisiológicas (100 nM) de  $T_3$  y  $3,5-T_2$  inhiben tanto la actividad D2 como la concentración de su mRNA en el hígado del *Fh*, sugiriendo un efecto de la  $3,5-T_2$  a nivel transcripcional. Actualmente nuestro interés es investigar la bioactividad de la  $3,5-T_2$  a dosis de reemplazo (30 nM) en peces (*Fh* machos adultos, ~4 g) hipotiroideos, comparándola con la misma dosis de  $T_3$  ó  $rT_3$ . Con este fin se utilizaron tres distintos modelos de hipotiroidismo: uno farmacológico administrando la droga antitiroidea, metimazol (MMI 4.5 mM por 5 días), y dos fisiológicos, uno secundarios a un reto hidroosmótico (50% agua salada por 12 h) y el segundo secundario a hipercortisolismo (25  $\mu\text{g/g}$  por 48 h). Previamente habíamos observado que ambos modelos inducían la activación de la D2 hepática semejante a lo esperado ante un estado hipotiroideo (Orozco *et al.*, 1998; López-Bojórquez *et al.*, 2007). Bajo estas condiciones nosotros esperábamos que, de ser bioactiva, la  $3,5-T_2$ , al igual que la  $T_3$ , revertiría los efectos clásicos del hipotiroidismo. Nuestros resultados muestran que la  $3,5-T_2$ , al igual que  $T_3$ , cancela el incremento de la D2 provocado por el hipotiroidismo. En contraste, la hormona inactiva  $rT_3$ , no mostró dicho efecto. Más aún, la  $3,5-T_2$ , al igual que la  $T_3$ , mantiene en niveles eutiroideos la concentración del mRNA de otros genes TH-dependientes como lo son el de la hormona de crecimiento y el del receptor a hormonas tiroideas  $\beta_1$ . En conjunto nuestros resultados respaldan la noción de que la  $3,5-T_2$  es una yodotironina activa capaz de conservar la expresión eutiroidea de distintos genes tironino-dependientes.

## ABSTRACT.

Iodothyronine deiodination is the main determinant of thyroid hormone (TH) bioactivity. D2 is the major enzymatic type expressed in the killifish liver. It serves the outer-ring deiodinating pathway and is tightly down-regulated by TH. Until recently, 3,5-diiodothyronine (3,5-T<sub>2</sub>) has been considered an inactive by-product of triiodothyronine (T<sub>3</sub>) deiodination. However, studies from several laboratories have shown that 3,5-T<sub>2</sub> has specific, nongenomic effects on mitochondrial oxidative capacity and respiration rate that are distinct from those due to T<sub>3</sub>. Nevertheless, little is known about the putative genomic effects of 3,5-T<sub>2</sub>. We have previously shown that hyperthyroidism induced by supraphysiological doses of 3,5-T<sub>2</sub> (100 nM) inhibits hepatic iodothyronine deiodinase type 2 (D2) activity and lowers mRNA levels in the killifish in the same manner as T<sub>3</sub>, suggesting a pretranslational effect of 3,5-T<sub>2</sub> (Garcia-G *et al.*, 2004). The question remains as to whether 3,5-T<sub>2</sub> would have effects under conditions similar to those that are physiological for T<sub>3</sub>. To this end, intact killifish were rendered hypothyroid in three different ways: pharmacologically by administering methimazole (MMI 4.5 nM for 5 days) and physiologically as the result of a hidroosmotic challenge (50% sea water for 12 h) or secondary to hypercortisolism (25 µg/g for 48 h). Previous data have shown that both physiological manipulations up-regulated the D2 pathway as observed in hypothyroidism (Orozco *et al.*, 1998; López-Bojórquez *et al.*, 2007). In all cases, groups of hypothyroid animals simultaneously received 30 nM of either T<sub>3</sub>, reverse T<sub>3</sub>, or 3,5-T<sub>2</sub>. Under these conditions it was expected that, if it were bioactive, 3,5-T<sub>2</sub> would mimic T<sub>3</sub> and reverse the compensatory up-regulation of D2 and thyroid hormone receptor β1 (TRβ1), as well as the down-regulation of growth hormone (GH), regulatory responses that characterize hypothyroidism. Our results demonstrate that 3,5-T<sub>2</sub> is indeed bioactive, maintaining euthyroidal hepatic expression of D2, TRβ1 as well as GH during a hypothyroidal state. Taken together, these results add further evidence to support the notion that 3,5-T<sub>2</sub> is a bioactive iodothyronine.

## INTRODUCCIÓN.

Las hormonas tiroideas (HT) o yodotironinas son una familia de mensajeros endocrinos yodados que están presentes en todos los vertebrados. La glándula tiroidea sintetiza y secreta principalmente  $T_4$ , cuya desyodación secuencial genera el resto de las HT. De esta desyodación se genera la 3,5,3'-triyodotironina o  $T_3$ , la cual es hasta 20 veces más afín a los receptores nucleares de yodotironinas (TR) y es considerada la hormona tiroidea activa (Muñoz y Bernal, 1997). La desyodación de las yodotironinas está catalizada por una familia de selenoenzimas, las desyodasas D1, D2 y D3. Estas enzimas se consideran un eslabón más en la regulación del eje hipotálamo-hipófisis-tiroidea, ya que de ellas depende la bioactividad de las HT a nivel celular. Además, la actividad de las desyodasas es órgano-específica y está finamente regulada por el estado tiroideo del organismo (Bianco *et al.*, 2002).

Durante la última década ha aumentado el interés por estudiar los posibles efectos tiromiméticos de otras yodotironinas (3,5- $T_2$ , 3,3'- $T_2$  y 3',5'- $T_2$ ). Así, se ha encontrado que la 3,5- $T_2$ , generada por la desyodación del anillo externo de la  $T_3$  es un mediador periférico de la respiración celular en la mitocondria. Los efectos de la 3,5- $T_2$  son distintos a aquellos atribuidos a  $T_3$  y no se atenúan al inhibir la síntesis proteica. Esto, aunado al hecho de que los efectos de la 3,5- $T_2$  pueden ser más rápidos que los efectos de  $T_3$ , ha sugerido que esta tironina actúa a través de mecanismos no dependientes de TR, sin embargo dichos mecanismos aún no han sido dilucidados (Goglia, 2005; Lombardi *et al.*, 2006).

Nuestro interés es el de caracterizar los efectos biológicos de la 3,5- $T_2$ . Para ello analizamos si la 3,5- $T_2$  es capaz de regular a la D2, enzima que cataliza la vía enzimática a través de la cual se genera esta HT. Es bien conocido que cambios discretos en el estado tiroideo del organismo modifican tanto la expresión del mRNA D2 como la actividad de la enzima. Existen problemas metodológicos para estudiar a la D2 en mamíferos debido a su baja expresión. Sin embargo, recientemente nuestro laboratorio descubrió que en contraste con el resto de los vertebrados, el hígado del teleosteo *Fundulus heteroclitus* (*Fh*)

expresa abundantemente (40 veces más vs. SNC de rata) la actividad D2. Esta enzima exhibe características bioquímicas y moleculares comparables a la D2 de mamíferos (Orozco *et al.*, 2000; Orozco *et al.*, 2002a; Valverde-R *et al.*, 1997) lo que convierte al hígado del *Fh* en un modelo ideal para el estudio de la regulación de esta enzima. Valiéndonos de este modelo, previamente encontramos que la D2, además de ser regulada a la baja por dosis farmacológicas de T<sub>3</sub> y T<sub>4</sub>, es regulada en la misma forma por una dosis similar de 3,5-T<sub>2</sub> (García-G *et al.*, 2004). Estos resultados sugerían que si 3,5-T<sub>2</sub> era capaz de regular a la D2, enzima que regula finamente el estado tiroideo de las células que la expresan, entonces la 3,5-T<sub>2</sub> podría ser reconocida por la célula blanco como una HT activa, capaz de regular la expresión de otros genes clásicamente tironino-dependientes. Así, la presente tesis fue diseñada para estudiar el efecto de la 3,5-T<sub>2</sub> sobre genes típicamente descritos como responsivos a HT. Se escogió al gen que codifica para la hormona del crecimiento (GH), un gen regulado a la alta por el estado tiroideo. Además, se estudió la regulación de dos genes regulados a la baja por HT, los genes que codifican para la D2 y para el receptor a hormonas tiroideas tipo beta 1 (TRβ1). Por último, para verificar que el efecto de la 3,5-T<sub>2</sub> es exclusivo a los genes dependientes de HT, se incluyó en el estudio un gen que no se modifica por el estado tiroideo, el gen que codifica para la subunidad α1 de la Na,K-ATPasa (Na,K-ATPasa α1). Además, y ya que nuestro interés es demostrar el posible papel fisiológico de la 3,5-T<sub>2</sub>, se utilizaron 3 distintas manipulaciones experimentales tanto farmacológicas, como fisiológicas para inducir hipotiroidismo con el fin de restablecer la expresión eutiroidea de los distintos genes con el reemplazo con 3,5-T<sub>2</sub>.

## ANTECEDENTES.

### I. LA GLÁNDULA TIROIDES.

Las HT son sintetizadas y secretadas por la glándula tiroides. La glándula tiroides es peculiar entre los órganos endocrinos por ser la única especializada en la captura, organificación y almacenamiento del yodo. Se localiza, con escasas excepciones, en la región faríngea anterior al cartilago cricoides. La forma de la glándula varía en las diferentes clases de vertebrados (Fig. 1).

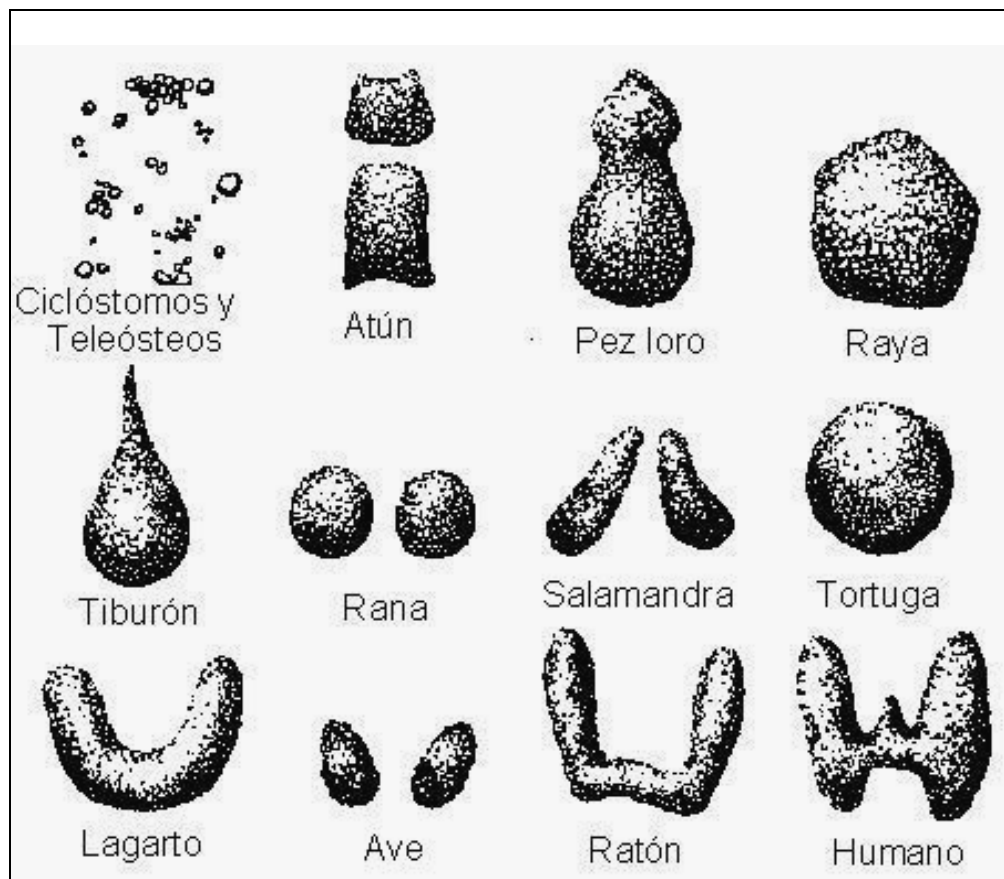


Figura 1. Morfología de la glándula tiroides en distintos vertebrados (Modificada de Gorbman *et al.*, 1983).

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 (Fig. 2). El folículo consiste en una estructura esférica formada por una capa de células epiteliales altamente especializadas denominadas tirocitos o células foliculares que rodea a un

espacio extracelular relleno de un gel de proteínas (coloide) en donde se pueden almacenar grandes cantidades de HT.

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  $T_4$  y  $T_3$ . 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 exócrinos. 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 (Capen, 2000; Mc Nabb, 1992).

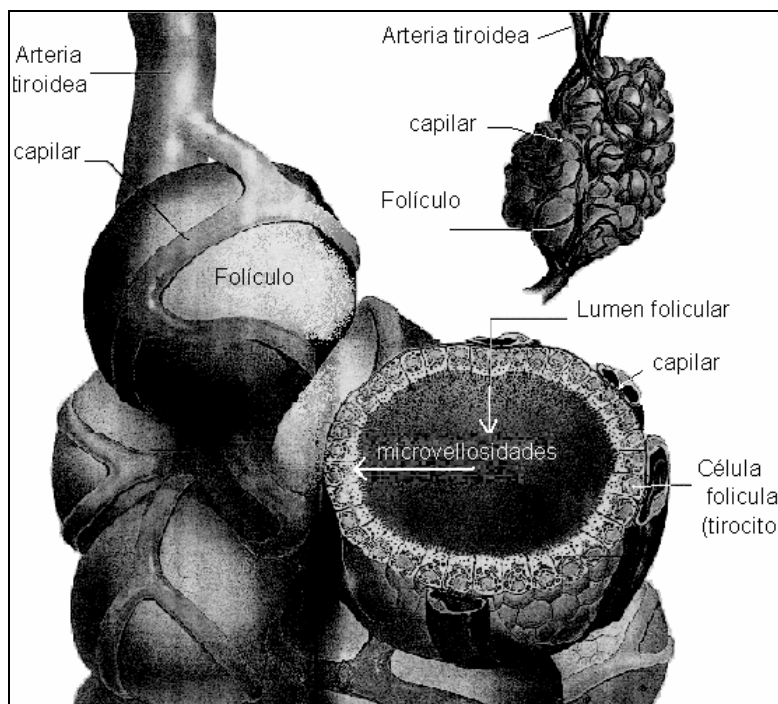


Figura 2. Folículo tiroideo, unidad funcional de la glándula tiroidea. Destacan las células foliculares y el lumen folicular, en el cual se encuentra el coloide (modificada de Matsumoto y Ishii, 1992).

### A. LA GLANDULA TIROIDES EN LOS PECES.

Aún cuando en los teleósteos no se encuentra una glándula propiamente formada, su glándula comparte las principales características funcionales con el resto de los vertebrados: los folículos tiroideos son su unidad funcional; los

folículos tienen la capacidad de atrapar y organificar el yodo; y la composición de aminoácidos de la tiroglobulina es similar a la de los mamíferos. 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; Matty, 1985). A diferencia del resto de los vertebrados, la glándula tiroidea de los peces secreta primordialmente  $T_4$  tanto fisiológicamente, como en respuesta a la estimulación por TSH *in vivo* e *in vitro* (Chan y Eales, 1976; Grau *et al.*, 1986; Milne y Leatherland, 1980; Swanson *et al.*, 1988; Inui *et al.*, 1989). Además, extractos tiroideos de trucha y otros teleósteos contienen niveles indetectables de  $T_3$  (Kühn *et al.*, 1993).

## **II. LAS HORMONAS TIROIDEAS.**

Las hormonas tiroideas (HT) o yodotironinas son una familia de mensajeros endocrinos cuya característica distintiva es el contener yodo (I) en su molécula. Las HT participan en distintos procesos biológicos para mantener un estado general de bienestar actuando -de manera directa o en cooperación con otras hormonas- prácticamente en todos los tejidos del organismo de los vertebrados. Las acciones de las HT abarcan una amplia gama de funciones (tabla 1) que incluyen el crecimiento y la diferenciación, el metabolismo energético, la reproducción y particularmente el desarrollo y maduración del sistema nervioso central (SNC). Además, participan en funciones adaptativas especie-específicas como son la migración y la osmorregulación en peces, la metamorfosis en anfibios, la muda de piel en los reptiles, la calorigénesis y la conducta migratoria en las aves. La mayoría de la información referente a los efectos biológicos de las HT se ha generado en los mamíferos, especies en donde se sabe que juegan un papel importante en el balance metabólico, el consumo de oxígeno y la calorigénesis (Norris, 1985).



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

FUNCIÓN	EFECTO	GENES REGULADOS
Calorigénesis	↑ glucólisis y consumo de oxígeno. Síntesis de agentes desacoplantes en la grasa parda (UCP). Sinergismo con catecolaminas	↑ UCP 1, 2 y 3; bomba Na,KATPasa (subunidad $\alpha$ y $\beta$ ).
Vitaminas	Participan en la síntesis de la vitamina A. ↑ demanda de otros componentes del complejo B. ↓ fosforilación de la tiamina.	
Crecimiento y diferenciación celular	↑ Crecimiento somático. Maduración del sistema nervioso Osificación epifisiaria.	↑ <b>GH</b> .
Sistema nervioso Central	Esenciales en el desarrollo y maduración neuronal. Modulan la velocidad de conducción-excitación y los patrones de conducta.	↑ $\beta$ 5-tubulina; NGF; Taka; ROR $\alpha$ ; CAMK-IV; PCP-2; COX-1; laminina; RC3. ↓ Tenascina C; NCAM; L1; SWAP; p75LNGFR; TOM M70A; $\alpha$ 1 y $\beta$ 2 tubulina; etc.
Carbohidratos	↑ absorción y utilización de glucosa, glucogenólisis. Degradación de insulina.	↑ PEPCK; G6P; GLUT4.
Corazón	Efecto inotrópico y cronotrópico. Sinergismo con catecolaminas.	↑ $\alpha$ -miosina (cadena pesada); SERCA; receptores $\beta$ adrenérgicos. ↓ $\beta$ -miosina (cadena pesada).
Lípidos	↑ Síntesis, degradación y excreción de colesterol y ácidos biliares.	↑ Enzima málica; proteína S14; Carbonil reductasa; FATP.
Hematopoyesis	Participan en la síntesis de hemoglobina.	↑ globina (subunidades $\alpha$ y $\beta$ ).

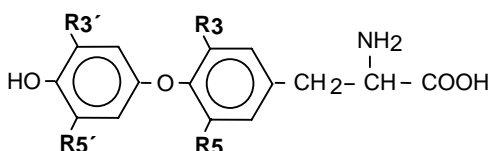
Proteínas Músculo	Anabolismo y catabolismo. ↓ Conversión de creatinina a fosfocreatinina	↑ MBP. ↓ Actina y creatincinasa.
Metabolismo hidroelectrolítico	↑ Filtración glomerular y diuresis extracelular de sodio	↑ Na,K-ATPasa (subunidades $\alpha$ y $\beta$ ); intercambiador $\text{Na}^+/\text{H}^+$
Hipotálamo / Hipófisis	Regulan la síntesis y secreción de TRH, TSH, GH, FSH, LH y PRL.	↑ <b>GH</b> ↓ TRH; TSH (subunidad $\alpha$ y $\beta$ ); PRL.
Reproducción	Gónada: necesarias para la diferenciación. Glándula mamaria: esenciales para la diferenciación funcional de primordios alveolares. Forman parte del complejo galactopoyético.	
Tubo digestivo	Regulan la velocidad del tránsito intestinal. Aumentan la absorción de vitamina B12 y ácido fólico.	↑ Na,K-ATPasa (subunidad $\alpha$ y $\beta$ ); Fosfatasa alcalina. ↓ lactasa.

En donde: ↑, aumento o estimulación; ↓, disminución o inhibición; TSH, hormona estimulante de la tiroides; GH, hormona del crecimiento; FSH, hormona foliculo estimulante; LH, hormona luteinizante; PRL, prolactina; UCP, proteína desacoplante; NGF, factor de crecimiento neuronal; Taka, receptor a tirosina cinasa A; ROR $\alpha$ , receptor nuclear huérfano alfa; CAMK-IV, protein cinasa dependiente de calmodulina; PCP-2, proteína de las células de Purkinje tipo 2; COX-1, ciclooxigenasa tipo 1; RC3, neurogranina; NCAM, molécula de adhesión a células neuronales; L1; SWAP, proteína asociada al "switch"; p75LNGFR, receptor a neurotrofina de baja afinidad; TOM M70A, homologo 70<sup>a</sup> de la translocasa de la membrana mitocondrial interna; SERCA, ATPasa dependiente de calcio del retículo sarcoplásmico; PEPCK, fosfoenol piruvato carboxicinasa; G6P, glucosa-6-fosfatasa; MBP, proteína que une miosina; FATP, proteína transportadora de ácidos grasos. (Tomada de: Solís-S y Valverde-R, 2006).

## A. ESTRUCTURA QUÍMICA Y CARACTERÍSTICAS DE LAS HT.

La estructura química de las HT es homóloga en todos los vertebrados y se caracteriza por contener yodo (Fig. 3). Consiste en dos anillos bencénicos unidos por un enlace éter, derivados del aminoácido tirosina,. El anillo interno o tirosilo conserva el residuo alanina característico de la tirosina. El anillo externo o fenilo contiene un grupo hidroxilo en el carbono 4. Los átomos de yodo en las moléculas de las HT se pueden localizar en las posiciones 3 y 5 de ambos anillos en número máximo de 4.

### Núcleo de la Tironina



Nombre común	Símbolo	Substituyentes				Nombre sistemático
		R <sub>3</sub>	R <sub>3'</sub>	R <sub>5</sub>	R <sub>5'</sub>	
Tiroxina	T <sub>4</sub>	I	I	I	I	3,3',5,5'-Tetra-yodo-L-tironina
Triyodotironina	T <sub>3</sub>	I	I	I	H	3,3',5-Tri-yodo-L-tironina
Triyodotironina reversa	rT <sub>3</sub>	I	I	H	I	3,3',5'-Tri-yodo-L-tironina
3, 5 –Tironina	3,5-T <sub>2</sub>	I	H	I	H	3,5-Di-yodo-L-tironina
3, 3'-Tironina	3,3'-T <sub>2</sub>	I	I	H	H	3,3'-Di-yodo-L-tironina
3',5'-Tironina	3',5'-T <sub>2</sub>	H	I	H	I	3',5'-Di-yodo-L-tironina

Figura 3. Estructura general de las yodotironinas y principales miembros de la familia. La tabla resume la nomenclatura de las principales tironinas de acuerdo a la posición de los substituyentes de yodo. Modificado de Valverde-R *et al*, 2004

Las yodotironinas más reconocidas son la tetrayodotironina, la triyodotironina y su isomero la triyodotironina reversa. La 3,5,3',5'-tetrayodotironina o tiroxina (T<sub>4</sub>) que es la hormona que presenta 4 átomos del yodo. La T<sub>4</sub>, tiene una vida media (t<sub>1/2</sub>) circulante de aproximadamente una semana, únicamente se sintetiza en la glándula

tiroides y es el producto mayoritario de su secreción. Las otras yodotironinas circulantes se generan por la desyodación secuencial de la  $T_4$ . Por ésta característica y por el hecho que presenta poca bioactividad se ha considerado a la  $T_4$  como una prohormona precursora de la 3,5,3'-triyodotironina ( $T_3$ ). La  $T_3$  puede ser secretada por la glándula tiroides en cantidades limitadas (15 a 20% de la secreción tiroidea) y la mayoría se forma en los tejidos extratiroideos por la acción de una desyodasa que provoca la pérdida de un ión yoduro ( $I^-$ ) del anillo fenilo de la  $T_4$ . La  $T_3$  tiene una  $t_{1/2}$  circulante aproximada de un día, presenta la mayor afinidad a los receptores específicos a HT y es considerada la hormona biológicamente activa. La 3,3',5'-triyodotironina ( $rT_3$ ), un isómero de la  $T_3$  que es secretada en pequeñas cantidades por la glándula tiroides, se produce principalmente en los tejidos extratiroideos por la pérdida de un ión yoduro del anillo interno de la  $T_4$ . La  $rT_3$  tiene una  $t_{1/2}$  en circulación de alrededor de una hora y no se le conoce actividad biológica (Escobar *et al.*, 1999).

### **III. BIOSÍNTESIS DE LAS HORMONAS TIROIDEAS.**

La biosíntesis de las hormonas tiroideas se lleva a cabo en el folículo tiroideo con la participación de distintas proteínas encargadas del transporte, organificación y reciclamiento del yodo (Fig. 4). El primer paso consiste en la captura de yodo mediante un proceso de transporte activo que ocurre en la región basolateral del tirocito y que es mediado por el simporter  $Na^+/I^-$  (NIS). El NIS es una glicoproteína integral de membrana que responde a TSH transportando al yodo en contra de su gradiente electroquímico (Carrasco, 1993). Posteriormente el  $I^-$  es translocado del citoplasma hacia el coloide, a través de la membrana apical. Se ha propuesto la presencia de dos proteínas transportadores del  $I^-$  en el borde apical: el transportador  $Cl^-/I^-$  ó pendrina y el AIT ó transportador apical de yodo (Scott *et al.*, 1999; Rodriguez *et al.*, 2002). Por otra parte, la Tg sintetizada por el tirocito es transportada vectorialmente hacia el borde apical.

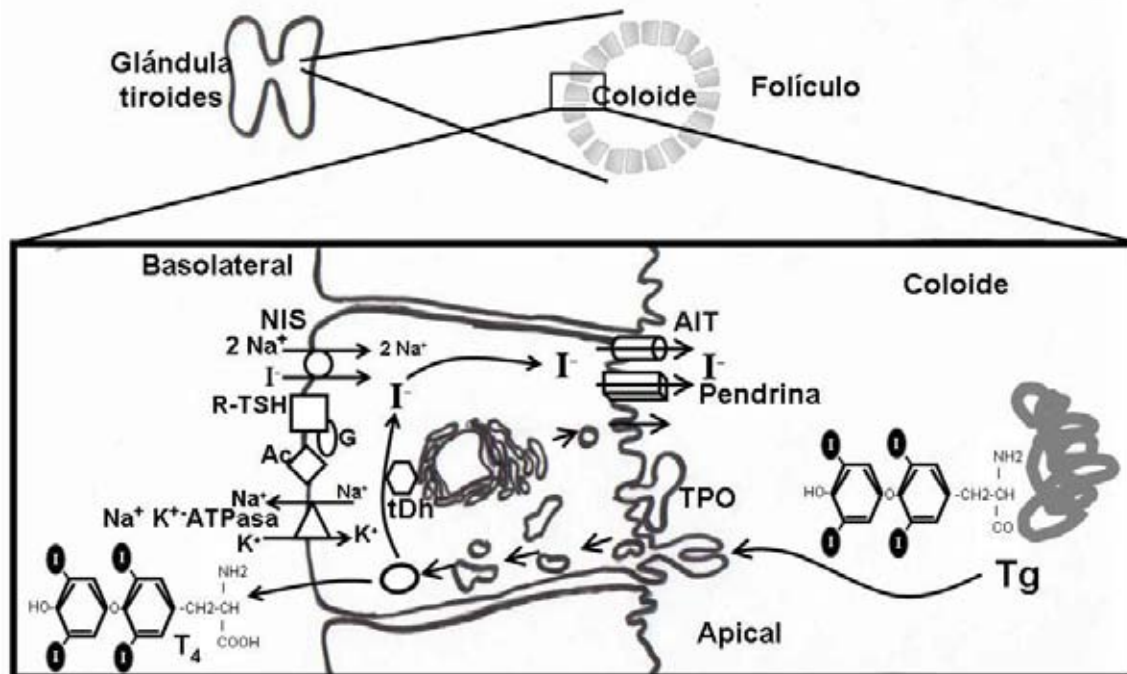


Figura 4. Representación esquemática de la vía de biosíntesis de las hormonas tiroideas en el folículo tiroideo. El lado izquierdo de la figura representa la superficie basolateral de la célula mientras que en el lado derecho se esquematiza la porción apical. Circulo, transporte activo de  $I^-$  hacia el interior del tirocito, mediado por el NIS (Simporter  $Na^+/I^-$ ); triangulo,  $Na^+, K^+$ -APTasa; cuadrado, receptor a TSH; rombo, adenilato ciclasa; elipse, proteína G; cilindro y cubo, transporte de  $I^-$  hacia el coloide; hexágono, desyodación de los residuos de tirosina yodada catalizada por la deshalogenasa tiroidea; TPO, tiroperoxidasa. AIT, transportador apical de  $I^-$ . Las flechas en dirección a la superficie basolateral indican la endocitosis de la Tg yodada la cual es hidrolizada por fagolisosomas con la subsecuente liberación y secreción de las HT y liberación de residuos de tirosina yodados que son desyodados (hexágono) por la deshalogenasa tiroidea (tDh) para el reciclamiento del  $I^-$  (Modificada de Dohán *et al.*, 2003).

A lo largo de esta vía de transporte, la Tg se pliega y dimeriza, y es glucosilada, fosforilada y sulfatada. En la interfase célula-coloide el ión yoduro ( $I^-$ ) es oxidado a “yodonio” ( $I^+$ ) o ácido hipoyodoso (HIO), una forma reactiva capaz de unirse o “yodar” a los residuos de tirosina presentes en la Tg. Esta yodación resulta en la síntesis de los yodoaminoácidos: monoyodotirosina o MIT y diyodotirosina o DIT. Esta compleja serie de reacciones se denomina organificación del  $I^-$  y es catalizada por la tiroperoxidasa ó TPO (Taurog, 1970). La actividad de la TPO puede ser bloqueada farmacológicamente por el 6-n-propil-2-tiouracilo (PTU) y por el 1-metil-2-mercaptoimidazol o metimazol (MMI). El acoplamiento de los yodoaminoácidos, catalizado también por la TPO, da origen a la  $T_4$  y a la  $T_3$ , yodotironinas hormonalmente activas (Fig. 5). El coloide puede almacenar grandes cantidades de HT en forma de Tg yodada. En respuesta a una demanda de HT, la Tg yodada es endocitada. La liberación de las yodotironinas entraña dos reacciones

adicionales: la hidrólisis de la tiroglobulina y la desyodación de los residuos de tirosina. La tiroglobulina es hidrolisada en los lisosomas, por acción de 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. Estas últimas son desyodadas por la deshalogenasa tiroidea, rescatándose la mayor parte del yoduro libre resultante para su posterior reutilización (Solis-S *et al.*, 2004). Todos los pasos de la biosíntesis de las HT son regulados por la hormona estimulante de la tiroides (TSH) (Dohán *et al.*, 2003).

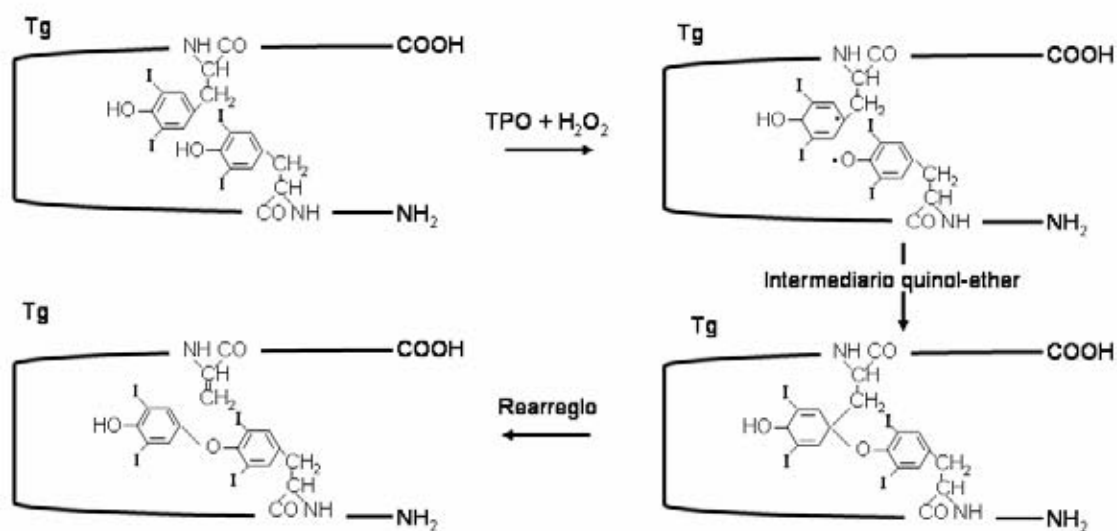


Figura 5. Acoplamiento de dos diyodotirosina de la molecula de Tg, para la formación de la tiroxina intramolecularmente (Modificada de Taurog, 2000)..

#### 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” (EHHT) (Fig. 6). 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 TSH. La TSH estimula en la glándula tiroides tanto la producción como la liberación de las HT. Finalmente, a nivel periférico, la desyodación órgano-específica

de las yodotironinas determina la concentración intracelular de la hormona activa e inactiva. 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, los efectos directos del sistema nervioso simpático y parasimpático, así como el efecto de otras hormonas. (Mc Nabb, 1992).

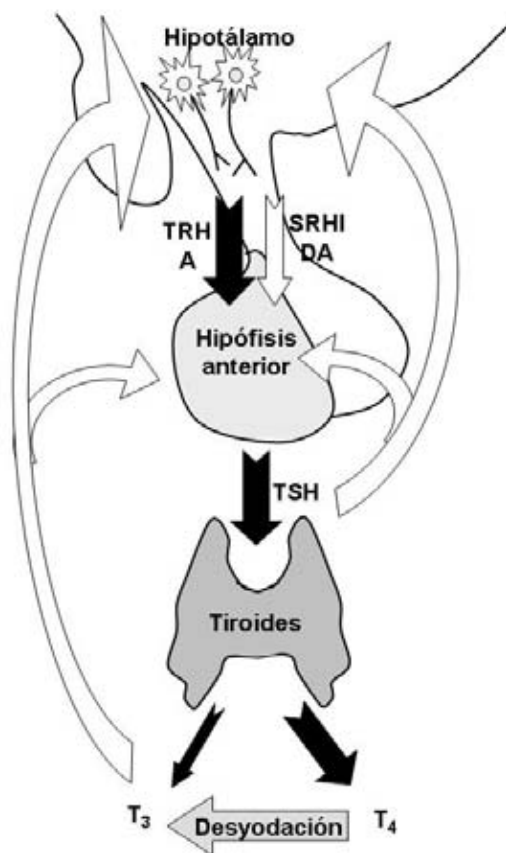


Figura 6. Control de la función tiroidea. Se muestran con flechas negras las vías de estimulación, y con flechas blancas las vías de inhibición y/o retroalimentación negativa. TRH: Hormona liberadora de tirotropina; A: vías adrenérgicas; SRHI: Somatostatina; DA: dopamina; TSH: hormona estimulante de tiroides o tirotropina; T<sub>4</sub>: tiroxina; T<sub>3</sub>: triyodotironina.

La TRH es el principal regulador positivo de la TSH. La TRH es producida como una preprohormona, la cual contiene 5 copias de la TRH en la rata y el ratón, mientras que el de humano posee 6 copias y el de *Xenopus* presenta 4 (Fuse *et al.*, 1991; Lechan *et al.*, 1986; Richter *et al.*, 1984; Yamada *et al.*, 1990). La molécula de TRH madura es un tripéptido (piroGlu-His-Pro-NH<sub>2</sub>) que resulta de la escisión de

aminoácidos básicos que rodean al tripéptido por las proconvertasas PC1 y PC2, y la carboxipeptidasa E, y su estructura esta conservada en los vertebrados y no tiene especificidad filogenética (Sanchez *et al.*, 1997; Schaner *et al.*, 1997). Las neuronas productoras de TRH se encuentran en el núcleo paraventricular así como el área preóptica, anterior, lateral, los cuerpos mamilares, dorsomedial, supraóptico y supraquiasmático del hipotálamo. Reciben estímulos de la circulación, así como de otras regiones del hipotálamo y el tallo cerebral. Desde ahí proyectan sus axones hacia la eminencia media, donde se secreta la TRH madura, directamente hacia la circulación portal, difundiendo hacia la adenohipófisis donde se pone en contacto con sus receptores en los tirotrópos. Los receptores de TRH se encuentran en la membrana plasmática de los tirotrópos y pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G. Se han identificado 2 receptores, TRH-R1 y TRH-R2 (Duthie *et al.*, 1993; Matre *et al.*, 1993). La TRH es rápidamente degradada en plasma por una enzima ectopeptidasa con alta especificidad llamada piroglutamil aminopeptidasa II. La actividad de esta enzima depende del estado tiroideo del organismo, resultando en una vida media corta de aproximadamente 2 a 6 minutos, en animales hipertiroideos e hipotiroideos, respectivamente (Schomburg y Bauer, 1995; Charli JL *et al.*, 1998). La TRH tiene un efecto directo dosis-dependiente sobre la síntesis y liberación de TSH por la hipófisis, estimulando su síntesis al promover la transcripción y traducción de las subunidades que la conforman. El mecanismo de síntesis involucra al receptor TRH-R1 promoviendo la entrada de calcio y activación de la proteincinasa C y es modulado por el AMPc y el factor transcripcional hipofisiario específico, Pit-1. Las HT regulan la actividad de TRH a tres niveles: por una parte inhiben los niveles del mRNA de TRH en el núcleo paraventricular actuando a través del receptor a HT tipo  $\beta_2$ ; además estimulan la actividad de las enzimas que degradan a la TRH en la adenohipófisis; y por último las HT también modulan la expresión génica del receptor a TRH (Scanlon y Toft, 2000; Wondisford *et al.*, 2000; Lechan y Fekete, 2005; Abel *et al.*, 2001; Bauer *et al.*, 1999).

La somatostatina o SRHI, la principal hormona inhibidora de la secreción de hormona del crecimiento (GH) es también un importante inhibidor de la secreción de TSH. Las neuronas hipotalámicas que la producen se ubican principalmente en la región periventricular anterior. La SRHI es secretada en dos formas que reciben su nombre en base al número de aminoácidos que lo forman: somatostatina 14 y



somatostatina 28. Ambas formas son secretadas al sistema porta-hipofisiario y ejercen una inhibición equipotente de la secreción de TSH. La SRHI se une con alta afinidad a diversos receptores acoplados a adenilato ciclasas. De esta manera regula negativamente la expresión génica de las subunidades de TSH, aparentemente al disminuir los niveles intracelulares de AMPc (Scanlon y Toft, 2000).

La tirotropina o TSH es la hormona responsable de la función tiroidea normal. La TSH es una glicoproteína sintetizada en el lóbulo anterior de la hipófisis por un grupo de células basófilas conocidas como tirotropos. Consta de dos subunidades unidas no covalentemente. La subunidad  $\alpha$ , es común a las otras tres hormonas glicoproteicas (hormona luteinizante, hormona folículo estimulante y gonadotropina coriónica), mientras que la subunidad  $\beta$  es específica a TSH y contiene la información relacionada a su actividad hormonal y a la unión a receptores específicos. Su peso molecular en distintos mamíferos se encuentra en el rango de los 28 a 30 kD. Como ya se mencionó previamente, la TSH actúa en los tirocitos regulando los distintos pasos de la síntesis y secreción de las yodotironinas. Las HT inhiben la síntesis de TSH directamente a nivel hipofisiario a través de un sistema clásico de retroalimentación negativa y de manera indirecta al reducir la secreción de TRH a nivel hipotalámico. En efecto, se han identificado THREs en la región promotora de los genes que codifican para ambas subunidades de la TSH, convirtiendo a las yodotironinas en el principal regulador negativo de la expresión de las subunidades de TSH. Aproximadamente la mitad de la  $T_3$  unidad a núcleos hipofisarios se deriva de la desyodación intracelular del anillo externo de  $T_4$ , de esta forma los tirotropos responden tanto a la concentración plasmática de  $T_3$  como de  $T_4$ .

Por otra parte, la dopamina también regula negativamente la expresión de las subunidades de TSH. Ejerce su efecto a través de los receptores  $DA_2$  que están acoplados a adenilato ciclasa, aparentemente al disminuir los niveles intracelulares de AMPc. La inducción de los receptores  $DA_2$  por TSH explica el asa ultra corta de retroalimentación negativa que controla la secreción de TSH (Scanlon y Toft, 2000; Wondisford *et al.*, 2000; Lechan y Fekete, 2005).

## V. TRANSPORTE DE LAS HORMONAS TIROIDEAS.

Las HT son moléculas altamente hidrofóbicas, por lo que circulan en la sangre unidas a proteínas transportadoras. Estas proteínas varían en concentración, afinidad a las HT y en constantes de disociación (Tabla 2). El resultado neto de su interacción con las yodotironinas es que más de 99% de las HT circulantes se encuentren unidas a estas proteínas pero puedan ser fácilmente liberadas para su entrada a las células. Así, en condiciones normales, la concentración de hormona libre es de 0.02%, y menor de 0.3% para T<sub>4</sub> y T<sub>3</sub>, respectivamente. La unión a estas proteínas, permite la distribución de las HT a sus órganos blanco y su retención a nivel circulatorio previniendo su pérdida renal o fecal. Se conocen principalmente tres diferentes proteínas capaces de unir y transportar a las tironinas: la globulina transportadora de tiroxina o TBG, la transtiretina o TTR y la albúmina (Alb). La TBG, la TTR y la albúmina son moléculas globulares compactas de peso molecular similar. La TBG y la albúmina se componen de una cadena polipeptídica, mientras que la TTR consiste en un tetrámero conformado por cuatro subunidades idénticas (Robbins, 2000).

Tabla 2. Características de las proteínas transportadoras de yodotironinas.

	TBG	TTR	Albumina
Constante de asociación (M <sup>-1</sup> )			
K T <sub>4</sub>	1.0 e 10	sitio 1 7.0 e 7 sitio 2 6.7 e 5	sitio 1 7.0 e 5 sitios 2-6 4.8 e 4
K T <sub>3</sub>	4.6 e 8	sitio 1 1.4 e 7 sitio 2 5.5 e 5	sitio 1 1.0 e 5 sitios 2-6 6.9 e 3
Constante de disociación (seg <sup>-1</sup> )			
k T <sub>4</sub>	0.018	0.094	
k T <sub>3</sub>	0.16	0.69	
Concentración			
mg/dL	1.5	25	4200
µmol/L	0.27	4.6	640
Distribución hormonal (%)			
T <sub>4</sub>	68	11	20
T <sub>3</sub>	80	9	11

(Se indica la constante de asociación para los distintos sitios de unión en aquellas proteínas con más de un sitio. Modificada de Robbins, 2000)

La TBG es una glicoproteína que presenta la mayor afinidad a  $T_4$ , uniendo alrededor del 70 al 75% de esta hormona, a pesar de ser la menos abundante de las proteínas transportadoras. Es 10 a 20 veces menos ávida por  $T_3$  y sus constantes de disociación son de 39 y 4 segundos para  $T_4$  y  $T_3$ , respectivamente. Únicamente algunas especies de mamíferos tienen este tipo de proteína de alta afinidad.

La TTR tiene una afinidad intermedia uniendo de un 10 a 15% de las HT circulantes. Debido a que su constante de disociación es 5 veces mayor comparada con la de TBG, la contribución de TTR al pool hormonal libre es semejante al de TBG. Esta proteína está presente en todos los vertebrados. Además, TTR es la principal proteína transportadora en el líquido cefalo-raquídeo, en donde juega un papel fundamental en la distribución de  $T_4$  y  $T_3$  al SNC. Cada molécula de TTR contiene dos sitios de unión a  $T_4$  idénticos en el canal central de la proteína. A pesar de ser idénticos, el segundo sitio presenta una afinidad 2 órdenes de magnitud menor al primero (Robbins, 2000).

La albúmina presenta un sitio de unión de mediana afinidad, además de otros cinco sitios de muy baja afinidad. Aún cuando pocas moléculas de albúmina transportan a las HT, su alta concentración deriva en que cerca del 15 al 20% de la  $T_4$  sea transportada por esta proteína.

Por último, existen lipoproteínas que transportan una fracción mínima de las yodotironinas. Las lipoproteínas son un grupo heterogéneo de partículas complejas. De estas, las lipoproteínas de alta densidad (HDL) acarrean cerca del 3% y 6% de la  $T_4$  y  $T_3$  circulantes, respectivamente. En general, la  $T_4$  tiene una mayor constante de afinidad ( $K_i$ ) por estas proteínas, que la  $T_3$  y la  $rT_3$  (Robbins, 2000; Köhrle, 1999).

#### A. PROTEÍNAS TRANSPORTADORAS EN PECES.

Las proteínas transportadoras de HT que han sido identificadas en peces son la albúmina y la TTR (Richardson *et al.*, 1994; Larsson *et al.*, 1985; Santos y Power, 1999). A diferencia de los mamíferos, en los peces la albúmina parece ser la principal proteína acarreadora de  $T_4$ , ya que en ellos la TTR presenta una mayor afinidad por  $T_3$  (Yamauchi *et al.*, 1999). Está última parece jugar un papel importante en los procesos de desarrollo y diferenciación en peces, ya que ha sido

principalmente identificada en organismos juveniles y durante procesos de diferenciación como la esmoltificación (Power *et al.*, 2000; Richardson *et al.*, 2005).

## **VI. EFECTOS DE LAS HT.**

### **A. EFECTOS SOBRE EL METABOLISMO ENERGÉTICO.**

El efecto de las yodotironinas sobre la actividad metabólica se conoce desde hace más de un siglo (Magnus-Levy, 1895). De hecho, la cuantificación de la tasa metabólica basal fue utilizada como diagnóstico del estado tiroideo cuando aún no habían sido desarrolladas técnicas para la cuantificación de las HT (DuBois, 1936). El consumo de un mol de oxígeno se asocia a la utilización de 6.3 pmol de  $T_4$  y 0.63 pmol de  $T_3$  aproximadamente, siendo esta relación constante en todos los mamíferos (Tomasi, 1991).

A pesar de que existen muchos estudios que demuestran el efecto regulador de las HT sobre el metabolismo energético, aún no son claros los mecanismos a través de los cuales actúan estas hormonas. El control del metabolismo energético involucra una variedad de mecanismos bioquímicos y moleculares, así como la participación de distintos compartimentos celulares. En efecto, el control del metabolismo energético por las yodotironinas requiere de la participación tanto de mecanismos nucleares como extranucleares. La primera evidencia del efecto nuclear de la  $T_3$  fue aportada por Tata y colaboradores (1962, 1963). Estos autores mostraron que la administración de  $T_3$  a ratas hipotiroideas inducía un incremento en su tasa metabólica basal, mientras que la coadministración de  $T_3$  y actinomicina D abolía completamente el efecto de  $T_3$ , sugiriendo que  $T_3$  actúa a nivel transcripcional para tener su efecto.

Los efectos de la HT sobre el metabolismo energético tienen características que sugieren su interacción con otros componentes extranucleares. Ciertos efectos son independientes de receptores nucleares, independientes de síntesis proteica y son evidentes en un lapso corto. La mitocondria ha sido considerada un blanco de las yodotironinas debido a su papel en la transducción energética celular (Goglia *et al.*, 1999). De hecho, el estado tiroideo influye tanto en el número como en la actividad de las mitocondrias. Las HT estimulan la síntesis de enzimas que

participan en la cadena respiratoria e incrementan la concentración de la Na,K-ATPasa, principalmente las subunidades  $\alpha_2$  y  $\beta$ , en la membrana mitocondrial así como la permeabilidad a  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ . Además, la  $\text{T}_3$  regula la función mitocondrial en diversos tejidos de alta actividad metabólica como el hígado, el músculo, el riñón y el corazón (Soboll, 1993). En hepatocitos de rata las yodotironinas estimulan los procesos de respiración celular acoplada asociada a la producción de ATP y la respiración no acoplada. Un análisis de las bases mecánicas del incremento en la permeabilidad mitocondrial a cationes, inducida por las HT sugiere que existen dos posibles factores responsables: cambios en la cantidad relativa así como en la permeabilidad intrínseca de la bicapa fosfolipídica de la membrana mitocondrial interna. Estos cambios estimulan la actividad de diversas proteínas asociadas a la membrana (revisado por Hulbert, 2000). Se ha propuesto que  $\text{T}_3$  pudiera unirse a receptores específicos en la mitocondria y de esta manera modular el recambio y la biogénesis mitocondrial. Por otra parte, podría actuar directamente en el aparato transductor energético y regular la respiración mitocondrial al unirse a ciertos componentes de la cadena respiratoria (Lanni *et al.*, 2001).

## B. EFFECTOS SOBRE EL CRECIMIENTO.

Las hormonas tiroideas son esenciales para el crecimiento. El hipotiroidismo provoca un importante retardo en el crecimiento tanto en especies endotérmicas como el humano (Snyder, 2000), la rata (Evans *et al.*, 1966), y la zarigüeya (Buaboocha y Gemmell, 1996), así como en especies ectotérmicas como la lagartija (Gerwien y John-Alder, 1992), la tortuga (Denver y Lich, 1991) y el pez (Matty, 1985). Dicho retardo en el crecimiento en los mamíferos es el resultado tanto de la reducción en la secreción de la hormona del crecimiento (GH) por la hipófisis anterior, de una acción deteriorada de la GH y de efectos secundarios no relacionados a la hormona del crecimiento (Snyder, 2000). En ratas hipotiroideas se ha encontrado disminuida tanto la concentración de la GH como de su mRNA en la hipófisis anterior, así como de sus niveles séricos (Samuels *et al.*, 1989). Las HT regulan la transcripción del gen de la GH que contiene en su región promotora elementos de respuesta al receptor de HT (THRE) (Koenig *et al.*, 1987).

Las hormonas tiroideas también tienen efectos sobre el factor de crecimiento de tipo insulínico tipo 1 (IGF-1), que es el mediador de algunos de los efectos anabólicos y mitogénicos de la GH; el estado tiroideo modula la concentración del IGF-1, así como su bioactividad y la concentración de las proteínas transportadoras de IGF (Miell *et al.*, 1993). Sin embargo, no todos los efectos de las hormonas tiroideas pueden explicarse por acción directa sobre el gen de la GH ó sobre la IGF-1, ya que la administración de GH a individuos hipotiroideos es incapaz de restablecer el crecimiento normal (Snyder, 2000) y se requiere de la coadministración de T<sub>4</sub> para restablecer el crecimiento (Burstein *et al.*, 1979).

### C. EFFECTOS SOBRE EL DESARROLLO DEL SNC.

Las HT modulan los procesos de neurogenesis, mielinización, citoarquitectura neuronal y sinaptogénesis y son esenciales desde etapas muy tempranas del desarrollo. De ahí que su deficiencia se traduzca en un síndrome clínico conocido como cretinismo, que incluye entre sus síntomas deficiencia mental, sordera y desordenes motores (Escobar *et al.*, 1999). Hasta 1999 se consideraba que la deficiencia de HT en los dos últimos trimestres del embarazo y en los primeros meses despues del nacimiento resultaba en retraso mental y deficit neurológico (Utiger, 1999); actualmente existe evidencia que indica que es necesario el aporte materno de HT desde el primer trimestre gestacional para el adecuado desarrollo neuronal del producto (Morreale *et al.*, 2007):

1. Se ha observado la presencia de T<sub>3</sub> y de T<sub>4</sub> en los fluidos tanto embrionarios como fetales en el humano, siendo la concentración de T<sub>4</sub> libre (FT<sub>4</sub>) similar a la del adulto. La concentración de FT<sub>4</sub> durante el primer trimestre gestacional depende del aporte materno y está disponible para todos los tejidos fetales, incluyendo al cerebro; la cantidad de T<sub>3</sub> generada localmente capaz de unirse a los receptores a HT en el cerebro dependerá de la FT<sub>4</sub> materna (Morreale *et al.*, 2007).

2. La disminución de la disponibilidad de HT maternas durante estadios tempranos del desarrollo en la rata, comparables al primer trimestre gestacional humano, afectan la neurogenesis y la migración neuronal irreversiblemente (Lavado-Autric *et al.*, 2003; Ausó *et al.*, 2004).

#### D. EFECTO DE LAS HT EN PECES.

Las HT participan en diferentes aspectos de la fisiología tiroidea teleóstea como son la maduración sexual, la osmorregulación y la conducta migratoria. El desarrollo de los peces puede ser dividido en varias fases que incluyen: la etapa embrionaria *in ovo*, la etapa larvaria, la etapa juvenil y la etapa adulta. En todas estas etapas se han demostrado efectos de la HT en distintas especies. El estado tiroideo correlaciona positivamente con el estado reproductivo, los niveles de yodotironinas aumentan en la estación que coincide con la maduración gonadal y la reproducción (Cyr y Eales 1996). El papel de las HT en la embriogénesis y la etapa larvaria se ha inferido de la cuantificación de estas hormonas en los huevos en donde se distribuyen en el saco vitelino. Queda por comprobar si dichas HT de origen materno, están disponibles para su utilización en los embriones y cual es su función (Tagama y Hirano, 1990). En especies migratorias, las HT están relacionadas con una serie compleja de cambios bioquímicos, morfológicos y conductuales, que preadaptan al individuo para la fase marina de su ciclo de vida, denominada esmoltificación. 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).

#### **VII. MECANISMO DE ACCION DE LAS HORMONAS TIROIDEAS.**

El principal mecanismo de acción de las yodotironinas es a través de su unión a receptores nucleares. Sin embargo, otros organelos celulares como la membrana plasmática, el retículo endoplásmico y la mitocondria han sido considerados sitios de acción potenciales de las hormonas tiroideas (Lazar, 1993; 2003; Davis *et al.*, 2008).

##### A. MECANISMO GENÓMICO.

La caracterización inicial de los receptores nucleares a hormonas tiroideas (TR) evidenció un peso molecular aproximado de 50 kD con una afinidad por T<sub>3</sub> de aproximadamente 100 pM, comparada a 1 nM por T<sub>4</sub>. Presentan una alta homología con la secuencia proteica de los receptores a estrógenos, progesterona, glucocorticoides, vitamina D y ácido retinóico, que sugiere un posible ancestro

molecular común (Evans, 1988). Esta superfamilia de receptores regula la transcripción génica a través del reconocimiento y unión a una secuencia específica del DNA. En el caso de las HT este sitio de reconocimiento se encuentra en la región promotora de ciertos genes y se denomina THRE por sus siglas en inglés thyroid hormone response element. Los receptores de esta familia tienen una estructura característica en dominios (Fig. 7).

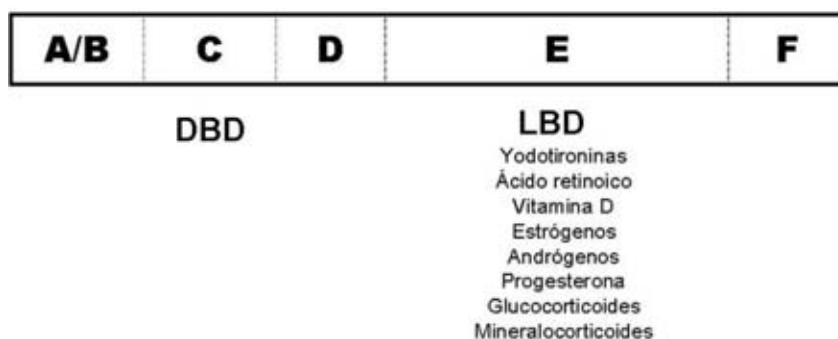


Figura 7. Prototipo de receptor nuclear de la superfamilia de receptores a hormonas tiroideas/esteroides. Los dominios se denominan del A al F. El C es el dominio de unión al DNA (DBD). Los receptores a las hormonas indicadas tienen una estructura similar. LBD, dominio de unión al ligando (Modificado de Green y Chambon, 1986).

El dominio C, un dominio de unión al DNA (DBD, por sus siglas en inglés), es la región más conservada de estas proteínas. Este dominio se encuentra organizado en dos estructuras comúnmente denominadas dedos de zinc (Fig. 8). Los dedos de zinc contienen a diferentes aminoácidos organizados por un grupo de cuatro residuos de cisteína coordinados tetrahedricamente con un átomo de zinc en el centro (Evans y Hollenberg, 1988).

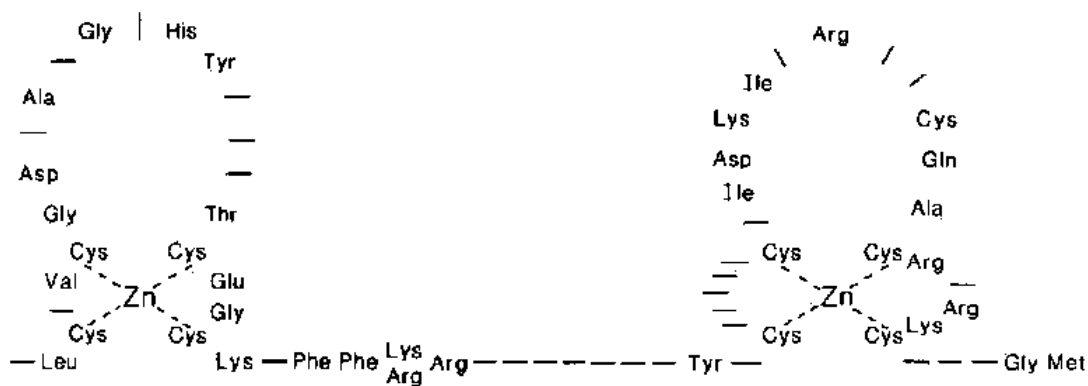


Figura 8. Estructura hipotética del DBD del receptor hormonal. Este dominio está configurado como dos dedos unidos por zinc donde cada ion zinc forma parte de un complejo tetrahédrico coordinado con residuos de Cys (Evans, 1988).



La capacidad para reconocer a los genes blanco es de particular importancia en la función de los TR. La superfamilia de receptores nucleares ha sido dividida en dos grupos con base en la “caja P”, un dominio que es importante para la unión específica al DNA, y que está presente en el primer dedo de zinc del DBD (Umesono y Evans, 1989). La caja P de los receptores a HT es idéntica a la de los receptores a ácido retinóico (RAR), retinoide X (RXR), vitamina D y otros (Fig. 9). Todos estos receptores se unen preferentemente a secuencias de nucleótidos AGGTCA, las cuales son conocidas como “medios sitios” debido a que múltiples receptores de este subgrupo activan la transcripción de genes cuya región promotora contiene dos copias de estas secuencias acomodadas como repeticiones (Forman y Samuels, 1990; Umesono, 1988). En 1986, año en que los genes que codifican para los TRs fueron identificados, se encontró que los TR se unían a dichas secuencias específicas presentes en la región promotora de los genes de GH y de lactogeno placentario de humano (Barlow *et al.*, 1986). Asimismo, la clonación del gen de GH de rata permitió, por primera vez, la descripción un THRE (Koenig *et al.*, 1987). La especificidad para reconocer a los genes blanco esta determinada, en parte, por la orientación y espaciamiento entre estas secuencias. El motivo de repetición directa, espaciado por 4 pares de bases (DR4) parece estar relacionando con la inducción de un gran número de genes mediada por TR (Umesono, 1991).

	Caja P																										
TRβ	C	V	V	C	G	D	E	A	T	G	T	H	Y	R	C	I	T	C	E	G	C	K	G	F	F	R	R
TRα	C	V	V	C	G	D	K	A	T	G	Y	H	Y	R	C	I	T	C	E	G	C	K	G	F	F	R	R
RARα	C	F	V	C	Q	D	K	S	S	G	Y	H	Y	G	V	S	A	C	E	G	C	K	G	F	F	R	R
RXRα	C	A	I	C	G	D	R	S	S	G	K	H	Y	G	V	Y	S	C	E	G	C	K	G	F	F	K	R
VDR	C	G	V	C	G	D	R	A	T	G	F	H	F	N	A	M	T	C	E	G	C	K	G	F	F	R	R
PPARα	C	K	V	C	G	D	V	A	S	G	F	H	Y	G	V	H	A	C	E	G	C	K	G	F	F	R	R
ER	C	A	V	C	N	D	Y	A	S	G	Y	H	Y	G	V	W	S	C	E	G	C	K	A	F	F	K	R
Rev-ErbAα	C	R	I	C	C	D	K	A	S	G	Y	H	Y	G	V	H	A	C	E	G	C	K	G	F	F	R	R

Figura 9. Caja P de los TR y receptores similares. La secuencia corresponde a los aminoácidos 106-132 del TRβ1 e incluye al primer dedo de zinc. Se incluyen las secuencias de los receptores RAR, RXR, a vitamina D (VDR), receptor activado proliferado peroxisomal (PPAR), receptor a estrógenos y Rev-ErbAα (Lazar, 1993).

La clonación inicial de los TR a partir de distintos organismos mostró diferencias, especialmente en el dominio A/B, que corresponden a múltiples isoformas de TR. Estas isoformas proceden de 2 genes distintos, TRα y TRβ (Sap *et al.*, 1986; Weinberger *et al.*, 1986). La transcripción de estos genes resulta en 4

diferentes mRNAs para cada gen (TR $\alpha$ 1-4 y TR $\beta$ 1-4). Sin embargo, la traducción de estos mensajeros resulta únicamente en 4 receptores funcionales: TR $\alpha$ 1, TR $\beta$ 1, TR $\beta$ 2 y TR $\beta$ 3. Estos receptores presentan una distribución diferencial: el TR $\alpha$ 1 es ubicuo; el TR $\beta$ 1 también se expresa ampliamente, encontrándose principalmente en altos niveles en el hígado, en donde presenta variaciones circádicas; la expresión del TR $\beta$ 2 esta confinada a la hipófisis, las neuronas hipotalámicas productoras de TRH, el oído interno en desarrollo y la retina. Por último, TR $\beta$ 3, la isoforma más recientemente identificada, se ha encontrado en el hígado, el pulmón y el riñón de rata (Flamant y Samarut, 2003; Oetting y Yen, 2007).

Los TR regulan la transcripción de genes blanco ó responsivos a HT en la presencia de concentraciones fisiológicas de T<sub>3</sub>. Después de ser sintetizados a nivel citoplasmático, estos receptores deben translocarse hacia el núcleo, donde interactúan con la T<sub>3</sub>, los genes blanco y otras proteínas requeridas para la transcripción génica basal y/o dependiente de T<sub>3</sub>. La translocación de los TR hacia el núcleo parece estar dictada por una secuencia señal en el dominio D. Éste dominio contiene además una región que, junto con la parte terminal del dominio C, son necesarias para la unión a la T<sub>3</sub> (Lin, 1991). Dos complejos de cofactores parecen estar involucrados en la activación de la transcripción: el complejo coactivador de receptores esteroideos (SRC) y el complejo de proteína interactuante-receptor de vitamina D/ proteína asociada a TR (DRIP/TRAP) (Oetting y Yen, 2007)

La estequiometría de la unión de los TR al DNA también es muy variable. Los TR pueden interactuar con los sitios de unión que contienen dos copias del motivo AGGTCA en forma de monómeros o dímeros (Forman *et al.*, 1992). La unión de los TR como mono u homodímeros es relativamente débil debido a la rápida disociación del complejo TR-THRE. Sin embargo, los TR se unen más establemente al DNA en forma de heterodímeros con otras proteínas nucleares. El principal compañero para la formación de heterodímeros es el receptor a derivados de ácido retinóico, RXR (Mangelsdorf, 1990).

En algunos casos la regulación de la transcripción génica por T<sub>3</sub> puede ser mediada a través de TR que se encuentran localizados en el núcleo celular unidos a los THRE en los genes blanco, aún en ausencia de T<sub>3</sub>. En estos casos, en general,

la transcripción basal de los genes, activada por  $T_3$ , es reprimida cuando el TR no está unido a la hormona (Carson-Jurica *et al.*, 1990).

En otros casos, la unión de la  $T_3$  a sus receptores puede tanto activar, como reprimir la transcripción génica. Aún no se sabe cuál tipo de unión TR-THRE (mono, homo o heterodímero) participa en la regulación positiva o negativa de la transcripción génica. Así, la diversidad funcional de la  $T_3$  en los distintos tejidos y estadios del desarrollo puede explicarse por la complejidad creada entre las distintas isoformas de TR y su capacidad de formar heterodímeros con distintas proteínas, los cuales pueden tener distintos genes blanco así como funciones transcripcionales célula-específicas (Oetting y Yen, 2007).

## 1. AUTORREGULACIÓN DE LOS TR.

Las hormonas tiroideas tienen la capacidad de regular a sus receptores nucleares de manera diferencial y tejido-específica. En ratas hipotiroideas tratadas con  $T_3$  los niveles de mRNA del receptor  $TR\beta_1$  permanecen sin alteración en el corazón, riñón, hígado y cerebro, mientras que su expresión hipofisiaria se observa aumentada con este mismo tratamiento (Hodin *et al.*, 1990). En concordancia con estos resultados, Strait y cols. (1990) observaron que en ratas neonatas se observa un incremento de los niveles del  $TR\beta_1$  asociado a un incremento en la concentración plasmática de  $T_3$ . De igual manera, el pico de  $T_3$  observado durante la metamorfosis de *X. laevis* se acompaña de regulación a la alta del  $TR\beta_1$  (Kanamori y Brown, 1992). El hecho que el incremento del  $TR\beta_1$  este mediado a través de las propias hormonas tiroideas ha sido apoyado por el descubrimiento de dos THREs en la región promotora del gen humano que codifica para  $TR\beta$  (Suzuki *et al.*, 1994). Del mismo modo, se han localizado dos secuencias THRE DR4 funcionales en el promotor del gen que codifica para el  $TR\beta$  de *Xenopus* (Ranjan *et al.*, 1994; Machuca *et al.*, 1995).

En contraste al tipo de la regulación del  $TR\beta_1$ , el tratamiento de ratas hipotiroideas con una dosis de  $T_3$  induce una disminución de los receptores  $TR\beta_2$  hipofisiario y  $TR\alpha_1$  de corazón, riñón e hígado (Hodin *et al.*, 1990). Utilizando cultivos celulares de hipófisis se ha confirmado que el tratamiento con  $T_3$  induce una disminución del mRNA  $TR\beta_2$  (Ball *et al.*, 1997). En relación a la regulación del  $TR\alpha$ ,

resultados similares fueron obtenidos en ratas en desarrollo en las que la inducción de hipotiroidismo indujo un aumento en la expresión del TR $\alpha$ 1 testicular, mientras que el hipertiroidismo la disminuyó (Rao *et al.*, 2003).

## 2. TR EN PECES.

La existencia de receptores a hormonas tiroideas en peces fue demostrada por primera vez en núcleos aislados de hepatocitos de diversas especies de salmónidos y lampreas utilizando estudios de unión a ligando marcado radiactivamente ( $^{125}\text{I}\text{T}_3$ ). El primer TR de pez fue clonado del pez plano falso (halibut) del Japón (Yamano *et al.*, 1994). En esta especie se ha demostrado la existencia de 4 subtipos de TR: 2 TR $\alpha$  y 2 TR $\beta$ . Sin embargo, a diferencia del resto de los TR descritos, existe evidencia que indica que mientras que las dos isoformas de TR $\beta$  provienen de un solo gen; las isoformas de TR  $\alpha$  en este pez provienen de dos genes distintos.

Se sabe poco acerca de la función de los TR a nivel molecular en los peces. El estudio de los patrones de expresión de los TR en el pez cebra sugieren que los genes de TR son importantes durante la embriogénesis (Essner *et al.*, 1997; Essner *et al.*, 1999). Por otro lado, en el lenguado, especie en la cual las HT son necesarias durante la metamorfosis, se ha observado que los TR son regulados a la alta por estas hormonas (Inui y Miwa, 1985; Miwa *et al.*, 1988; Yamano y Miwa, 1998).

### B. MECANISMOS NO GENÓMICOS.

Aunque existe evidencia creciente que apunta al núcleo como principal sitio de acción de las yodotironinas, los efectos de estas hormonas tanto en el contexto clínico como fisiológico no están restringidos a la identificación del complejo hormona-receptor en el THRE del gen blanco. Es claro que procesos biológicos concomitantes que involucran otros genes, hormonas, factores de transcripción y otros elementos regulatorios determinan el espectro de efectos de estas hormonas en un tejido dado y en un contexto fisiológico y de desarrollo dado (Oetting y Yen, 2007; Oppenheimer, 1999). Aunque es ampliamente aceptado que la mayoría de las acciones de las HT son secundarias a efectos a nivel nuclear, algunos investigadores continúan explorando sus posibles efectos no genómicos. El efecto

más estudiado es el de la tiroxina sobre el desarrollo cerebral. Este efecto está ampliamente relacionado con la inhibición de la actividad de la desyodasa tipo 2, enzima responsable de la conversión de  $T_4$  a  $T_3$ , y cuya inhibición no requiere síntesis proteica. Además, la  $rT_3$ , que tiene una afinidad muy baja por los TR, actúa como sustrato de esta enzima con una potencia similar a la de  $T_4$  (Silva y Leonard, 1985). Más aún, experimentos *in vitro* han mostrado que tanto  $T_4$  como  $rT_3$  pueden actuar polimerizando actina, en ausencia de síntesis proteica (Siegrist-Kaiser, 1990).

### **VIII. METABOLISMO DE LAS HORMONAS TIROIDEAS.**

El metabolismo de las HT involucra una compleja serie de reacciones enzimáticas que resultan en su desyodación, conjugación, desaminación o en la descarboxilación oxidativa (Fig. 10). El grado en que estas reacciones ocurran en un órgano tendrá un efecto importante sobre los niveles circulantes y tisulares de las HT 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 HT incluye la esterificación del grupo fenólico hidroxilo con ácido sulfúrico o con ácido glucurónico y funcionalmente incrementa la solubilidad de las HT 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. Sin embargo, bajo ciertas circunstancias, las vías metabólicas alternas también juegan un papel determinante. La sulfoconjugación, por ejemplo, es una vía muy importante durante el desarrollo y las yodotironinas sulfatadas pueden ser desyodadas, inclusive más rápidamente. Más aún, la sulfoconjugación y la glucoronidación son vías reversibles. Los glucorónidos pueden hidrolizarse en el intestino, así como en otros tejidos, y ser reabsorbidos para su reutilización. Asimismo, las tironinas sulfatadas pueden ser desulfatadas en tejidos selectos, como el cerebro y el hígado, volviéndose disponibles a los receptores nucleares. Esto ocurre especialmente en el feto, cuando la actividad desyodativa tipo 1 (D1) es baja (Wu *et al.*, 2005).

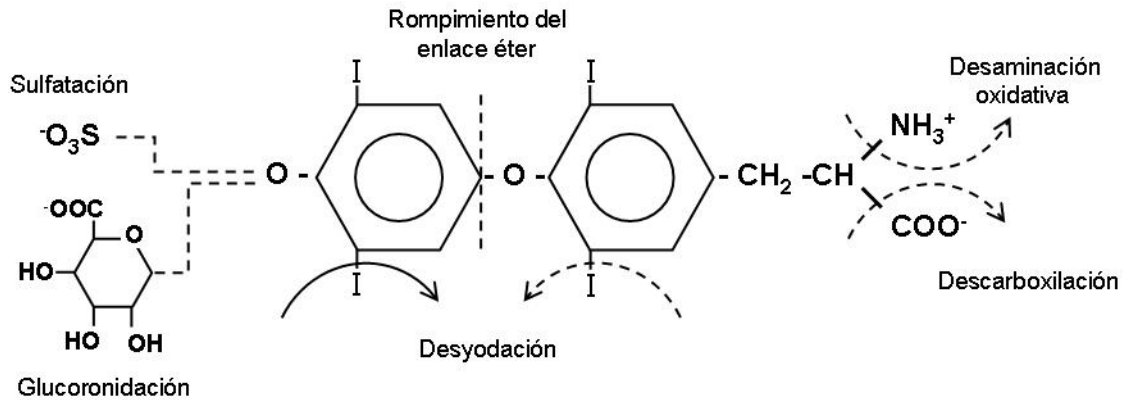


Figura 10. Vías metabólicas de la Tiroxina. Todas las vías metabólicas señaladas con líneas discontinuas inactivan a la tiroxina. La desyodación en la posición 5' ó 3' constituye la única vía metabólica de activación (Modificada de Wu *et al.*, 2005).

### A. SULFOCONJUGACIÓN.

La sulfoconjugación o sulfonación de las yodotironinas consiste en la transferencia de un grupo sulfonato, a partir del donador universal 3'-fosoadenosin 5'-fosfosulfato (PAPS), al grupo hidroxilo en el anillo fenólico de las HT. Es catalizada por un grupo de sulfotransferasas (SULT) que se localizan en la fracción citoplasmática de diversos tejidos. Las SULT son proteínas solubles compuestas de dos subunidades formando homodímeros (subunidades idénticas), o heterodímeros (subunidades diferentes), cada una con un peso molecular aproximado de 34 kD. Las sulfotransferasas participan en la inactivación y detoxificación de compuestos endógenos y xenobioticos y se han agrupado en tres superfamilias mayores: SULT1, SULT 2 y SULT 3. La familia de las SULT1 cataliza principalmente la conjugación de los compuestos fenólicos, incluyendo a las HT (Fujita *et al.*, 1999).

La introducción del grupo sulfato al anillo fenólico de las yodotironinas modifica su ambiente electrónico pudiendo acelerar su degradación ulterior. La sulfatación de  $\text{T}_4$  bloquea completamente su conversión hacia  $\text{T}_3\text{S}$ , mientras que facilita su desyodación en el anillo interno. Por observaciones *in vitro* se ha encontrado que la sulfatación de las yodotironinas facilita la desyodación del anillo interno de la  $\text{T}_4$ , la  $\text{T}_3$  y el ácido 3,3',5-triyodoacético (triac), mientras que la desyodación en el anillo externo puede ser inhibida ( $\text{T}_4$ ), no afectada ( $\text{T}_3$ ) o estimulada (3,3'- $\text{T}_2$  y 3,3'-diac). Por otro lado, se ha observado que bajo condiciones

de baja actividad D1, las yodotironinas sulfatadas pueden ser un reservorio de HT bioactivas, como la  $T_3$ , la cual puede recuperarse a partir de la  $T_3S$  por la acción de sulfatasas presentes en tejidos específicos. Más aún, se ha demostrado que la sulfoconjugación facilita la transferencia de las HT entre el feto y la madre (Chopra *et al.*, 1994; Visser *et al.*, 1998; Wu *et al.*, 2005).

La sulfatación es una vía metabólica muy importante en mamíferos en desarrollo, particularmente durante la gestación tardía. La secreción de la glándula tiroidea fetal incrementa progresivamente conforme se acerca el fin de la gestación. Sin embargo, el efecto de la HT debe retardarse hasta el periodo posparto. De esta manera, la desyodasa tipo 3 (como se describe mas adelante) y las SULT moderan los niveles circulantes de HT activas en el periodo previo al nacimiento. El resultado final del proceso de transferencia de dos vías de HT en el complejo feto-materno es el de mantener niveles circulantes bajos de  $T_3$  mientras se provee de un nivel optimo de HT a los órganos críticos, como el SNC (Wu *et al.*, 2005).

## B. GLUCORONIDACIÓN.

Otra vía alterna del metabolismo de las HT es la conjugación del anillo fenólico de las yodotironinas con ácido glucurónico. El principal sitio donde se realiza este proceso es el hígado, donde la glucoronidación precede a la excreción biliar-fecal de las HT-glucoronidadas, sin embargo este proceso también puede llevarse a cabo en otros tejidos. Las enzimas que catalizan esta reacción son las uridin difosfato-glucoroniltransferasas (UDP-GT ó UGT), utilizando como cofactor al ácido UDP-glucurónico. La isoenzima UGT1A1, presente en el hígado y la UGT1A9 del riñón son las enzimas responsables de la glucoronidación de la  $T_4$  en el humano; mientras que la isoenzima UGT2B cataliza la glucoronidación de la  $T_3$  en la rata (Tukey y Stassburg, 2001; Findlay *et al.*, 2000). Esta vía metabólica es muy importante en la rata, en donde su estimulación experimental resulta en un incremento de  $T_4G$  biliar y secundariamente provoca depleción de los niveles circulantes de  $T_4$ , provocando la estimulación de la secreción de TSH e hipertrofia tiroidea. Por otra parte, la glucoronidación de  $T_3$  es cuantitativamente menos importante en la rata y mínima en el humano. Son varios los agentes identificados que, de forma especie-especifica, inducen la actividad de las UGT. En la rata se ha

demostrado que el fenobarbital, la dexametasona, el clofibrato, el 3-metilcolantreno, la pregnenolona, el policlorobifenol y el propiltiouracilo estimulan la glucoronidación en diferentes grados, con afección de los niveles circulantes de  $T_4$  y TSH. En contraste, la inducción de la glucoronidación en humano es menor. En ellos se ha observado que agentes anticonvulsivantes como la fenitoina y la carbamacepina; y antituberculosos como la rifampicina pueden incrementar la glucoronidación hepática, sin llegar a afectar los niveles circulantes de  $T_3$  y TSH, con la excepción de los pacientes hipotiroideos en quienes el uso de estos medicamentos debe ser supervisado (Wu *et al.*, 2005).

La secreción biliar de la  $T_4G$  hacia el intestino ha sido considerada principalmente un mecanismo de excreción de las HT. Sin embargo, el intestino también puede servir como un reservorio de  $T_4$ , ya que la  $T_4G$  puede ser desconjugada en el lumen intestinal. Esta hidrólisis es catalizada por las  $\beta$ -glucuronidasas de las bacterias anaerobias intestinales. De esta manera, la  $T_4$  puede ser absorbida y reentrar a la circulación porta. Por otra parte, se ha observado en humanos que, tras la administración oral o intravenosa de  $T_4G$ , este compuesto es rápidamente desconjugado, llegando a un equilibrio entre  $T_4:T_4G$ . Estos resultados y observaciones similares en rata permiten proponer que la desconjugación de  $T_4G$  puede suceder en tejidos distintos al intestino y pudiera ser un mecanismo de abastecimiento de  $T_4$  al compartimiento intracelular en estos tejidos (de Herder *et al.*, 1989; Wu *et al.*, 2005).

### C. DESAMINACIÓN OXIDATIVA.

Este proceso consiste en la conversión de las HT a sus análogos acetilados, de esta manera el ácido tetrayodoacético (tetrac) y el ácido triyodoacético (triac) se forman a partir de la  $T_4$  y de la  $T_3$ , respectivamente. Dos enzimas han sido postuladas como capaces de catalizar dicho proceso: la aminotransferasa de HT ó transaminasa y la L-aminoácido oxidasa (LAO). La transaminasa se localiza en el hígado y el riñón, mientras que la LAO ha sido aislada de hongos, microorganismos, veneno de víbora, hígado de pavo y riñón de mamífero (Kaiser-Siegrist y Burger, 1994).



Los análogos acetilados de las yodotironinas también pueden interactuar con las otras vías metabólicas de las HT. La desyodación es la principal vía metabólica del triac y el tetrac. Ambos son mejores sustratos de la D1 hepática, comparados con sus precursores  $T_3$  y  $T_4$ . Los derivados acetilados también son blanco de conjugación con ácido sulfúrico y glucorónico. Asimismo, la  $T_3S$  y la  $T_4S$  pueden ser convertidos a sus análogos acetilados, triac sulfato (triacS) y tetrac sulfato (tetracS) y posteriormente desyodados hacia metabolitos menos yodados (Wu *et al.*, 2005).

Los derivados acetilados de las yodotironinas interactúan con las clásicas proteínas de unión a HT. El triac puede unirse a los TR induciendo, tanto *in vitro* como *in vivo*, supresión de la secreción de TSH. El triac tiene una mayor afinidad por los TR comparada con  $T_3$  aunque permanece unido por menor tiempo. El triac tiene mayor afinidad a los  $TR\beta$  que a los  $TR\alpha$ . En estudios en humanos se ha observado que el triac ejerce un efecto selectivo sobre la hipófisis mientras que es menor en otros tejidos periféricos. Por otra parte el tetrac tiene una vida media de 3 a 4 días al ser transportado en la circulación por la transtiretina (Bracco *et al.*, 1993; Everts *et al.*, 1995; Wu *et al.*, 2005).

#### D. ROMPIMIENTO DEL ENLACE ÉTER.

Este proceso consiste en el rompimiento del núcleo de la  $T_4$  en el puente éter liberándose por una parte DIT, y por otra el anillo fenólico yodado. Este último puede reaccionar yodando otras proteínas o ser desyodado. Se trata de una vía metabólica menor en la economía de las HT que es catalizada por peroxidasas. El mecanismo propuesto es un ataque oxidativo en el anillo fenólico, convirtiéndolo en una quinona, la cuál es separada del resto de la molécula y desyodada. El proceso de rompimiento del enlace éter puede ser una vía importante ante procesos infecciosos en donde los leucocitos son activados y sus peroxidasas pueden catalizar esta vía, generando cofactores que pueden ser utilizados en la lisis bacteriana. Por otra parte, el incremento en los niveles circulantes de DIT en pacientes con insuficiencia renal crónica, durante cirugías mayores así como en recién nacidos sugiere que esta vía metabólica pudiera tener un papel importante durante estos procesos (Wu *et al.*, 2005).

## E. DESYODACIÓN.

La desyodación es el mecanismo predominante del metabolismo de las HT ya que de ella depende la activación o inactivación de las mismas. Esta biotransformación sucede prácticamente en todos los tejidos del organismo. 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 (ORD, por sus siglas en inglés ó vía de activación) de T<sub>4</sub> resulta en la formación de T<sub>3</sub>, molécula hasta 20 veces más activa. Así, esta vía desyodativa representa un paso de activación clave en la acción de las HT. Por otro lado, la remoción de un átomo de yodo de T<sub>4</sub> ó T<sub>3</sub> en el anillo interno (IRD ó vía de inactivación) resulta en la formación de yodotironinas inactivas (St. Germain y Galton, 1997).

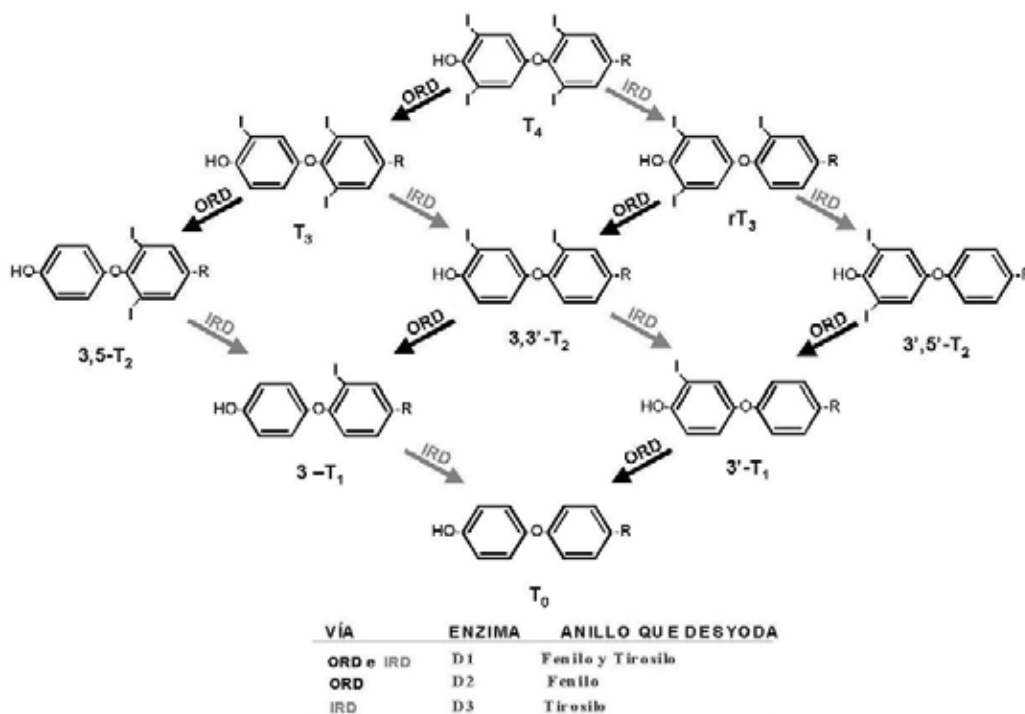


Figura 11. Vías de desyodación de las hormonas tiroideas. Se muestra la desyodación secuencial de las HT a partir de T<sub>4</sub>. ORD, desyodación del anillo externo; IRD, desyodación del anillo interno

Existen tres tipos de desyodasas que catalizan a estas dos vías metabólicas (activación e inactivación). Dos diferentes isoenzimas, D1 y D2, catalizan la vía de activación, mientras que la vía de inactivación es catalizada primordialmente por D3

(Fig.11). Estas enzimas difieren en sus propiedades catalíticas y muestran un distinto patrón de expresión durante el desarrollo, así como especie y órgano-específico (ver tabla 3). 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; 1999).

Hasta el momento ninguna de las tres desyodasas ha sido purificada, sin embargo, se han clonado los cDNAs que codifican para las tres desyodasas de diferentes especies de vertebrados (Köhrle, 1999; Valverde *et al.*, 2004). Estas enzimas pertenecen a una familia de selenoproteínas cuya estructura y función están altamente conservadas a lo largo de la filogenia. La presencia del aminoácido modificado, selenocisteína (SeCys), en el sitio activo de las desyodasas esta codificado por un triplete UGA en el marco abierto de lectura. (Berry *et al.*, 1991; Behne y Kyriakopoulos, 2001). Este codón es una señal de paro de la traducción en el resto de los mRNAs. En pH fisiológicos, la SeCys se ioniza convirtiéndose en un potente donador de electrones y por lo tanto favore la reacción de desyodación (St. Germain, 1999). El sitio activo de todas las desyodasas esta altamente conservado, encontrándose una identidad del 72% en la región de 48 aminoácidos que flanquean a la SeCys, de ahí que se proponga que las tres desyodasas hayan divergido de un gen ancestral común. Todas las desyodasas contienen una secuencia de inserción de SeCys en su región 3' no traducida, conocido como elemento SECIS (Fig. 12a). El elemento SECIS es una señal cis-actuante requerida durante la traducción de la proteína para la incorporación de la SeCys. Los elementos SECIS no presentan el clásico apareamiento de bases descrito por Watson y Crick, no obstante, se ha descrito que adoptan dos estructuras secundarias alternativas plegadas en forma de tallo-horquilla designados forma 1 y forma 2. En la estructura de la forma 1, las adenosinas esenciales están contenidas en una horquilla única. En contraste, en la forma 2 las adenosinas forman parte de una segunda horquilla. Las implicaciones funcionales de estas variantes aún son desconocidas (Fagegaltier *et al.*, 2000).

Tabla 3. Principales características moleculares y funcionales de las desyodasas.

	D1					D2					D3				
	Peces	Anfibios	Reptiles	Aves	Mamíferos	Peces	Anfibios	Reptiles	Aves	Mamíferos	Peces	Anfibios	Reptiles	Aves	Mamíferos
<b>Papel fisiológico</b>	Fuente de T <sub>3</sub> circulante	Fuente de T <sub>3</sub> circulante Degradación de rT <sub>3</sub> y T <sub>3</sub> S Reciclamiento de I				Provee T <sub>3</sub> intracelular Fuente de T <sub>3</sub> circulante (50%)					Inactivación de T <sub>3</sub> y T <sub>4</sub>				
<b>Reacción catalítica</b>	ORD: T <sub>4</sub> a T <sub>3</sub>	ORD: T <sub>4</sub> a T <sub>3</sub> IRD: T <sub>4</sub> a rT <sub>3</sub> T <sub>3</sub> S a 3,3'-T <sub>2</sub> S				ORD: T <sub>4</sub> a T <sub>3</sub>					IRD: T <sub>4</sub> a rT <sub>3</sub> T <sub>3</sub> y T <sub>3</sub> S a 3,3'-T <sub>2</sub>				
<b>Km aparente (M)</b>	10 <sup>-7</sup>		10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-8</sup>	10 <sup>-8</sup>	n.d.	10 <sup>-10</sup>	10 <sup>-8</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-8</sup> (E)	n.d.	10 <sup>-8</sup> (E)	10 <sup>-8</sup> (E)
<b>Distribución tisular principal</b>	hígado riñón branquia cerebro	SN	hígado páncreas riñón	hígado intestino	hígado riñón tiroides hipófisis	hígado retina cerebro	<b>PM:</b> cerebro piel intestino cola	intestino pulmón corazón <b>E:</b> hígado riñón	hígado <b>GH:</b> <b>E:</b> hígado	hipófisis cerebro tanocitos TGP adrenales <b>Embrión:</b> hígado	piel branquia cerebro	<b>PM:</b> hígado intestino riñón	<b>E:</b> hígado	<b>E:</b> hígado Riñón cerebro cerebelo	placenta piel SNC útero gestante
<b>Gen</b>					<b>Ratón:</b> crom 4 15 Kb 4 exones <b>Humano:</b> 1p32-p33 17.5 Kb 4 exones 2 TREs	<b>Fh:</b> 10 Kb intrón único de 4.7 Kb				<b>Ratón:</b> 14 Kb intrón único de 8.5 Kb <b>Humano:</b> 14q24.3 15 Kb intrón único de 7.4 Kb					<b>Ratón:</b> crom 12F1 1 exón ~1.8 Kb <b>Humano:</b> 14q32 1 exón
<b>cDNAs Clonados</b>	<i>Fundulus</i> Tilapia	Rana	—	Pollo	Rata Humano Perro Ratón Ardilla	<i>Fundulus</i> Truchas	Rana	—	Pollo	Humano Ratón Rata	Tilapia	Rana	—	Pollo	Rata Ratón Humano

Regulación por sustrato	Hiper-tiroidismo mecanismo: pre- traduccional pos- traduccional	↓↓ mRNA				↑↑ mRNA	↓↓↓ mRNA				↓ mRNA		↑↑ mRNA			↑↑ mRNA
	Hipo-tiroidismo	↓ ?	↑ ?			↓	↓				↓↓↓ ubiquiti- nación		↓			↓
Otros factores reguladores	Reguladores a la alta				Higado (E): PRL GH TRH GC	RA GH Tiroides: AMPc TSH		Cerebro: GC		Cerebro (E): GC	AMPc GC TGP: insulina glucagon CA					RA FGFa FGF b EGF
	Reguladores a la baja			Riñón (E): GC CG + T3 PP		GC citocinas		Higado: GC	Riñón (E): GC		GH		Higado: GC			
Demandas fisiológicas	Reguladores a la alta	Higado: Hipo-AO				GM: Lactancia (β-adr)	Lamprea Intestino PM Higado: Hipo-AO				Ayuno Adrenal: Estrés por frío	Cerebro SM			Higado (E): Ayuno	Placenta y útero: Gestación
	Reguladores a la baja	Riñón: Hiper-AO				Higado: Ayuno	Lamprea Intestino M Higado: Hiper-AO								Riñón: Ayuno	

T<sub>3</sub>S, T<sub>3</sub> sulfatada; ORD, desyodación del anillo externo; IRD, desyodación del anillo interno; PTU, propiltiuracilo; PM, pre-metamorfosis; THRE, elemento responsivo a hormonas tiroideas; RA, ácido retinóico; GH, hormona del crecimiento; GC, glucocorticoides; CA, catecolaminas; FGF, factor de crecimiento fibroblástico; EGF, factor de crecimiento epidermal; PP, propranolol; E, embrionario; M, metamorfosis; MO, ambiente osmótico; GH, glándula harderiana; GM, glándula mamaria; SM, esmoltificación; β-adr, β-adrenérgica; n.d., no determinado. (Modificado de Valverde-R *et al.*, 2004)

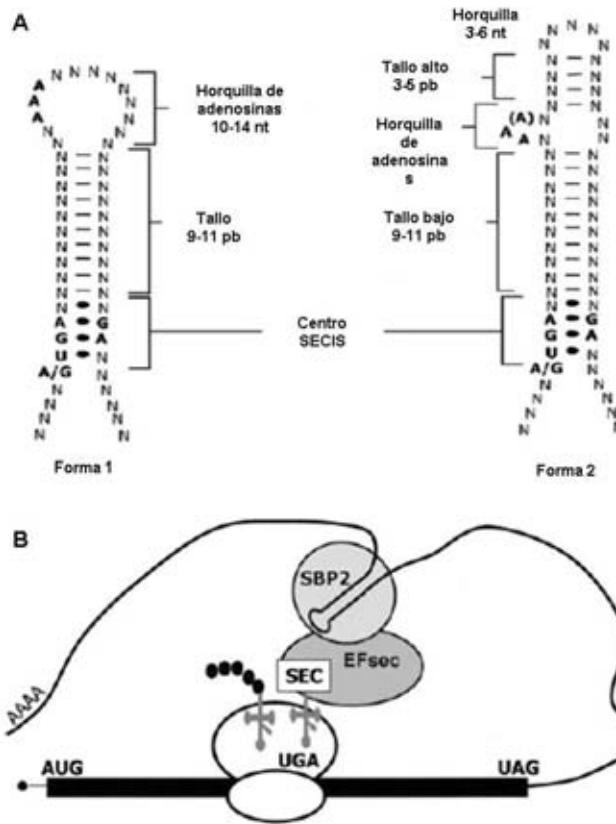


Figura 12. a) Estructura consenso del elemento SECIS formas 1 y 2: las secuencias y estructuras conservadas incluyen los nucleótidos del centro SECIS (A/GUGA y GA), el largo de los tallos y las adenosinas conservadas en las respectivas horquillas. Las líneas indican apareamiento de bases tipo Watson-Crick y los óvalos muestran el apareamiento no Watson-Crick. b) Incorporación de la SeCys: se muestran los distintos elementos cis- y trans-actuantes. La barra sólida indica el marco abierto de lectura que incluye el codón UGA. La región no traducida se ilustra como una línea fina. Se muestra el complejo SECIS-SBP2-EFsectRNA (Modificado de Bianco *et al.*, 2002).

La transcripción de las desyodasas requiere además de una compleja maquinaria trans-actuante (Fig. 12b) que incluye una sintetasa de SeCys (SEC), un RNA de transferencia específico (selenocisteil-tRNA<sup>Sec</sup>), un factor de elongación selenocisteil-tRNA-específico (Efsec), un factor de unión a SECIS que interactúa con el Efsec (SBP2) y una selenofosfato sintetasa (SPS2) (Bianco *et al.*, 2002; Hoffman y Berry, 2005).

## 1. DESYODASA TIPO 1 (D1).

a. **Localización.** La D1 es la enzima más estudiada de las tres. Es una proteína localizada en la membrana plasmática compuesta por dos subunidades idénticas de aproximadamente 29 kD que funciona como dímero. Su dominio COOH-terminal,

incluyendo el sitio activo, se encuentra orientado hacia el citosol (Baqui *et al.*, 2000). En la rata adulta, la D1 se expresa predominantemente en el hígado, seguido por el riñón, la tiroides, la glándula mamaria lactante y la hipófisis anterior (Aceves y Valverde, 1989; Bianco *et al.*, 2002; Köhrle, 1996; 1999). En los anfibios solo hasta fechas recientes fue reportada la clonación de la secuencia del cDNA D1 de *Xenopus laevis*, a partir de una biblioteca de cDNA de cerebro (Morvan Dubois. *et al.*, 2006); además, en la base de datos del genoma de *X. tropicalis* se encuentra la secuencia para las tres desyodasas (Brown, 2005). El estudio de la expresión de la D1 en *X. laevis* durante el desarrollo embrionario mostró que esta enzima se expresa a partir del estadio NF 30 en áreas neurogénicas tanto del sistema nervioso central como del periférico (Morvan Dubois. *et al.*, 2006). La presencia de la D1 en peces ha sido confirmada, aún cuando su expresión es muy baja (Orozco *et al.*, 1997; 2000).

b. **Función.** Desde su descubrimiento (Visser *et al.*, 1975) hasta fechas recientes (Schneider *et al.*, 2006) se propuso que la función de la D1 era la de proveer T<sub>3</sub> al compartimiento vascular, ya que se sabe que en humanos sanos más del 70% de la T<sub>3</sub> circulante proviene de la desyodación extratiroidea, principalmente del hígado, órgano que en mamíferos únicamente expresa D1 (Köhrle, 1996; 1999). Sin embargo, los resultados de los estudios del ratón D1-“knock-out” (KO D1) arrojaron datos interesantes en cuanto a la función de la D1 (Schneider *et al.*, 2006). La generación del KO D1 ha confirmado las observaciones encontradas en la línea de ratones C3H, un polimorfismo que cursa con deficiencia de D1 (Berry *et al.*, 1993; Maia *et al.*, 1995). En ambos casos los animales presentan un incremento en los niveles de T<sub>4</sub> y rT<sub>3</sub> circulantes. En contraste, los niveles circulantes de T<sub>3</sub> y TSH permanecen en rangos normales, sugiriendo, que el papel de la D1 en la producción periférica de T<sub>3</sub> no es esencial, y que a pesar de la presencia de D1 en la hipófisis, esta enzima no participa en la regulación del EHHT. Además, en el KO D1 se observó un incremento en la excreción fecal de yodo en forma de HT y sus metabolitos yodados, lo que sugiere que el principal papel de la D1 sería la desyodación de las yodotironinas con la finalidad de reciclar el yodo. Así, aún cuando estos resultados no descartan la participación de la D1 en la producción de T<sub>3</sub> a nivel periférico, su papel principal parece ser el de desyodar a los metabolitos

de HT, ya que se observó que estos animales presentan un mal manejo del exceso del yodotironinas. Además, su función parece ser primordial en estados patológicos, como el hipertiroidismo o la deficiencia de yodo. En el primer caso, la D1 puede limitar el incremento en los niveles séricos de  $T_3$ , mientras que en la deficiencia de yodo aseguraría el aporte de este oligoelemento al reciclarlo a partir de los metabolitos de HT (Schneider *et al.*, 2006).

**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  $T_4$ , su sustrato preferencial *in vitro* es:  $rT_3 > T_4 > 3',5'-T_2 > 3,3'-T_2$  con valores de  $K_m$  aproximados en el rango  $\mu$ molar. A diferencia de las otras desyodasas, la D1 es capaz de desyodar tanto el anillo externo como el interno de la molécula de  $T_4$ , y así formar tanto  $T_3$  como  $rT_3$ . 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, donde el sustrato primario es la yodotironina 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 ditioneitol (DTT) es el cofactor más eficiente *in vitro* (Kuiper *et al.*, 2005).

Como ya se ha mencionado, el sitio catalítico de las desyodasas está conformado por el aminoácido modificado 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, a excepción de la D1 de pez (Orozco *et al.*, 1997; Sanders *et al.*, 1997), es su susceptibilidad para ser inhibida por agentes como el propiltiuracilo (PTU). Esta característica no es compartida por la D2 y la D3, por lo que el uso de este agente permite distinguir experimentalmente a la D1 (Köhrle, 1999; Kuiper *et al.*, 2005). Los aminoácidos en el sitio activo de las D1 en diversas especies están altamente conservados siendo la única excepción la D1 de



pez. En dichos cDNAs la serina de la posición 128 es substituida por una prolina. Aún cuando esta característica es compartida con las enzimas D2 y D3, las cuales son insensibles a inhibición por PTU, estudios utilizando mutagénesis dirigida han mostrado que este aminoácido no puede explicar la insensibilidad a PTU de la D1 de pez (Orozco *et al.*, 1997; Sanders *et al.*, 1997).

El estudio comparativo de las D1 en distintas especies ha arrojado información sobre otros aminoácidos esenciales para la función, aún cuando no estén localizados cerca del sitio activo. En la D1 de rata, la substitución de la His-158 por mutagénesis dirigida, genera una enzima completamente inactiva, sugiriendo que este residuo es esencial para la función catalítica y/o conformación de la D1 (Berry, 1992). Por otra parte, la Phe-65 es crítica para la desyodación ORD de la rT<sub>3</sub> y la 3,3'-T<sub>2</sub>S, mientras que no modifica la desyodación IRD. La Phe-65 esta conservada en casi todas las especies con la excepción de la D1 de perro, donde es substituida por una Leu y presenta una Km para rT<sub>3</sub> 30 veces mayor a la D1 de humano y de rata (Toyoda *et al.*, 1994; 1997). La otra excepción es la D1 de *Fh* en donde la Phe esta substituida por Tyr y tiene una Km 5 veces menor que la D1 de rata (Orozco *et al.*, 2003).

**d. Características moleculares.** Se han clonado los cDNAs que codifican para D1 a en diversas clases de vertebrados. Su secuencia esta altamente conservada, a juzgar por el 74% de identidad que presentan a nivel de los nucleótidos. El mRNA D1 de *Fh* es el más pequeño descrito a la fecha (1.3 kb) comparado con el tamaño promedio de 2 a 2.1 kb de los restantes (Orozco *et al.*, 2003; Valverde-R *et al.*, 2004). Cabe resaltar que la D1 de rata es codificada por dos distintos transcritos que varían en el largo de su región 3' no traducida. La importancia fisiológica de la presencia de ambos transcritos no ha sido esclarecida, sin embargo se ha sugerido que tengan un papel en la regulación diferencial órgano-específica (Aceves *et al.*, 1999a, b).

Como ya se ha descrito, todas los mRNA D1 contienen un codon UGA en el marco abierto de lectura que codifica para la inserción de la SeCys. El elemento SECIS guarda una identidad del 51% entre las distintas D1 siendo su estructura

secundaria una forma 1, con la excepción de la D1 de *Fh* que corresponde a una forma 2 (Orozco *et al.*, 2003; Valverde-R *et al.*, 2004).

Además de la clonación de los cDNAs, se ha determinado la estructura del gen D1 (*Dio1*) en ratón (Maia *et al.*, 1995) y humano (Toyoda *et al.*, 1994). Ambos genes contienen cuatro exones. El análisis del *Dio1* en humano mostró la presencia de 2 THREs funcionales en su región promotora. Estos hallazgos confirmaron los estudios fisiológicos en donde se había sugerido que la regulación de la D1 es a nivel pretraduccional (ver sección de regulación).

**e. Regulación.** La regulación de las desyodasas parece depender primordialmente de tres factores: el aporte y disponibilidad del substrato; 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 HT, la actividad desyodativa se modifica 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 HT tienen efectos regulatorios directos sobre su actividad. La T<sub>4</sub> y la T<sub>3</sub> aumentan rápidamente la actividad D1 en el hígado, el riñón, la tiroides y la hipófisis, acelerando de esta forma el metabolismo de las HT (Köhrle, 1996). Los niveles elevados de estas hormonas estimulan la transcripción del mRNA y secundariamente la actividad enzimática, es decir, el efecto de estas hormonas ocurre a través de mecanismos pretraduccionales (Toyoda *et al.*, 1992). La presencia de dos THREs en la región promotora del gen *Dio1* en humano explica esta regulación por substrato. Esta regulación de la D1 por substrato parece ser similar en las pocas especies no mamíferas descritas hasta el momento, con excepción del pez. En ellos se ha observado un patrón regulatorio opuesto: la inducción de un estado hipertiroides a largo o corto plazo no altera la actividad D1 hepática, pero disminuye la concentración de su mRNA (García-G *et al.*, 2004; Mol *et al.*, 1999); el hipotiroidismo a largo plazo incrementa tanto la actividad D1, como los niveles de su mRNA (van der Geyten *et al.*, 2001).

## 2. DESYODASA TIPO 2 (D2)

**a. Localización.** 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. En el cerebro se expresa predominantemente en los tanocitos, que son las células astrogliales que recubren el tercer ventrículo (Bianco *et al.*, 2002; St. Germain, 1999). Sin embargo, también se ha descrito su expresión en tejidos tiroideo, esquelético y cardíaco de humano (Hosoi *et al.*, 1999; Murakami *et al.*, 2001; Salvatore *et al.*, 1996). A diferencia de la D1, la D2 es una proteína integral de la membrana del retículo endoplásmico (RE). Su extremo NH<sub>2</sub>-terminal se localiza en el lumen del RE, mientras que el extremo COOH-terminal, incluyendo al sitio activo se encuentra orientado hacia el citosol (Baqui *et al.*, 2000).

**b. Función.** Estudios cinéticos utilizando radiomarcaje con doble isótopo han mostrado que la desyodación de T<sub>4</sub> a través de la D2 en el SNC e hipófisis hipotiroidea genera la T<sub>3</sub> que es utilizada localmente por la misma célula (Silva y Larsen, 1977). La T<sub>3</sub> producida localmente en las células que expresan D2 tiene un acceso más rápido a los TR, que la T<sub>3</sub> proveniente de la circulación. La corteza cerebral de rata, por ejemplo, produce más del 75% de la T<sub>3</sub> nuclear (Crantz *et al.*, 1982). Esto sugiere que la función de la D2 es la de asegurar el aporte de T<sub>3</sub> a la célula que la exprese y de esta manera, controlar finamente la concentración intracelular de T<sub>3</sub>. Esto además explica su expresión en el SNC, específicamente durante los periodos críticos de desarrollo fetal en donde el aporte de T<sub>3</sub> es indispensable para la neurogénesis y la mielinogénesis (Guadaño-Ferraz *et al.*, 1999; Tu *et al.*, 1997). Asimismo, la D2 juega un papel importante en la regulación de la termogénesis. En el caso del humano, el descubrimiento de la presencia del mRNA-D2 en tejidos como el esquelético, podría sugerir una importante contribución al reservorio plasmático de T<sub>3</sub> (Kim *et al.*, 1998; Bianco *et al.*, 2002).

Al igual que para el caso de la D1, ya se ha generado un ratón deficiente de D2 (D2 KO). Este animal presenta diferencias fenotípicas mínimas en comparación con el nativo. Su capacidad reproductiva se encuentra conservada y presenta ligeras anomalías durante el crecimiento. El defecto más importante encontrado es un incremento en los niveles séricos de T<sub>4</sub> y TSH, acompañado de una resistencia

hipofisiaria a TSH. De esta forma, D2 parece ser crítica para que la  $T_4$  tenga su efecto de retroalimentación negativa en la regulación de la secreción hipofisiaria de TSH (Schneider *et al.*, 2001). Mas aún, estos animales presentan un retardo en el desarrollo coclear posnatal que resulta en deficiencia de la función auditiva en la etapa adulta (Ng *et al.*, 2004). Cabe destacar que, a diferencia del resto de los vertebrados descritos a la fecha, el cerebro del ratón expresa tanto D1 como D2, por lo que la conversión intracerebral de  $T_4$  a  $T_3$  puede prevalecer por actividad de la D1 en el D2KO. Sin embargo, la coclea es un órgano cerebral que únicamente expresa D2. Así, la deficiencia funcional de este órgano en el D2KO indica la importancia de esta enzima en las células que la expresan.

**c. Características cinéticas.** A diferencia de la D1, la D2 únicamente desyoda el anillo externo de la molécula de  $T_4$ , generando a la  $T_3$ , yodotironina que exhibe la mayor actividad biológica. La D2 también es capaz de desyodar el anillo externo de la  $T_3$  y formar a la 3,5- $T_2$ , 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  $T_4$ , su substrato preferencial tanto *in vivo* como *in vitro*. Sin embargo, la baja Vmax de la D2 (rango fmol/mg/h), sugiere que la expresión de la enzima no es abundante, comparada con D1. 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; Bianco *et al.*, 2002).

**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). Los cDNAs clonados a la fecha que codifican para la D2 incluyen la de humano (Buettner *et al.*, 1998), rata (Gereben *et al.*, 2001), ratón (Davey *et al.*, 1999), pollo (Gereben *et al.*, 1999), rana (Davey *et al.*, 1995), trucha (Sanbroni *et al.*, 2001) y *Fh* (Orozco *et al.*, 2002a). El análisis de estos cDNAs ha mostrado que de las tres desyodasas, el mRNA de la D2 es el más conservado (77% de identidad molecular en el marco abierto de lectura). El mRNA D2 de *Fh* es el más pequeño descrito a la fecha (4.7 kb). Además, al igual que las otras desyodasas, la D2 también contiene el codón 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. El elemento SECIS se localiza aproximadamente 250 pb antes de la señal de poliadenilación, y en todos los casos la estructura secundaria predicha es del tipo 2. En el humano se han observado 4 transcritos distintos que parecen tener una distribución tisular diferencial, sin embargo, el significado funcional de dichos transcritos aún no ha sido dilucidado. (Bianco *et al.*, 2002; Valverde-R *et al.*, 2004).

La estructura del gen que codifica para D2 (*Dio2*) ha sido dilucidada en el humano (Celi *et al.*, 1998), el ratón (Davey *et al.*, 1999) y el *Fh* (Orozco *et al.*, 2002a). En todos los casos el gen consiste en 2 exones separados por un intrón. El segundo exón contiene el codon TGA que codifica para SeCys, la región SECIS y la señal de poliadenilación. En la región 5' existen diferencias entre las especies descritas que pudieran tener relevancia filogenética. En contraste con los *Dio2* mamíferos, el homólogo en *Fh* carece de caja TATA o CCAAT. Por otra parte, los genes de humano, rata y ratón contienen un elemento responsivo a AMPc (CRE) canónico aproximadamente 70 pb antes de la caja TATA. La presencia del sitio CRE en el promotor de la D2 explica los efectos estimulatorios del AMPc observados en BAT y células gliales (ver sección de regulación). En contraste, aún cuando se han analizado 1.3 Kb río arriba del sitio de inicio de la transcripción en el *Dio2* de *Fh* no se han encontrado regiones CRE. Más aún, únicamente el gen *Dio2* humano se estimula por el factor de transcripción tiroideo 1 (TTF-1) (Gereben *et al.*, 2001). En conjunto, estas observaciones ofrecen una explicación parcial a la expresión diferencial del *Dio2* en las distintas especies.

**e. Regulación.** La D2, al igual que la D1, puede ser influenciada por diferentes factores neuroendocrinos, así como condiciones fisiológicas. Sin embargo, el principal factor regulatorio es el estado tiroideo. Durante el hipotiroidismo se observa un marcado incremento en la actividad D2, mientras que en el hipertiroidismo disminuye su actividad. Los mecanismos de acción a través de los cuales actúan las yodotiroinas son complejos e involucran procesos tanto pre- como postraduccionales. El mecanismo postraduccionales ha sido parcialmente dilucidado. La D2 tiene una vida media muy corta (< 1 h), la cual puede acortarse aún más ante la presencia de los sustratos de la enzima,  $T_4$ ,  $rT_3$ , e inclusive  $T_3$  a altas

concentraciones. Se ha demostrado que la interacción enzima-sustrato induce la proteólisis del complejo y que este proceso es regulado por ubiquitinación (Gereben *et al.*, 2000; Steinsapir *et al.*, 2000). Sin embargo, también se ha descrito que el complejo D2-ubiquitina es sustrato de unas enzimas desubiquitinantes descritas recientemente, la VDU1 y VDU2 (enzima desubiquitinante que interactúa con la proteína von Hippel-Lindau). De este modo, la D2 puede ser sujeta a reactivación por la esta vía (Curcio-Morelli *et al.*, 2003).

El mecanismo molecular de regulación de la D2 por HT aún no es completamente comprendido. Datos experimentales indican que las HT inhiben la síntesis del mRNA D2 a través de un proceso no dependiente de síntesis proteica. En este contexto se ha inferido la presencia de un THRE negativo en la región promotora del *Dio2* de humano, sin embargo dicho elemento aún no ha sido identificado (Kim *et al.*, 1998; Bianco *et al.*, 2002).

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 AMPc en BAT, en células gliales en cultivo, en músculo esquelético y en tirocitos. Los glucocorticoides, tales como la dexametasona, también pueden tener un efecto de regulación tanto inhibitorio como estimulador, dependiendo del órgano estudiado y el tiempo de tratamiento. Otros factores que incrementan la actividad de D2 son el GMPc y las hormonas que incrementan los niveles intracelulares de éste, como son el péptido auricular natriurético y el péptido natriurético tipo C (Köhrle, 1999; Bianco *et al.*, 2002). Por otra parte, a diferencia de la D1, la D2 presenta un ritmo circádico controlado por el ciclo de luz:oscuridad. Esta ritmicidad ha sido descrita en diversas estructuras neuroendocrinas como el hipotálamo, la hipófisis, las glándulas pineal y adrenal, así como en el BAT, la glándula harderiana y la corteza cerebral (Guerrero *et al.*, 1988; Kamiya *et al.*, 1999; Luna *et al.*, 1995; Watanabe *et al.*, 2004; Yoshimura *et al.*, 2003).

### 3. DESYODASA TIPO 3 (D3)

**a. Localización:** La D3 es una selenoproteína con peso molecular de 33 kD. Se localiza en la membrana plasmática, con el sitio activo orientado hacia afuera de la célula. La D3 se expresa abundantemente en el SNC de todos los vertebrados

estudiados a la fecha (Galton y Hierbert, 1987; Kaplan y Yaskoski, 1980; Mol *et al.*, 1998; Valverde-R *et al.*, 1993). También se ha encontrada expresión abundante en la piel de la rata (Schroder-van der Elst *et al.*, 1998) y el pez (Fenton *et al.*, 1997), así como en la placenta (Roti *et al.*, 1982), el útero gestante (Galton *et al.*, 1999) el hígado embrionario del humano (Richard *et al.*, 1998), el pollo (Valverde-R *et al.*, 1993) y el cocodrilo (Shepherdley *et al.*, 2002).

**b. Función:** La D3 cataliza la desyodación del anillo interno de las desyodasas, y en todos los casos, los productos de la reacción son biológicamente inactivos. De esta forma, la principal función fisiológica de esta enzima es la contribución a la homeostasis tiroidea al proteger a los tejidos del exceso de HT. Esto es particularmente importante durante el desarrollo embrionario, un periodo en el que se expresa predominantemente la D3 y su actividad es mayor a la encontrada en tejidos adultos. Durante este periodo, la D3 presenta patrones de expresión tejido-específicos, sugiriendo que esta enzima previene la exposición prematura de los tejidos fetales a niveles inapropiados de  $T_3$ . En efecto, la exposición embrionaria a un exceso de hormonas tiroideas es altamente perjudicial (Burrow *et al.*, 1994). Del mismo modo, en los mamíferos, el útero gestante y la placeta participan en la regulación de la disponibilidad de HT al embrión, ya que ambos tejidos expresan actividad D3 abundantemente, lo que limita la transferencia de las yodotironinas al feto (Galton *et al.*, 1999; Santini *et al.*, 1999). El papel funcional de la D3 ha sido confirmado con la generación de un ratón deficiente de D3 (D3 KO). A diferencia de los ratones deficientes de D1 y D2, el D3 KO presenta características fenóticas muy marcadas. Este animal presenta retardo en el crecimiento y letalidad parcial al nacimiento. Además, cursa con tirotoxicosis neonatal seguida de hipotiroidismo persistente el resto de su vida. En fases tempranas, estos ratones presentan un aclaramiento deficiente de  $T_3$ , un incremento en los niveles séricos de esta HT, así como sobre-expresión cerebral de los genes inducidos por  $T_3$ . A partir del día posnatal 15, estos animales cursan con hipotiroidismo central con niveles séricos de  $T_3$  y  $T_4$  disminuidos y un incremento modesto de TSH. Estos resultados sugieren que la función de la D3 es crítica para la maduración y funcionamiento del EHHT, lo que resulta en un hipotiroidismo congénito con sus consiguientes deficiencias en el desarrollo (Hernandez *et al.*, 2006).

**c. Características cinéticas:** Análisis tanto *in vitro* como *in vivo* han mostrado que la D3 desyoda el anillo interno de la T<sub>4</sub>, la T<sub>3</sub> y la 3,3'-T<sub>2</sub>, sin embargo es incapaz de desyodar los respectivos derivados sulfatados. Al igual que la D2, la D3 exhibe una Km baja, en el rango nanomolar en todas las especies estudiadas a la fecha, y un requerimiento de cofactor *in vitro* alto (DTT, 50 nM). Su mecanismo de acción es de tipo secuencial, y presenta insensibilidad a la inhibición por PTU, sin embargo es inhibido por el ácido iopanóico y pobremente por la tioglucosa aurica (Bianco *et al.*, 2002).

**d. Características moleculares:** Se han identificado los cDNAs que codifican para la D3 en el humano (Salvatore *et al.*, 1995), la rata (Croteau *et al.*, 1995), el pollo (van der Geyten *et al.*, 1997), la rana (Becker *et al.*, 1995), el sapo (St. Germain *et al.*, 1994), y la tilapia (Sanders *et al.*, 1999). Todos ellos incluyen el triplete TGA que codifica para la SeCys, así como el elemento SECIS en la región 3' no traducida. Entre todas las desyodasas, la D3 es la menos conservada a juzgar por la identidad del 43% en la secuencia de nucleótidos del marco abierto de lectura (Valverde-R *et al.*, 2004).

La clonación de los genes D3 de ratón y humano han mostrado la característica particular de no presentar intrones (Hernandez *et al.*, 1998; 1999). Esta característica los incluye dentro de un raro grupo de genes sin intrones dentro del reino eucariota (6% del total). Además el *Dio3* de ratón es un gen de impronta que se expresa preferencialmente a partir del alelo paterno (Hernandez *et al.*, 2002).

**e. Regulación:** Al igual que las otras desyodasas, la D3 es finamente regulada por el estado tiroideo, incrementando durante el hipertiroidismo y disminuyendo durante el hipotiroidismo. Este patrón está conservado en todas las especies estudiadas, así como en situaciones fisiológicas que cursan con cambios del estado tiroideo. En los anfibios, por ejemplo, el incremento rápido de T<sub>3</sub> durante la premetamorfosis estimula la D3 en los renacuajos (Becker *et al.*, 1997). El mecanismo de esta regulación por yodotironinas aún no se ha desentrañado. Aún cuando la administración de T<sub>3</sub> por un periodo corto (8 días) induce un incremento en el mRNA D3, no se sabe si esto es debido a una acción a nivel genómico, a un efecto sobre la



estabilidad del mRNA ó una combinación de ambos factores (Tu *et al.*, 1999). Mas aún, el análisis de la región promotora de los genes de rata y humano mostró una modesta regulación positiva dependiente de T<sub>3</sub> (Bianco *et al.*, 2002). Por otra parte, se ha mostrado que la D3 puede ser rápidamente reciclada al compartimento endosomal temprano, de donde puede progresar al endosoma tardío y posteriormente a proteólisis lisosomal. Sin embargo, el pool de D3 puede ser potencialmente reciclado. La retención endosomal de la D3 puede explicar su larga vida media (~12 h) y permite la posibilidad de que, ante una señal específica, la D3 sea relocalizada en la superficie celular (Baqui *et al.*, 2003, Bianco *et al.*, 2002).

### **IX. LA 3,5-DIYODOTIRONINA (3,5-T<sub>2</sub>).**

Hasta hace poco tiempo se consideraba que las únicas HT activas eran la T<sub>4</sub> y la T<sub>3</sub> y que el resto de las yodotironinas correspondía a productos de catabolismo. Sin embargo, en los últimos dos lustros se han acumulando evidencias acerca de la actividad biológica de otras HT que contienen un menor número de átomos de yodo en la molécula. La 3,5-diyodotironina (3,5-T<sub>2</sub>), un metabolito que se obtiene por la desyodación del anillo externo de la T<sub>3</sub>, tiene efectos biológicos selectos similares a los de T<sub>3</sub> (Tabla 4).

La cuantificación de la concentración de la 3,5-T<sub>2</sub> ha sido complicada debido a la dificultad para obtener una 3,5-T<sub>2</sub> radio-yodada con la suficiente actividad específica que permita la cuantificación precisa de las bajas concentraciones de esta hormona. Sin embargo, recientemente se ha desarrollado un RIA que utiliza una 3-bromo-5(<sup>125</sup>I)-L-tironina como marcador (Pinna *et al.*, 1997). De esta forma, se ha confirmado la presencia de la 3,5-T<sub>2</sub> tanto a nivel circulante como tisular en el humano y en la rata. Pinna y cols (1997) encontraron una concentración circulante de esta hormona un orden de magnitud menor que la de la T<sub>3</sub> en humano. Ellos observaron que las concentraciones plasmática y cerebral de la 3,5-T<sub>2</sub> se encontraban elevadas en los pacientes que cursaban con el síndrome de eutiroidismo enfermo, en comparación con pacientes controles. Este síndrome ha sido descrito en pacientes con distintas enfermedades no tiroideas quienes cursan clínicamente con eutiroidismo a pesar de presentar niveles séricos subnormales de

T<sub>3</sub>. Se ha propuesto que la elevación de la concentración de la 3,5-T<sub>2</sub> observada pudiera explicar el mantenimiento del estado clínico de eutiroidismo en estos pacientes.

Por otra parte, se han encontrado concentraciones de 3,5-T<sub>2</sub> en el orden femtomolar, tanto en el hígado como en diversas regiones cerebrales de la rata. Las concentraciones de la 3,5-T<sub>2</sub> encontradas en ambos órganos exhiben una variación circádica paralela a la observada en la concentración de la T<sub>3</sub>, sugiriendo que esta última es efectivamente el precursor de la 3,5-T<sub>2</sub>, y que la conversión de la T<sub>3</sub> a la 3,5-T<sub>2</sub> sucede fisiológicamente a nivel intracelular (Pinna *et al.*, 2002).

Tabla 4. Resumen de los efectos descritos para 3,5-T<sub>2</sub>.

Efecto	Referencia
Incrementa la tasa de:	
Consumo de oxígeno en hígados perfundidos de ratas	Horst <i>et al.</i> , 1989
Consumo de oxígeno en células sanguíneas mononucleares	Kvetny, 1992
consumo de oxígeno por la mitocondria hepática de rata	Lanni <i>et al.</i> , 1992; O'Reilly y Murphy, 1992; Lanni <i>et al.</i> , 1993
β-oxidación	Cimmino <i>et al.</i> , 1996
metabolismo de leucina	Cimmino <i>et al.</i> , 1996
metabolismo basal	Moreno <i>et al.</i> , 1997; Lanni <i>et al.</i> , 1998; Moreno <i>et al.</i> , 2002
consumo de Ca <sup>2+</sup> mitocondrial	Hummerich y Soboll, 1989.
Incrementa la actividad de:	Ball <i>et al.</i> , 1994;
la malato deshidrogenasa	Lombardi <i>et al.</i> , 2000
la α-glicerofosfato deshidrogenasa	Lombardi <i>et al.</i> , 2000
la cadena respiratoria	Lombardi <i>et al.</i> , 1998
la citocromo oxidasa	Lanni <i>et al.</i> , 1993; Goglia <i>et al.</i> , 1994; Lanni <i>et al.</i> , 1994; Arnold <i>et al.</i> , 1998.
la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa	Lombardi <i>et al.</i> , 2000
Estimula la secreción de la hormona de crecimiento	Moreno <i>et al.</i> , 1998
Regula la actividad desyodativa	Bauer <i>et al.</i> , 1997; Garcia-G <i>et al.</i> , 2004
Efecto sobre la peroxidación lípida	Cimmino <i>et al.</i> , 1996; Varghese y Oommen, 1999.
Incrementa la resistencia al frío en ratas hipotiroideas	Lanni <i>et al.</i> , 1998.

(Modificada de Goglia, 2005)

## A. EVIDENCIAS DE LA BIOACTIVIDAD DE LA 3,5-T<sub>2</sub>

El estudio de la actividad biológica de la 3,5-T<sub>2</sub> se ha centrado primordialmente en su probable función sobre el metabolismo energético. A continuación se describen los trabajos más relevantes.

### 1. EFECTOS SOBRE EL METABOLISMO ENERGÉTICO.

La primera evidencia de la bioactividad de la 3,5-T<sub>2</sub> surgió en 1989 cuando Horst y cols. mostraron que la 3,5-T<sub>2</sub> a dosis tan bajas como 1 pM, estimulaba el consumo de oxígeno en hígados perfundidos provenientes de ratas hipotiroideas de la misma manera que la T<sub>3</sub>. Ellos mostraron que mientras que el efecto de T<sub>3</sub> era completamente abolido con el uso de PTU, un inhibidor de la actividad D1, esto no ocurría con la 3,5-T<sub>2</sub>, sugiriendo que los efectos de la T<sub>3</sub> eran secundarios a la conversión de T<sub>3</sub> a 3,5-T<sub>2</sub>. Más aún, la 3,5-T<sub>2</sub> equiparó en potencia a la T<sub>3</sub>, pero sus efectos se observaron en menor tiempo (Fig. 13).

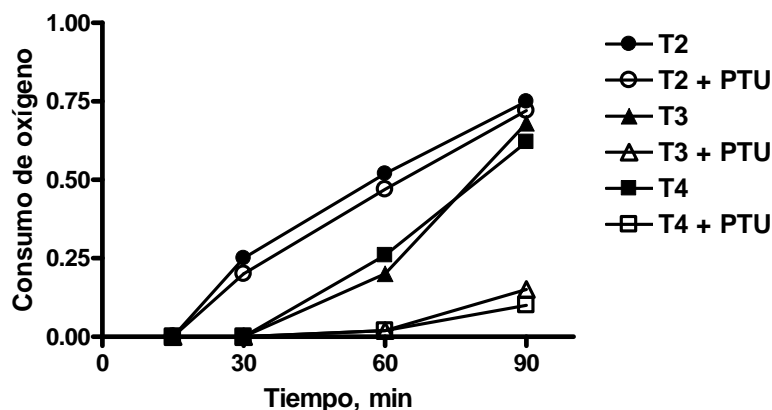


Figura 13. Efecto de las yodotironinas en el consumo de O<sub>2</sub> en hígados de ratas hipotiroideas aislados y perfundidos. Los experimentos se realizaron en presencia o ausencia de PTU. (Modificada de Horst *et al.*, 1989)

Posteriormente, a inicios de la década de los 90s, distintos grupos interesados en el estudio del metabolismo energético y de la respiración celular mostraron que la administración tanto aguda como crónica de 3,5-T<sub>2</sub> a ratas hipotiroideas resultaba en cambios significativos en la respiración mitocondrial, analizada a través de la

actividad de la citocromo oxidasa (COX). Más aún, cuando se inyectaba  $T_3$  o  $3,5-T_2$ , en forma aguda, esta última tenía un efecto más temprano en la respiración mitocondrial (1 h), mientras que el efecto de la  $T_3$  era evidente solo después de 24h. Además, el efecto observado de la  $3,5-T_2$  era independiente de la síntesis proteica ya que no era bloqueado por la administración de cicloheximida. La interpretación de estos resultados fue que el efecto de la  $3,5-T_2$  es mediado por la interacción directa a nivel mitocondrial, mientras que los efectos de la  $T_3$  se inician a nivel nuclear (Lanni *et al.*, 1992; Lanni *et al.*, 1993; O'Reilly y Murphy 1992). Resultados similares se han encontrado al analizar el consumo de oxígeno en células sanguíneas mononucleares de humano (Kvetny, 1992).

Estos efectos sobre la actividad mitocondrial estimularon el estudio referente a los posibles efectos de la  $3,5-T_2$  en la tasa de metabolismo basal (TMB) del organismo completo. El estudio realizado por el grupo de Moreno y colaboradores (1997), se basó en estudios clásicos del Dr. J-R. Tata (1962; 1963). El grupo Moreno analizó el efecto de una dosis aguda única de  $3,5-T_2$  en ratas hipotiroideas midiendo los cambios en TMB a través del tiempo y comparándolos con los efectos de la administración de una dosis similar de  $T_3$ . Para inducir el hipotiroidismo se trató a los animales con PTU, un inhibidor de la síntesis de HT y de la D1. Conjuntamente, y con la finalidad de excluir los posibles efectos provocados por los productos de desyodación de las hormonas administradas, los animales fueron tratados con ácido iopanoico (IOP), un fármaco que tiene una acción inhibitoria sobre los tres isotipos de las desyodasas (revisado por: Valverde *et al.*, 2004). De esta forma, tras el tratamiento con estos fármacos por 3 semanas, se logró provocar un hipotiroidismo severo, acompañado de una potente inhibición de las vías desyodativas. Los animales hipotiroideos presentaron una tasa de metabolismo basal significativamente menor en comparación con animales eutiroideos, mientras que en aquellos animales hipotiroideos tratados con  $T_3$  y con  $3,5-T_2$  se observó una elevación significativa de la TMB pero temporalmente distinta (Fig. 14). Efectivamente, tras 25 a 30 h de la inyección con  $T_3$  se observó un incremento de alrededor de 35% en la TMB, el cuál alcanzó su cúspide entre las 50 y 75 h post-inyección. En contraste, la inyección de una dosis similar (25  $\mu\text{g}/100\text{g}$ ) de  $3,5-T_2$  produjo un incremento de la TMB de amplitud semejante (~ 40%) pero cuyo inicio era más temprano (6-12 h posterior a la inyección), alcanzando el máximo entre las

24 y 30 h. El efecto de la 3,5-T<sub>2</sub> desapareció posterior a las 48 h post-inyección. Más aún, la administración simultánea de estas hormonas con actinomicina D, un inhibidor transcripcional, inhibió casi completamente el efecto de la T<sub>3</sub>, mientras que no modificó el efecto de la 3,5-T<sub>2</sub>, sugiriendo que esta última no requiere transcripción *de novo* para ejercer sus efectos (Lanni *et al.*, 1996; Moreno *et al.*, 1997).

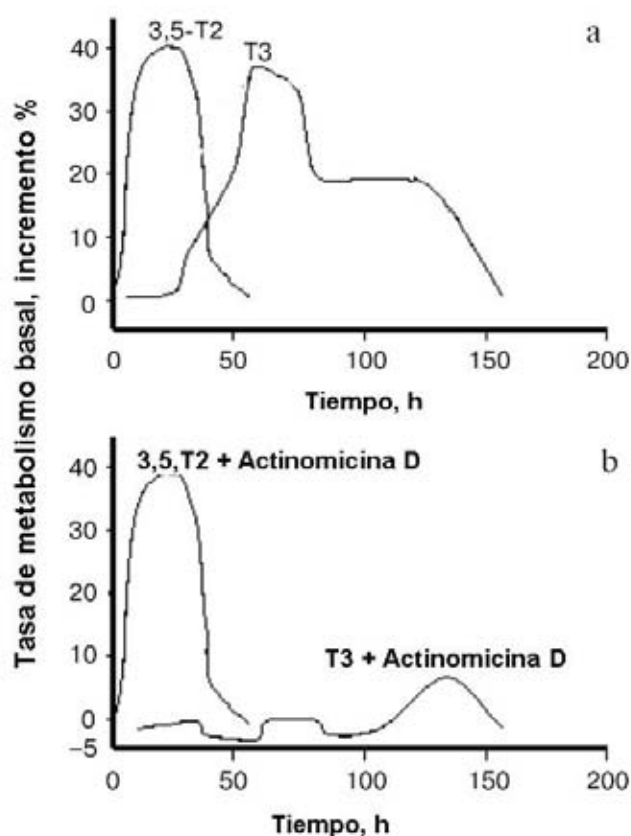


Figura 14. Cambios en la tasa de metabolismo basal en ratas hipotiroideas (a) tras la administración de yodotironinas ó (b) simultáneamente yodotironinas y actinomicina D. (Modificada de Moreno *et al.*, 1997).

Estos estudios confirmaron que la 3,5-T<sub>2</sub> ejerce efectos que no son mediados por receptores nucleares. Además, llevó a proponer la hipótesis de que la 3,5-T<sub>2</sub> es responsable de los efectos rápidos de la HT y que esta hormona pudiera ser importante en situaciones fisiológicas en las que se requiera gasto de energía adicional, como por ejemplo durante la exposición al frío. Las hormonas tiroideas juegan un papel crucial en la termogénesis, ratas hipotiroideas logran sobrevivir a la

exposición al frío únicamente de 3 a 4 días. En este sentido Lanni y cols (1998) observaron que ratas hipotiroideas que recibieron una inyección de  $T_3$  o 3,5- $T_2$  toleraban mejor la exposición al frío aparentemente a través de mecanismos diferentes. La administración de ambas HT produce un incremento del gasto energético de los animales y de la capacidad oxidativa (actividad COX) de órganos como el corazón, el músculo esquelético, el hígado y el BAT. Sin embargo, mientras que el efecto de la  $T_3$  es a través de mecanismos nucleares, el efecto de la 3,5- $T_2$  probablemente se deba a la acción directa a nivel mitocondrial, mejorando la capacidad oxidativa de estos tejidos.

Cimmino y cols (1996) han analizado el efecto de la 3,5- $T_2$  sobre el gasto energético diario, así como sobre el metabolismo de lípidos y proteínas, utilizando el modelo de ratas hipotiroideas previamente descrito (administración de PTU y IOP). Las ratas recibieron, además, una inyección diaria de  $T_3$  (1  $\mu$ g/100 g) o 3,5- $T_2$  (25  $\mu$ g/100 g). El consumo energético fue cuantificado diariamente a través del monitoreo continuo del consumo de  $O_2$  y la producción de  $CO_2$ . El consumo energético de las ratas hipotiroideas fue significativamente menor comparado con el de las ratas eutiroideas. Sin embargo, la administración tanto de  $T_3$  como de 3,5- $T_2$  restableció el consumo energético a niveles control. Así mismo, mientras que en ratas hipotiroideas se encontró disminuida la beta-oxidación e incrementado el metabolismo de leucina en comparación con las ratas eutiroideas, la administración de  $T_3$  o de 3,5- $T_2$  restituyó la actividad de ambas vías metabólicas.

Todos los estudios *in vivo* descritos hasta este punto han sido obtenidos administrando la 3,5- $T_2$  a animales hipotiroideos y con las vías desyodativas inhibidas. Sin embargo, la administración de la 3,5- $T_2$  a animales eutiroideos produce cambios mínimos o no detectables en la TMB (Moreno *et al.*, 1997). La razón de esta discrepancia aún no es completamente clara, pero se han propuesto las siguientes explicaciones: en ratas eutiroideas 1) la 3,5- $T_2$  pudiera ser rápidamente metabolizada; 2) la 3,5- $T_2$  es incapaz de entrar adecuadamente a la célula; 3) la 3,5- $T_2$  debe formarse a partir de su precursor, la  $T_3$ , para llegar a sus blancos celulares; ó 4) el estado metabólico del animal pudiera interferir en la posibilidad de la 3,5- $T_2$  para ejercer sus efectos. Con la finalidad de aclarar el tercer punto, Moreno y cols (2002) evaluaron el curso temporal del efecto calorigénico (cambios en la TMB) tras la administración de  $T_3$  o 3,5- $T_2$  a ratas eutiroideas (ratas

N). Asimismo, compararon los resultados de las ratas eutiroides con aquellos obtenidos tras la administración aguda de las mismas HT a ratas hipotiroideas tratadas con PTU y IOP (ratas P+I) por 3 semanas. Además, compararon el curso temporal de los cambios en la TMB con los cambios temporales en la concentración sérica y hepática de la 3,5-T<sub>2</sub>. La administración aguda de T<sub>3</sub> provocó un incremento significativo en la TMB que fue evidente 25 h antes en ratas N en comparación con ratas P+I (Fig. 15a).

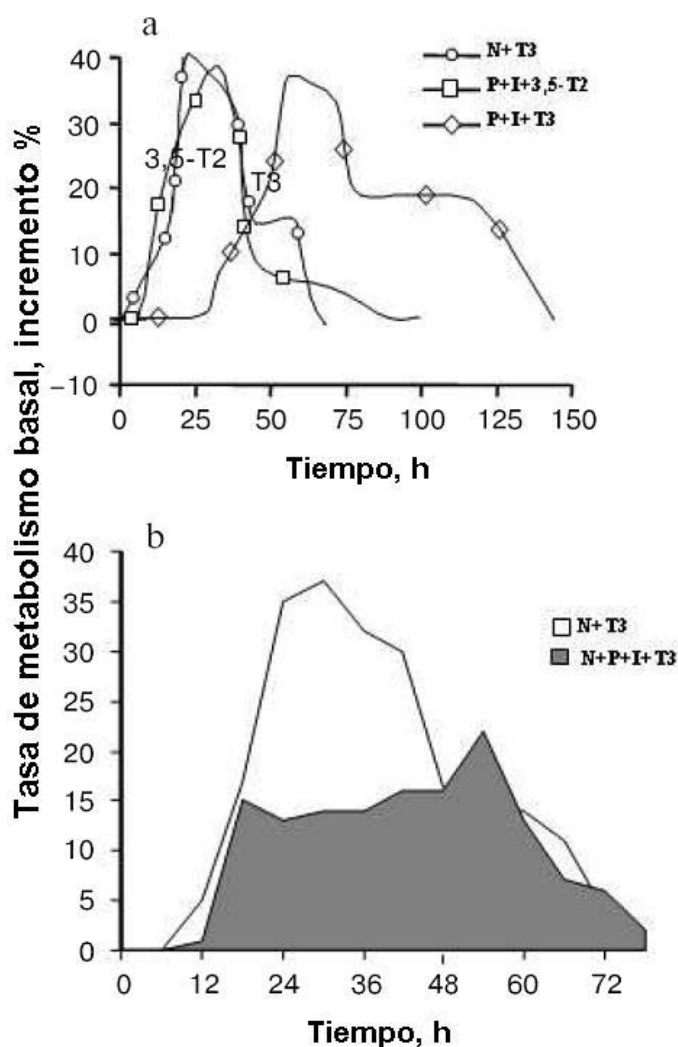


Figura 15. (a) Cambios en la TMB en ratas eutiroides (N) e hipotiroideas (P+I) tras la administración de HT y (b) efecto de la inhibición aguda de las desyodasas sobre la TMB observada tras la administración de T<sub>3</sub> a ratas N (modificado de Moreno *et al.*, 2002).

La primera fase de la respuesta en ratas N inyectadas con T<sub>3</sub> casi se sobrelapa con el efecto observado en ratas P+I tratadas con 3,5-T<sub>2</sub>. La

administración de  $T_3$  simultáneamente con actinomicina D inhibe principalmente la segunda fase del efecto en los animales N +  $T_3$ . Por otra parte, la inhibición aguda de las vías desyodativas con PTU y IOP (4 h previas a la administración de las HT) en ratas N (N + P + I +  $T_3$ ) resulta en una reducción importante de la primera fase del efecto de la  $T_3$  (Fig. 15b), sugiriendo que es necesaria la desyodación de  $T_3$  para producir la fase temprana del efecto sobre la TMB. Más aún, el máximo efecto observado tras la administración de  $T_3$  coincidió con la concentración hepática máxima de 3,5- $T_2$ . En conjunto, estos resultados indican fuertemente que: 1) parte del efecto temprano en la TMB, tras la administración de  $T_3$  a ratas N, es secundaria a su conversión hacia 3,5- $T_2$ , y 2) la 3,5- $T_2$  es formada *in vivo* a partir de la  $T_3$ . Este segundo punto es importante de hacer notar, ya que aún no se ha demostrado la conversión de  $T_3$  a 3,5- $T_2$  *in vitro*.

## 2. OTROS EFECTOS.

Se ha mostrado que la 3,5- $T_2$  es capaz de regular algunos genes que son blancos clásicos de las de HT, sin embargo los trabajos relacionados con el estudio de estos efectos no calorigénicos han sido escasos y poco consistentes. Los resultados parecen depender del modelo experimental de estudio, y en el caso de los estudios *in vivo*, del estado tiroideo de los organismos. Ha continuación se describen los trabajos más destacados.

La administración de 3,5- $T_2$  a ratas eutiroideas por dos semanas, únicamente las dosis altas (200  $\mu\text{g}/100\text{g}$  de 3,5- $T_2$  vs 15  $\mu\text{g}/100\text{g}$  de  $T_3$ ), provocan una disminución significativa en la concentración sérica de TSH (Horst *et al.*, 1995). En este mismo sentido Baur y cols (1997) obtuvieron resultados similares con la administración aguda de las HT. Al realizar un curso temporal de la concentración de TSH, ellos encontraron que únicamente obtenían una disminución similar de los niveles circulantes de TSH tras la administración de dosis ~10 veces mayores de 3,5- $T_2$ , comparadas con  $T_3$ . Sin embargo, mientras que el efecto de  $T_3$  persistía hasta las 72 h, el efecto de 3,5- $T_2$  únicamente fue significativo por 24 h. Utilizando ratas hipotiroideas (inducción con PTU), Ball y cols (1997) observaron que la administración de dosis de 3,5- $T_2$  (100 $\mu\text{g}/100\text{g}$ ) y  $T_3$  (1 $\mu\text{g}/100\text{g}$ ) induce la expresión equivalente del mRNA de la enzima málica (EM), sin embargo, esta dosis de 3,5- $T_2$



no es suficiente para producir la supresión equivalente de los niveles de TSH, siendo 3,5-T<sub>2</sub> efectiva en un 27% con respecto a T<sub>3</sub>. Sin embargo, en ratas hipotiroideas en las que además se inhibieron las vías desyodativas (inducción con PTU y IOP), la administración de 3,5-T<sub>2</sub> suprimió los valores de TSH a niveles eutiroideos, y comparables a los observados tras la administración de una dosis similar de T<sub>3</sub> (Moreno *et al.*, 1998).

La 3,5-T<sub>2</sub> y la T<sub>3</sub> fueron prácticamente equipotentes en la regulación a la baja de la expresión del mRNA TRβ<sub>2</sub> en células GH3 (derivada de tumor hipofisario de rata). Sin embargo, 3,5-T<sub>2</sub> fue 100 veces menos potente en la estimulación de la expresión del mRNA GH en estas mismas células (Ball *et al.*, 1997). En contraste, Moreno y cols (1998), utilizando su modelo de hipotiroidismo e inhibición de Ds, observaron que dosis similares (2.5 µg/100g) de 3,5-T<sub>2</sub> y T<sub>3</sub> incrementaban los niveles séricos de la GH de manera similar. En consonancia con estos resultados, Lombardi y cols (2000), utilizando este mismo modelo de hipotiroidismo, observaron que dosis similares de 3,5-T<sub>2</sub> y de T<sub>3</sub> restauraban la actividad eutiroidea tanto de la enzima málica como de la α-glicerofosfato deshidrogenasa. Más aún, la 3,5-T<sub>2</sub> a dosis de 1 µg/100 g es más potente que la T<sub>3</sub> en la estimulación de la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD). A pesar del claro efecto sobre la actividad G6PD, y en comparación con T<sub>3</sub>, 3,5-T<sub>2</sub> no modificó la expresión del mRNA G6PD y el efecto sobre la actividad enzimática no fue atenuado con el uso de inhibidores de la síntesis proteica. Estos resultados indican que la 3,5-T<sub>2</sub> actúa a través de mecanismos no nucleares en la regulación de la actividad de la G6PD.

#### **a. Efecto de la 3,5-T<sub>2</sub> sobre las desyodasas.**

Los estudios acerca del papel de la 3,5-T<sub>2</sub> en la regulación de las desyodasas son escasos y se circunscriben al efecto de esta hormona a dosis farmacológicas. Por una parte, se analizó el efecto dosis dependiente de 3,5-T<sub>2</sub>, comparado con el de una dosis de T<sub>3</sub>, sobre la actividad D1 tanto *in vivo* en hipófisis de rata, como *in vitro* en cultivos primarios de hipófisis anterior, en cultivos de células GH3 (adenoma hipofisario de rata) y de células GX (somatotrofos de humano). En todos los casos solo se observó un incremento en la actividad D1 con dosis de 3,5-T<sub>2</sub> 10 veces mayores con respecto a la dosis de T<sub>3</sub> (Baur *et al.*, 1997; Baur y Köhrle, 1999).

Previamente en el laboratorio analizamos el efecto de una exposición a corto plazo (12 y 24 h) y utilizando una misma dosis (100 nM) de las HT T<sub>4</sub>, T<sub>3</sub> y 3,5-T<sub>2</sub> sobre la actividad de la D1 y de la D2 hepática, así como sobre la expresión de sus mRNAs en el *Fundulus heteroclitus*. Nosotros observamos que aún cuando ninguna de las yodotironinas tuvo efecto sobre la actividad D1, todas ellas regularon tanto la actividad D2, así como la expresión de los mRNAs de ambas desyodasas. Más aún, el efecto observado sobre la actividad D2, fue más rápido tras la administración de 3,5-T<sub>2</sub>, en comparación con el efecto de la T<sub>3</sub> y la T<sub>4</sub>. Estos resultados mostraron que la potencia de la 3,5-T<sub>2</sub> sobre la regulación de la D1 y D2 del *Fh* era similar a la observada con las otras dos HT estudiadas. Además, la diferencia temporal entre el inicio de los efectos, sugería que la 3,5-T<sub>2</sub> pudiera estar actuando a través de mecanismos distintos a los clásicamente descritos para T<sub>3</sub> (García-G *et al.*, 2004).

## JUSTIFICACIÓN.

Como se ha revisado, la 3,5-T<sub>2</sub> es una yodotironina que se genera a través de la remoción de un átomo de yodo del anillo externo de la HT activa T<sub>3</sub>. Por mucho tiempo fue considerada un metabolito de degradación de las hormonas tiroideas. Sin embargo, desde finales de la década de los ochenta hasta la actualidad se ha ido recabando evidencia de su bioactividad, así como de su posible función fisiológica. Las evidencias más fuertes se han encontrado en la regulación del metabolismo energético, donde parece tener un papel primordial, distinto al de la T<sub>3</sub> y a través de mecanismos diferentes a los clásicamente reportados para esta última, ya que sus efectos no requieren de la síntesis proteica.

Además, también se han descrito otros efectos no calorigénicos de la 3,5-T<sub>2</sub>. Así, la 3,5-T<sub>2</sub> ha resultado bioactiva en la regulación de todos los blancos de HT estudiados hasta la fecha. Sin embargo, comparada con T<sub>3</sub>, su potencia difiere en los distintos estudios, esencialmente dependiendo el modelo experimental utilizado. No obstante, parece ser consistente que en aquellos casos en donde 3,5-T<sub>2</sub> es administrada en condiciones de hipotiriodismo farmacológico e inhibición de las vías desyodativas, sus efectos son más claros y de potencia similar a los efectos de la T<sub>3</sub>.

Como ya se ha descrito en los antecedentes, nosotros hemos encontrado que la administración de dosis farmacológicas similares de T<sub>3</sub> o de 3,5-T<sub>2</sub> en peces produce efectos de potencia similar para ambas hormonas, principalmente en la regulación de la D2 hepática en el *Fh*. Estos resultados sugerían que si la 3,5-T<sub>2</sub> era capaz de regular a la D2, enzima que regula finamente el estado tiroideo de las células que la expresan, entonces la 3,5-T<sub>2</sub> podría ser reconocida por la célula blanco como una HT activa. Así, basándonos en este postulado, proponemos lo siguiente:

## HIPÓTESIS

**“La 3,5-T<sub>2</sub> es una yodotironina bioactiva capaz de modular la expresión de distintos genes clásicamente regulados por hormonas tiroideas”.**

## OBJETIVOS.

### OBJETIVO GENERAL.

Analizar el posible papel fisiológico de la 3,5-T<sub>2</sub> sobre la modulación de genes clásicamente regulados por hormonas tiroideas en el *Fundulus heteroclitus*.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

1. Estudiar el efecto de la 3,5-T<sub>2</sub> sobre la D2 y el TRβ1, dos genes clásicamente regulados a la baja por T<sub>3</sub>.
2. Estudiar el efecto de la 3,5-T<sub>2</sub> sobre la regulación de la GH, un gen regulado a la alta por T<sub>3</sub>.
3. Estudiar el efecto de la 3,5-T<sub>2</sub> sobre la regulación de la subunidad α1 de la Na,K-ATPasa, un gen no regulado por hormonas tiroideas.
4. Estudiar el efecto de la 3,5-T<sub>2</sub> sobre los genes mencionados utilizando distintos modelos de hipotiroidismo reemplazado, tanto farmacológicos como fisiológicos.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### I. Animales.

Se utilizaron animales *Fundulus heteroclitus* 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, y se alimentaron con hojuelas para peces (Silver Cup, Nelson & Sons Inc.). Los peces se mantuvieron en condiciones de temperatura ambiente entre 26 a 28°C y bajo ciclos de luz: obscuridad 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  $46 \pm 6$  mg), congelándose inmediatamente en nitrógeno líquido y almacenándose a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior análisis. Los hígados utilizados 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 agruparon ( $n = 2-3$ ) y el RNA se extrajo como se describe en la sección correspondiente.

### II. Cuantificación de la concentración hepática de $T_3$ .

La extracción de las hormonas tiroideas de los hígados de los peces se realizó según el método previamente descrito (García-G *et al.*, 2004). Consistió en homogenizar cada hígado utilizando una solución de metanol:amonio (99:1) en una proporción 1/10 (peso/vol). El homogenado obtenido se centrifugó a 700 g por 15 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  y el sobrenadante fue desecado en un concentrador al vacío y posteriormente reconstituido en suero libre de hormonas tiroideas en una proporción de 1:4 (peso original/volumen). El porcentaje de recuperación de  $T_3$  fue del 50-70%. La determinación de la concentración de  $T_3$  se realizó por radioinmunoanálisis, utilizando las condiciones de ensayo previamente estandarizadas en nuestro laboratorio (Orozco *et al.*, 1992). Los coeficientes de variación inter- e intra-ensayo fueron de 8.3% y 6.6%, respectivamente. Se utilizó TRIS-HCl (0.05 M, pH 8.6) como buffer del ensayo. La mezcla de incubación incluyó una dilución de trabajo (1:8000) del anticuerpo (Sigma),

solución radiactiva [10 pg/100  $\mu\text{L}$   $^{125}\text{I}$ -T<sub>3</sub> (NEN); ácido 8-anilo-1-naftalensulfónico (Sigma) 4 mg/mL] y estándares de T<sub>3</sub> (Sigma; 6.25 a 1000 pg/dL) ó 25  $\mu\text{L}$  de muestra. La curva estándar contenía además una cantidad equivalente de suero hipotiroideo. La incubación se realizó por 24 h a 4°C. La separación se realizó con una solución de carbón/dextrán 0.5% (Sigma) centrifugando a 2500 rpm por 30 min a 4°C.

### III. Cuantificación de la actividad desyodativa tipo 2.

La actividad desyodativa se cuantificó mediante una modificación de la técnica de liberación de radioyodo (Leonard y Rosenberg, 1980). Esta técnica ha sido ampliamente validada en nuestro grupo de trabajo. Específicamente para el caso de las desyodasas de *Fh*, 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 D2 en los homogenados fue medida por duplicado. La mezcla de reacción (volumen total de 100  $\mu\text{L}$ ) contiene el homogenado de tejido a la concentración óptima de proteína (~ 50  $\mu\text{g}$ ), 1 nM  $^{125}\text{I}$ -T<sub>4</sub> (actividad específica 1200  $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ ; NEN) y 25 mM DTT (Calbiochem). La reacción se incubó a 37°C por una hora, y posteriormente se detiene por la adición de 50  $\mu\text{L}$  de una solución que contiene suero normal bovino al 50% y 10 mM de PTU (Sigma). Después de agregar 350  $\mu\text{L}$  de ácido tricloroacético al 10%, la mezcla se centrifuga en frío (4°C) a 2500 rpm por 15 minutos. El  $^{125}\text{I}$  liberado soluble en ácido es separado por cromatografía en columnas con una resina de intercambio catiónico (Dowex-50X2), eluido con 2 ml de ácido acético al 10% y cuantificado en un espectrómetro de emisiones gamma. Este valor permite calcular la actividad específica de la enzima que se expresa como fmolas de yodo liberado/mg de proteína/hora. La determinación de las proteínas de la muestra se realizó por el método de Bradford (Bradford, 1976).

### IV. Cuantificación de la concentración de los mRNAs D2, GH, TR $\beta$ 1 y Na,K-ATPasa $\alpha$ 1.

#### A. Extracción del RNA

Se extrajo el RNA de agrupados de hígados (n=2-3 X grupo) de *Fh* utilizando el reactivo de TRIZOL (GibcoBRL), según las indicaciones del fabricante. Éste es un

método modificado del original de Chomczynski y Sachi (1987) que contiene fenol e isotiocianato de guanidina, este último es un agente desnaturante que permite la separación del RNA de los tejidos.

#### *B. Obtención de los cDNAs.*

Se realizó la obtención de los DNAs complementarios a partir de una misma concentración de RNA total (10 µg), para todos los grupos experimentales. Para este fin, se utilizó la enzima transcriptasa reversa (Gibco, BRL). Para evitar la amplificación de fragmentos inespecíficos, y debido a que el mRNA de la D2 contiene más de 4 Kb, se utilizó un oligonucleotido anti-sentido específico complementario a una región del extremo 3' de la secuencia de esta desyodasa (TTCAGAGCTCATCTACTATCGT). En el caso de la cuantificación del resto de los mRNAs se utilizó un oligo dT para la obtención del cDNA.

#### *C. PCR competitivo para la cuantificación del mRNA D2.*

La concentración del mRNA D2 fue cuantificada por duplicado utilizando una modalidad de PCR cuantitativo que ha sido desarrollada previamente en el laboratorio (García-G *et al.*, 2004). Esta técnica permite la cuantificación del número de moléculas de un mRNA determinado presente en una muestra problema. Requiere del uso de un cDNA competidor homólogo con una pequeña diferencia de tamaño (en nuestro caso 44 pb) con respecto a su contraparte nativa. Con este cDNA competidor, a concentraciones conocidas, se construye una curva estándar. Se prepara así una reacción de PCR para cada uno de los puntos de la curva estándar y todas las reacciones contienen una concentración constante del cDNA problema (RT). El PCR incluye un par de oligonucleotidos específicos (Tabla 5) 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 1.5% (Invitrogen) y analizados por densitometría (Electrophoresis Documentation and Analysis 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.

#### *D. PCR en tiempo real para la cuantificación de los mRNAs GH, TR $\beta$ 1 y Na,K-ATPasa $\alpha$ 1.*

##### 1. Clonación de los cDNAs.

La secuencia de los cDNAs del *Fh* que codifican para la Na,K-ATPasa  $\alpha$ 1 (Semple *et al.*, 2002) así como la secuencia de la  $\beta$ -actina (no. de acceso: CN985078), el gen casero de referencia que utilizamos, ya han sido reportada previamente en la literatura. En estos casos se diseñaron oligonucleótidos de los extremos 5' y 3' con la finalidad de clonar dichos cDNAs.

Para realizar la cuantificación de los mRNAs GH y TR $\beta$ 1 fue necesario primero clonarlos. El TR $\beta$ 1 se clonó a partir de RNA de hígado de *Fh*. Se diseñaron un par de oligonucleótidos degenerados, basándonos en las secuencias de nucleótidos reportadas en distintos peces (Marchand *et al.*, 2001). Utilizando dichos oligonucleótidos en un "PCR touchdown" obtuvimos un fragmento de ~230 pb (TR $\beta$ 1) el cual guarda una identidad del 84% con el resto de las secuencias reportadas. Este fragmento fue utilizado para la generación de la respectiva curva estándar.

El cDNA GH se clonó a partir de RNA de cerebro de *Fh*, el cual fue usado como templado en una reacción de transcripción reversa con un oligo-dT que contiene un adaptador. Se diseñó un oligonucleótido degenerado sentido, que contiene una secuencia conservada en 35 cDNAs de GH de distintos teleosteos reportadas en el GenBank (CFKKDMHK). Dicho oligonucleotido fue utilizado junto con un oligonucleotido de la secuencia del adaptador en una reacción de PCR touchdown, generando un primer fragmento que incluía el codón de paro del cDNA GH de *Fh*. Para amplificar el extremo 5' se realizó la transcripción reversa utilizando un oligo antisentido específico en base a la secuencia obtenida. Dicho cDNA fue tratado con transferasa terminal y dCTPs a fin de agregar una extensión de poli(dC) en la región 3'. El producto de esta reacción fue purificado y utilizado como templado en una serie de PCR anidados en los que se utilizó un oligo-dG sentido, y oligonucleotidos



antisentido específicos, con la finalidad de amplificar el extremo 5' (5'-RACE). Los productos de los PCRs (touchdown, 5'-RACE) fueron clonados en el vector pGEM<sup>T</sup> (Promega), transformados en células habilitadas de *E. coli* y secuenciados (Sequenase, Amersham). El marco abierto de lectura del cDNA de GH obtenido guarda una identidad del 64% con las 35 secuencias reportadas en el GenBank.

A partir de las secuencias de los cDNAs clonados se diseñaron un par de oligonucleotidos para cada cDNA (Tabla 5). Dichos pares de oligonucleotidos generan fragmentos de entre 150 y 250 pb, y se utilizaron en las reacciones de PCR en tiempo real. En todos los caso los cDNAs fueron clonados en el vector pGEM<sup>T</sup> (Promega) y transformados en células habilitadas de *E. coli* y fueron usados para generar las curvas estandar.

## 2. Preparación de las curvas estándar.

Se determinó la concentración de los cDNAs 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/ $\mu\text{L}$  con la siguiente formula:

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

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

Con base en las concentraciones calculadas, se prepararon los distintos puntos de la curva que fueron utilizados como templados en reacciones de PCR en tiempo real para generar la curva estándar para cada uno de los cDNAs. En todos los casos, tras el calculo de la regresión lineal, los parámetros de coeficiente de regresión ( $r > 0.99$ ) y de pendiente (-5.7 a -2.9) se encontraron dentro de lo recomendado.

Tabla 5. Oligonucleotidos utilizados y tamaño de los productos.

Gen	oligo sentido	oligo antisentido	Producto (pb)
D2	CAAACAGGTGAAACTGGCT	TCGTCGATGTAGACCAGC	270 ó 310*
GH	GATCTCCCCAAACTGTCA	GACTCATCAGCTTCCAGACT	146
Na,K-ATPasa $\alpha$ 1	GGAAGTCCAGAGGAATTG	GGAGACCTTCTGGCACATTA	256
TR $\beta$ 1	TGAGTGCAGGGGGGTGAAG	GCAGCTCACAGAACATGGGC	180
$\beta$ -actina	GCGACATCAAGGAGAAGCT	CGACGTCGCACTTCATGAT	233

(\*Tamaño de los productos D2 obtenidos a partir de la muestra problema o del cDNA competidor, respectivamente)

### 3. Cuantificación de los mRNAs GH, TR $\beta$ 1 y Na,K-ATPasa $\alpha$ 1.

La cuantificación de los mRNAs se realizó por duplicado utilizando la modalidad de PCR en tiempo real. Para cada uno de los genes estudiados la reacción incluyó: 1  $\mu$ L de la reacción de transcripción reversa, 7.5  $\mu$ L del reactivo TAQurate GREEN Real-Time PCR MasterMix (EPICENTRE) y 500 nM de los oligonucleótidos específicos (Tabla 5) sentido y antisentido, en un volumen final de 15  $\mu$ L. La detección y análisis de datos se realizó con un aparato Light Cycler (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Alemania) según las instrucciones del fabricante. El análisis incluyó una curva de disociación para descartar la formación de productos inespecíficos. Los resultados se corrigieron con respecto a la concentración de  $\beta$ -actina de cada muestra.

## V. Diseños experimentales.

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, previamente mostramos que la administración por inmersión de una dosis de 100 nM de T<sub>3</sub> provocaba un incremento significativo en la concentración intrahepática de esta HT en los peces (García-G *et al.*, 2004). Basándonos en estos resultados, los tratamientos experimentales en la presente tesis fueron por inmersión.

### A. Modelo de hipertiroidismo.

Con la finalidad de profundizar en la caracterización de los efectos de la 3,5-T<sub>2</sub> a dosis farmacológicas se realizó una curva dosis respuesta (10, 30, 100 y 300 nM) a T<sub>3</sub> y a 3,5-T<sub>2</sub>. Así mismo se realizó un curso temporal utilizando la dosis de 100 nM tanto de T<sub>3</sub> como de 3,5-T<sub>2</sub>.

#### 1. Curva dosis respuesta.

Grupos de peces (n = 10 c/u) fueron colocados en tanques separados en los que se les administro por inmersión diversas dosis (0, 10, 30, 100, 300 nM) de T<sub>3</sub> ó 3,5-T<sub>2</sub>. Posteriormente los animales fueron sacrificados a las 24h. Los hígados fueron disectados y almacenados a -70°C hasta su procesamiento.

## 2. Curso temporal.

Dos grupos de peces ( $n = 40$  c/u) fueron colocados en tanques separados en los que se les administró por inmersión una dosis de 100 nM de  $T_3$  ó 3,5- $T_2$ . Posteriormente los animales ( $n = 6$ ) fueron sacrificados a distintos tiempos (0, 3, 6, 12 y 24h) y sus hígados disectados y almacenados a  $-70^\circ\text{C}$  hasta su procesamiento.

### *B. Modelo de hipotiroidismo farmacológico y reemplazo con hormonas tiroideas.*

Como un acercamiento para evaluar la posible función de la 3,5- $T_2$  *in vivo* bloqueamos la síntesis de HT tratando con metimazol (por inmersión) a 4 grupos de peces ( $n = 12$ ) en una dosis de 4.5 mM por un periodo de 5 días. A tres de los grupos tratados con MMI se les administró además una dosis de reemplazo de 30 nM (administración por inmersión) de una de la siguientes tironinas, como una medida para restablecer el estado eutiroideo: 3,5- $T_2$ , la yodotironina activa  $T_3$  como control positivo y como control negativo la molécula inactiva  $rT_3$ , durante el mismo periodo de tiempo. Después de 5 días de tratamiento los animales fueron sacrificados junto con un grupo control y el hígado fue disectado y almacenado a  $-70^\circ\text{C}$ . Los hígados de cada grupo fueron segmentados en dos fragmentos: uno para la determinación de la actividad desyodativa y otro para la determinación de la concentración de los mRNAs. Hígados completos fueron utilizados para determinar la concentración de la  $T_3$  intrahepática.

### *C. Modelo de hipotiroidismo secundario al reto hidrosmótico.*

Previamente en el laboratorio se había observado que la exposición de los *Fh* a un medio hipoosmótico (de 100% a 50% agua salada; AS) provoca un incremento en la actividad D2 a las 12 h de exposición (Orozco *et al.*, 1998). Dicho incremento también se ha observado en la expresión de mRNA D2 inclusive a tiempos más cortos (López-Bojórquez *et al.*, 2007). Pensamos que si la 3,5- $T_2$  es bioactiva, entonces sería capaz de revertir el incremento de la D2 resultante del cambio en la salinidad medioambiental. Así, realizamos el siguiente experimento. Cuatro grupos de peces

(n=6) fueron expuestos a un reto hipoosmótico (50% AS) por 12 h. Además, a tres de estos grupos se les administro una de las siguientes tironinas: T<sub>3</sub>, rT<sub>3</sub> ó 3,5-T<sub>2</sub>, a una dosis de 30 nM (administración por inmersión) durante el mismo tiempo. Los animales fueron sacrificados a las 12 horas de tratamiento junto con un grupo control y los hígados fueron disectados y almacenados a -70°C. De cada hígado se obtuvieron dos fragmentos: para la determinación de la actividad desyodativa ó la determinación de la concentración de los mRNAs.

#### D. *Modelo de hipotiroidismo por hipercortisolismo.*

Previamente en el laboratorio se había observado que el tratamiento con cortisol (25 µg/g X 48h, implante ip) provocaba un incremento en la actividad D2 (Orozco *et al.*, 1998). Este incremento se puede explicar debido a que el cortisol aumenta la tasa de recambio metabólico de las HT en peces (Orozco y Valverde, 2005). De esta manera, al aumentar la degradación de las yodotironinas activas, aumenta la expresión de la enzima que cataliza su formación. Nosotros proponemos que la administración simultánea de cortisol con las hormonas tiroideas con actividad biológica (T<sub>3</sub> y 3,5-T<sub>2</sub>) cancelará dicho incremento en la actividad D2. Con la finalidad de demostrar esta regulación, 4 grupos de animales (n = 12) recibieron un implante de cortisol ip (25 µg/g) y 3 de los grupos fueron tratados además con las HT: T<sub>3</sub>, rT<sub>3</sub> y 3,5-T<sub>2</sub> a una dosis de 30 nM por 48 h. Al termino del tratamiento los animales fueron sacrificados junto con un grupo control y los hígados fueron disectados y almacenados a -70°C. Los hígados de cada grupo fueron segmentados en dos fragmentos: uno para la determinación de la actividad desyodativa y otro para la determinación de la concentración de los mRNAs; hígados completos fueron utilizados para determinar la concentración de la T<sub>3</sub> intrahepática.

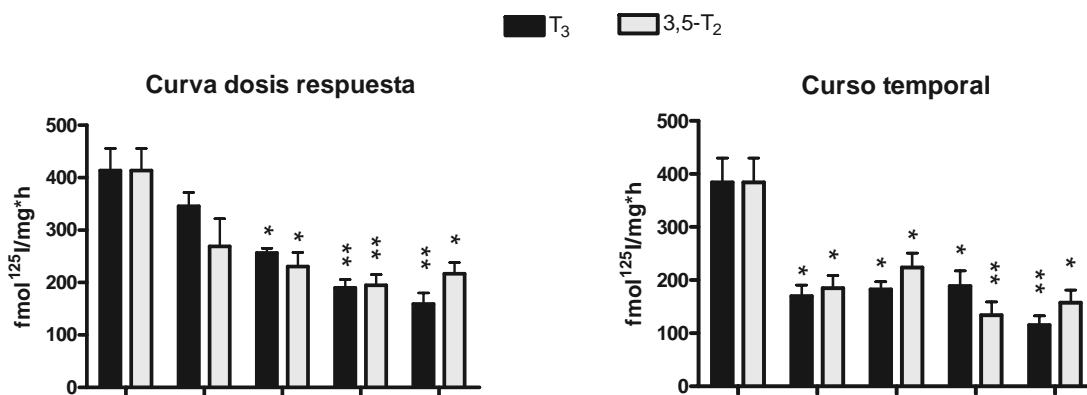
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Previamente habíamos demostrado que durante el hipertiroidismo farmacológico y de manera semejante a como ocurre con  $T_3$ , la  $3,5-T_2$  es bioactiva al regular la actividad y la expresión de la D2 hepática del *Fh* (García-G *et al.*, 2004). La D2 es la enzima cuya actividad asegura el aporte de HT activa a nivel celular. Su expresión genómica, así como su actividad son finamente regulados a la baja por el estado tiroideo en todos los vertebrados estudiados a la fecha (Bianco *et al.*, 2002; Orozco y Valverde-R, 2005; Bianco y Larsen, 2005). Se ha propuesto que la D2 es la enzima que cataliza la formación de la  $3,5-T_2$ . Esto, aunado al hecho de que el efecto observado tanto con  $T_3$  como con  $3,5-T_2$  fue similar en intensidad, nos permitió proponer que la  $3,5-T_2$  pudiera tener relevancia fisiológica regulando a la enzima que la genera, al menos en nuestro modelo experimental. De esta forma, el propósito del presente trabajo fue profundizar en el estudio de los efectos de la  $3,5-T_2$ . En todos los casos se analizaron los posibles efectos de la  $3,5-T_2$  sobre la respuesta de la D2 y otros genes de expresión hepática. A continuación se discuten los resultados obtenidos en las distintas manipulaciones fisiológicas estudiadas.

### I. MODELO DE HIPERTIROIDISMO.

Se utilizó el modelo de hipertiroidismo farmacológico para continuar con la caracterización del efecto de la  $3,5-T_2$  sobre la D2. Se realizó tanto una curva dosis respuesta como un curso temporal, comparando los resultados con el clásico efecto de la  $T_3$  sobre la D2 (Bianco *et al.*, 2002; Bianco y Larsen 2005; Kuiper *et al.* 2005). Como se observa en la figura 16, dosis crecientes tanto de  $3,5-T_2$  como de  $T_3$  tuvieron un efecto dosis-dependiente similar sobre la actividad D2. Dicho efecto resultó significativo con la dosis de 30 nM de ambas hormonas, alcanzando la máxima inhibición con la dosis de 100 nM. Así, el análisis de las distintas dosis no mostró diferencias significativas entre las dos hormonas estudiadas, sugiriendo que la  $3,5-T_2$  es equipotente a  $T_3$  en la regulación de la actividad D2 hepática. Así mismo, el curso temporal realizado

muestra resultados similares para ambas hormonas, las cuales producen una inhibición significativa de la actividad D2 desde las 3 h post-inmersión. Estos resultados complementan los obtenidos previamente (García-G *et al.*, 2004) y apoyan la noción de que el efecto de la 3,5-T<sub>2</sub> sobre la actividad D2 hepática del *Fh* es comparable al de la hormona activa T<sub>3</sub>.

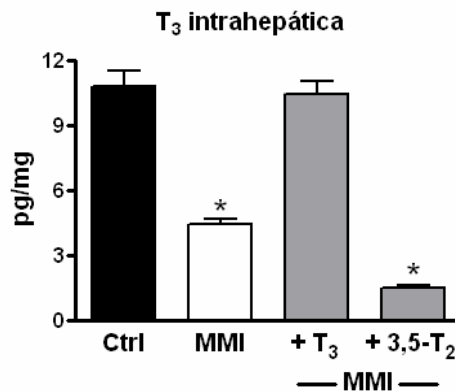


**Figura 16.** Actividad D2. Curva dosis respuesta tras la administración de T<sub>3</sub> ó 3,5-T<sub>2</sub> (0, 10, 30, 100 y 300 nM) por 24h (n = 10) y curso temporal (3, 6, 12, 24 h) tras la administración por inmersión (100 nM) de T<sub>3</sub> ó 3,5-T<sub>2</sub>. (n = 6) \*p<0.01, \*\*p<0.001.

## II. MODELO DE HIPOTIROIDISMO FARMACOLÓGICO Y REEMPLAZO CON HORMONAS TIROIDEAS.

Una vez demostrada la equivalencia del efecto de dosis farmacológicas de la 3,5-T<sub>2</sub> y la T<sub>3</sub>, sobre la actividad D2, el siguiente paso fue investigar su posible efecto en condiciones lo más cercanas a una situación fisiológica (eutiroides) posible. Para cumplir con este fin, se utilizó un modelo de hipotiroidismo farmacológico en el cual fueron administradas dosis de reemplazo de distintas hormonas tiroideas con la finalidad de restablecer el estado eutiroides. Debido a la dificultad para medir las concentraciones intrahepáticas de la 3,5-T<sub>2</sub>, y basándonos en los resultados anteriores que mostraban que 3,5-T<sub>2</sub> y T<sub>3</sub> eran equivalentes en sus efectos sobre la D2 en condiciones de hipertiroidismo, decidimos establecer la dosis de reemplazo en base a la dosis de T<sub>3</sub> necesaria para mantener el eutiroidismo a nivel

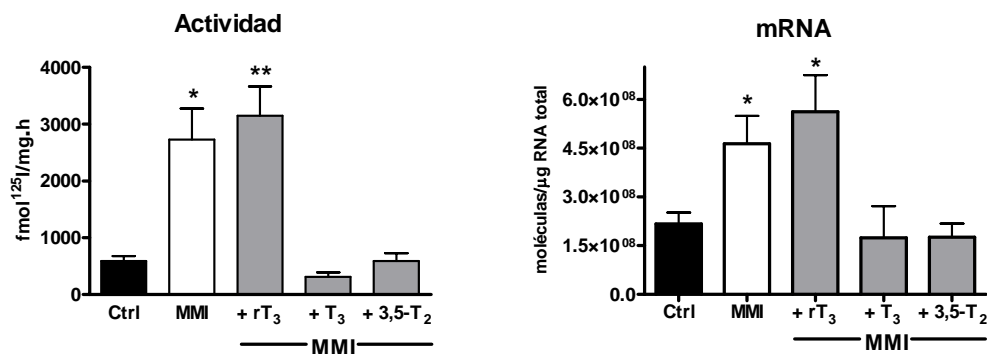
intrahepático. El tratamiento con MMI (4.5 mM) por 5 días resultó efectivo para inducir concentraciones intrahepáticas de  $T_3$  hipotiroideas, como se muestra en la figura 17, en donde se observa que el grupo tratado únicamente con este fármaco antitiroideo presentó una disminución significativa (~50% vs control) en la concentración intrahepática de  $T_3$ . Por otra parte se estableció experimentalmente que 30 nM funcionaba como dosis de reemplazo, ya que esta dosis restauró la concentración intrahepática de  $T_3$  en los animales co-tratados con MMI y  $T_3$ . Como se esperaba, la concentración intrahepática de  $T_3$  en animales reemplazados con una dosis similar de 3,5- $T_2$  no fue mayor a la del grupo hipotiroideo. Este hallazgo es importante ya que muestra que el hígado de los animales co-tratados con MMI + 3,5- $T_2$  cursó con deficiencia (hipotiroidismo) de  $T_3$ .



**Figura 17.** Concentración intrahepática de  $T_3$  cuantificada por RIA en animales tratados con MMI (4.5 mM) y reemplazados con  $T_3$  o 3,5- $T_2$  (30 nM) por 5 días ( $n = 6 \pm$  SEM;  $p < 0.01$ ).

Se midió el efecto de la administración de dosis de reemplazo de  $T_3$ ,  $rT_3$  y 3,5- $T_2$  sobre la expresión y la actividad de la D2 hepática. Nuestra hipótesis proponía que de ser 3,5- $T_2$  biactiva, los animales reemplazados tanto con  $T_3$  como con 3,5- $T_2$  mantendrían la expresión y la actividad D2 en condiciones eutiroideas, más no aquellos reemplazados con el metabolito inactivo  $rT_3$ . Como se muestra en la figura 18, el bloqueo de la producción de hormonas tiroideas con MMI indujo un aumento significativo de 4.6 y 1.8 veces sobre la actividad enzimática y la expresión del mRNA D2, respectivamente. Apoyando nuestra hipótesis, el tratamiento con  $rT_3$  no tuvo efecto sobre el incremento de la D2 inducido por el tratamiento con MMI. Sin embargo, la co-administración con

T<sub>3</sub> canceló el incremento en la D2 a ambos niveles, manteniendo la expresión de la D2 en niveles eutiroides. Este conjunto de resultados son consistentes con la bien conocida regulación fina de la expresión de la D2 en mamíferos por el estado tiroideo (Bianco *et al.* 2002; Bianco y Larsen 2005; Kuiper *et al.* 2005). A pesar de que los animales reemplazados con 3,5-T<sub>2</sub> presentaron niveles hipotiroideos de T<sub>3</sub> intrahepática, la expresión del mRNA de la D2 y la actividad enzimática se mantuvieron en niveles similares a los de los grupos control y reemplazado con T<sub>3</sub> (Fig. 18). Dado a que la 3,5-T<sub>2</sub> fue capaz de mantener la expresión eutiroides de la D2 en el hígado y siendo esta enzima la responsable de mantener la homeostasis tiroidea a nivel celular, propusimos que la 3,5-T<sub>2</sub> tenía efecto sobre otros genes blanco clásicos de hormonas tiroideas.



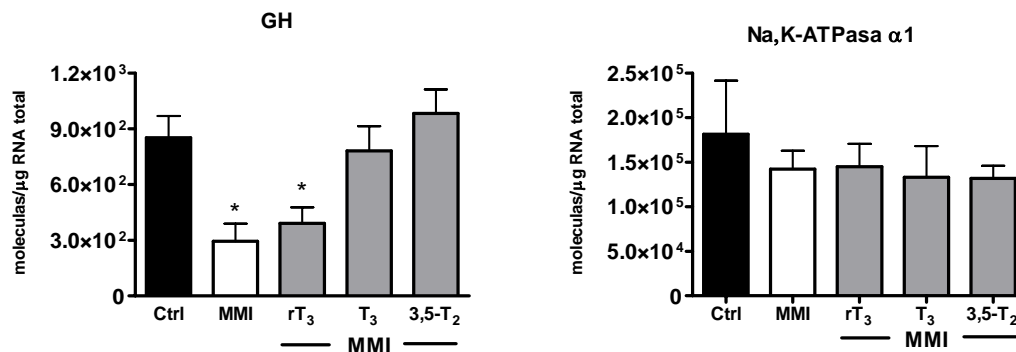
**Figura 18.** Actividad D2 (método de radioyodo liberado) y concentración del mRNA D2 (PCR competitivo) en animales tratados con MMI (4.5 mM) y reemplazados con T<sub>3</sub>, rT<sub>3</sub> ó 3,5-T<sub>2</sub> (30 nM) comparada contra un grupo control (n = 6 ± SEM; \*p<0.01, \*\*p<0.001).

Para probar esta nueva hipótesis, analizamos el efecto de la 3,5-T<sub>2</sub> sobre la expresión del gen que codifica para GH, un gen que es regulado a la alta por las hormonas tiroideas (Glass *et al.* 1987; Koenig *et al.* 1987). Al igual que lo reportado en la trucha (Yang *et al.*, 1999), en este trabajo nosotros mostramos la expresión hepática de la GH en el *Fh*. Como se muestra en la figura 19 y tal como se esperaba (Hulbert, 2000), la inhibición de la síntesis de HT por MMI indujo una disminución de 3 veces en la expresión del mRNA de GH con respecto al grupo control. De manera similar a lo observado en la



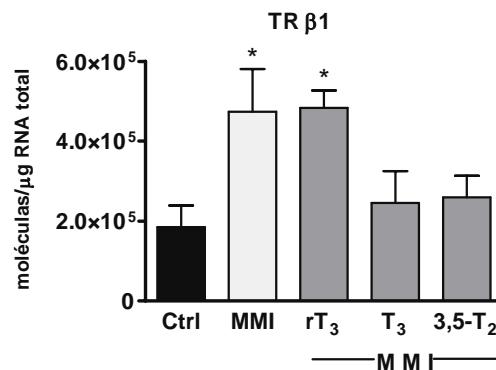
regulación de la D2, el efecto del MMI fue bloqueado con la co-administración de 30 nM de  $T_3$ , mas no con la de  $rT_3$ . Sin embargo, el tratamiento de MMI + 3,5- $T_2$  mantuvo los niveles del mRNA de GH similares a los de los grupos control y reemplazado con  $T_3$ . Estos datos apoyan la hipótesis de que la 3,5- $T_2$  es activa y capaz de mantener la expresión eutiroidea de la GH aún cuando el organismo es depletado de  $T_3$ .

La D2 y la GH son dos genes clásicamente regulados por el estado tiroideo. Con el propósito de determinar la especificidad de los efectos de la 3,5- $T_2$  en genes tironino-dependientes, estudiamos su efecto sobre un gen no regulado por HT, la Na,K-ATPasa  $\alpha 1$ . A diferencia de las subunidades  $\alpha 2$  y  $\beta$ , la expresión de la subunidad  $\alpha 1$  no es regulada por el estado tiroideo (Horowitz *et al.*, 1990; Ewart y Klip, 1995). Este gen ha sido previamente clonado en el *Fh* y se ha demostrado su expresión hepática (Semple *et al.*, 2002). Nuestros resultados (Fig. 19) muestran que tanto el hipotiroidismo inducido con MMI, como el reemplazo con  $T_3$ ,  $rT_3$  ó 3,5- $T_2$  no modifican la expresión del gen Na,K-ATPasa  $\alpha 1$ . Aún cuando estos resultados sugieren que el efecto biológico de la 3,5- $T_2$  se constriñe a aquellos genes clásicamente regulados por las yodotironinas, es necesario el análisis de otros genes no HT-dependientes para confirmar esta posibilidad.



**Figura 19.** Concentración (moléculas/ $\mu$ g RNA total) de los mRNAs de GH y de Na,K-ATPasa  $\alpha 1$  en animales tratados con MMI (4.5 mM) y reemplazados con 30 nM de  $T_3$ ,  $rT_3$  ó 3,5- $T_2$  comparada contra un grupo control (n = 3 pools  $\pm$  SEM;  $p < 0.01$ ).

Otros autores han reportado que la 3,5-T<sub>2</sub> presenta una afinidad muy baja por los TR tanto en algunas especies de mamíferos (Leeson *et al.*, 1988) como en teleósteos (Darling *et al.*, 1982; Bres y Eales, 1986), sin embargo nuestros resultados sugieren que la 3,5-T<sub>2</sub>, al igual que la T<sub>3</sub>, actúa directamente en la regulación de genes HT-dependientes. Un acercamiento indirecto para estudiar la posible participación de los receptores a hormonas tiroideas en el mecanismo de acción de la 3,5-T<sub>2</sub> fue analizar la expresión del TRβ1, principal TR hepático, en los distintos grupos experimentales. La autorregulación de la expresión de los TR ha sido ampliamente demostrada en distintas especies de vertebrados (Hodin *et al.*, 1990; Kanamori y Brown, 1992; Ball *et al.*, 1997). Este tipo de regulación es dependiente del estado tiroideo de los organismos, particularmente de los niveles de T<sub>3</sub>. Como se muestra en la figura 20, el hipotiroidismo indujo un incremento en la expresión del mRNA TRβ1. Dicho incremento es bloqueado por la administración de la hormona activa T<sub>3</sub> y 3,5-T<sub>2</sub>, más no con rT<sub>3</sub>. Estos resultados sugieren que este receptor pudiera ser parte de la maquinaria transcripcional que media la acción tanto de la T<sub>3</sub> como de la 3,5-T<sub>2</sub>.



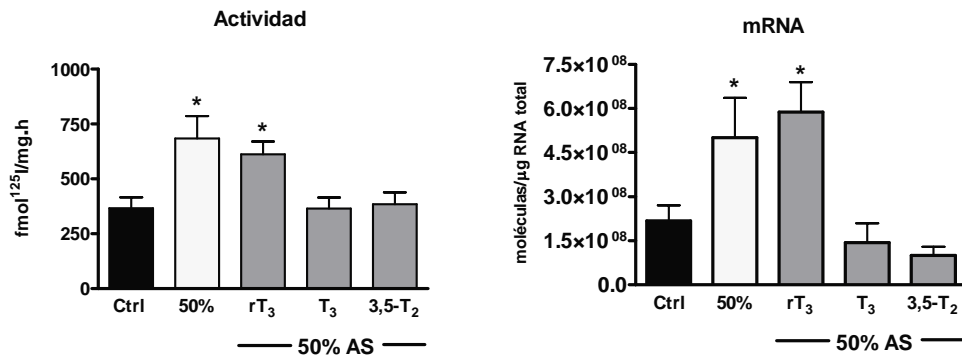
**Figura 20.** Concentración (moléculas/μg RNA total) del mRNA TRβ1 en animales tratados con MMI (4.5 mM) y reemplazados con 30 nM de T<sub>3</sub>, rT<sub>3</sub> ó 3,5-T<sub>2</sub> comparada contra un grupo control (n = 3 pools ± SEM; p<0.01).

Los resultados demuestran que la 3,5-T<sub>2</sub> es una hormona activa capaz de regular la actividad y expresión de la D2, así como la expresión de otros genes como la GH y el TRβ1. Además muestran que sus efectos son comparables a los de la hormona activa T<sub>3</sub>, cuando se utilizan a concentraciones equivalentes.

### III. MODELO DE HIPOTIROIDISMO SECUNDARIO AL RETO HIDROOSMÓTICO.

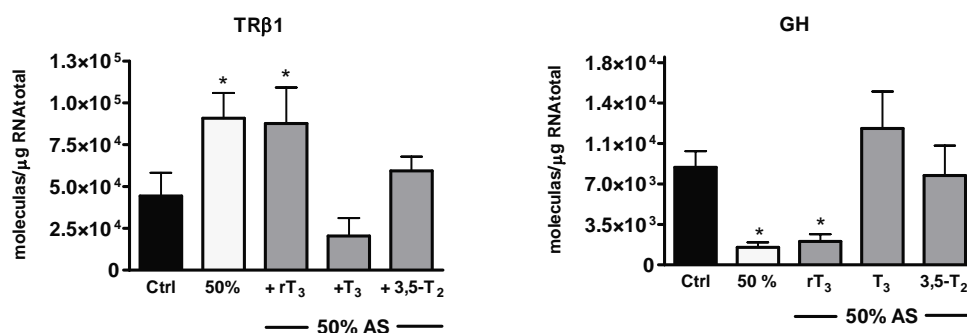
Como un acercamiento adicional al estudio de la posible bioactividad de la 3,5-T<sub>2</sub>, decidimos incluir el modelo del reto hipoosmótico. Se trata de una condición fisiológica que brinda una serie de ventajas experimentales, como se describe a continuación.

El *Fh* es una especie eurihalina, es decir, resiste amplios rangos de salinidad medioambiental. Para lograr contender con dichos cambios se requieren de la participación del sistema neuroendocrino (anexo I). Aún cuando la información es escasa, existe evidencia que indica que dentro de los factores neuroendocrinos que participan en la regulación hidroosmótica se encuentran las HT. Estudios previos han mostrado que el curso temporal de la exposición del *Fh* a un reto hipoosmótico (de 100% a 50% agua salada; AS) inducía un incremento en la actividad D2 hepática a partir de las 12 h post-reto que se sostenía hasta por 72 h post-reto (Orozco *et al.*, 1998). En apoyo a esta respuesta, estudios recientes han identificado la presencia de dos elementos de respuesta osmótica (ORE) funcionales en la región promotora del gen de la D2 del *Fh* (López-Bojórquez *et al.*, 2007). La regulación a la alta de la D2 apoyaba la participación de las yodotironinas durante la adaptación hidroosmótica. Estos hechos nos permitieron utilizar el reto hidroosmótico como un modelo fisiológico para evaluar la bioactividad de la 3,5-T<sub>2</sub>. Así, propusimos que la demanda metabólica que implica el contender con un reto hipoosmótico aumenta la utilización de las HT bioactivas de tal suerte que algunos tejidos (*vgr.* el hígado) entran en un estado hipotiroideo. Este hipotiroidismo induciría, no solo un aumento en la expresión de la D2, sino también de los TRβ1. El aporte exógeno con las HT bioactivas cancelaría la regulación a la alta de ambos genes. En efecto, como se muestra en la figura 21, animales retados y co- tratados con T<sub>3</sub> y 3,5-T<sub>2</sub> no mostraron el incremento en la actividad D2 y en la expresión de su mRNA. En contraste y como esperado, los animales retados sin y con el co-tratamiento con la hormona inactiva rT<sub>3</sub> mostraron un incremento en la actividad y la concentración del mRNA D2 con respecto al grupo control. Este patrón de respuesta se observa también en el gen del TRβ1 (Fig. 22).



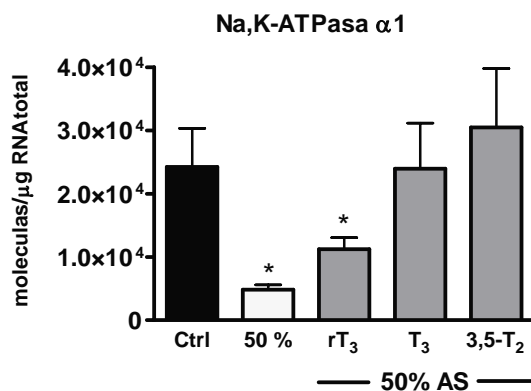
**Figura 21.** Actividad D2 y concentración del mRNA D2 en animales sometidos a un reto hipoosmótico (50% AS X 12 h) y tratados con 30 nM T<sub>3</sub>, rT<sub>3</sub> ó 3,5-T<sub>2</sub> comparado con un grupo control (n = 6 ± SEM; p < 0.01).

El bloqueo tanto del aumento de la actividad D2 así como de la expresión de la D2 y el TRβ1 por T<sub>3</sub> y 3,5-T<sub>2</sub> sugiere que estas dos hormonas suplen la demanda de HT necesaria para contender con el cambio en la salinidad medioambiental. Para profundizar en esta hipótesis estudiamos la posible regulación de la expresión del gen de la GH, que además de ser tironino-dependiente, es regulado a la baja por hipoosmolaridad. Como se observa en la figura 22, la exposición al reto hipoosmótico induce una disminución significativa (3 X) en la expresión hepática del gen que codifica para la GH de manera similar a lo obtenido con el modelo de hipotiroidismo farmacológico. Más aún, el tratamiento con T<sub>3</sub> y con 3,5-T<sub>2</sub> más no con rT<sub>3</sub>, previene dicha disminución observándose niveles eutiroides de expresión de mRNA GH. Este conjunto de resultados concuerdan con los obtenidos utilizando el modelo de hipotiroidismo farmacológico, apoyando aún más la evidencia de que la 3,5-T<sub>2</sub> es una yodotiroinina activa.



**Figura 22.** Concentración (moléculas/μg RNA total) de los mRNAs del TRβ1 y de la GH en animales sometidos a un reto hipoosmótico (50% AS X 12 h) y tratados con 30 nM de T<sub>3</sub>, rT<sub>3</sub> ó 3,5-T<sub>2</sub> comparados con un grupo control (n = 3 pools ± SEM; p < 0.01)

Un resultado interesante fue el obtenido en la concentración del mRNA de la Na,K-ATPasa α1 hepática. La Na,K-ATPasa α1 es uno de los principales blancos de regulación ante los cambios osmóticos. En efecto, tal como se muestra en la figura 23, la expresión de la Na,K-ATPasa α1 hepática disminuyó posterior a la exposición por 12h a un medio hipoosmótico. Como ya se ha descrito (modelo de hipotiroidismo farmacológico; Horowitz *et al.*, 1990; Ewart y Klip, 1995), esta subunidad no es dependiente de HT. Sin embargo, utilizando el modelo de reto hidroosmótico observamos que el tratamiento de los animales tanto con T<sub>3</sub> como con 3,5-T<sub>2</sub>, a diferencia de rT<sub>3</sub>, reestablece la expresión de este gen a condiciones control. Por lo tanto, el efecto de T<sub>3</sub> y 3,5-T<sub>2</sub> observado sobre la Na,K-ATPasa α1 podría ser el resultado de un mecanismo de regulación distinto al clásicamente descrito. Una posibilidad es que dicho efecto sea secundario a los cambios provocados por las HT sobre otros genes como la GH. El efecto estimulador de la GH sobre la Na,K-ATPasa ha sido ampliamente demostrado en distintas especies eurihalinas (Sakamoto y Mc Cormick, 2006). Así, proponemos que el efecto de la T<sub>3</sub> y la 3,5-T<sub>2</sub> sobre la expresión de la GH puede secundariamente modificar la expresión del gen de la Na,K-ATPasa α1 en los animales sometidos a un reto hipoosmótico.



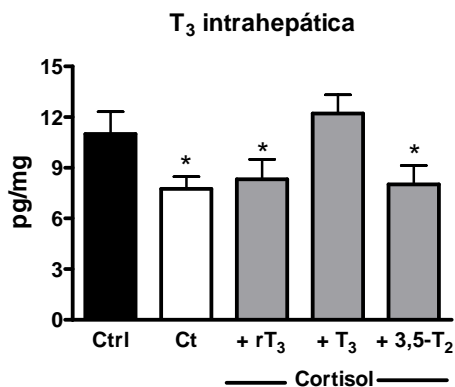
**Figura 23.** Concentración (moléculas/ $\mu$ g RNA total) del mRNA Na,K-ATPasa  $\alpha 1$  en animales sometidos a un reto hipoosmótico (50% AS X 12 h) y tratados con 30 nM de T<sub>3</sub>, rT<sub>3</sub> ó 3,5-T<sub>2</sub> comparados con un grupo control (n = 3 pools  $\pm$  SEM; p < 0.01)

El papel de las HT en la adaptación a cambios de osmolaridad medioambiental, en particular de las desyodasas, ha sido poco estudiado. Reportes previos utilizando truchas a las que se elevó discretamente la salinidad medioambiental (de 0 a 14%), mostraron una respuesta rápida del eje tiroideo al incrementar la concentración circulante de T<sub>4</sub> entre las 2 y 4 h post-reto, seguido por un segundo pico de secreción a las 48 h post reto. Este patrón de T<sub>4</sub> se acompañó de un incremento abrupto de la concentración de T<sub>3</sub> entre las 24 y 48 h. Ambos incrementos en los niveles circulantes de las HT son similares a los que sufren los salmones durante la migración. También se observó una respuesta organo-específica de las desyodasas a este ligero reto hidroosmótico que consistió en una disminución en la actividad D1 renal y D2 hepática a las 8 h post-reto que volvieron a niveles control a las 48 h, mientras que la D1 hepática y branquial no mostraron modificaciones (Orozco *et al.*, 2002b). Los resultados de esta tesis están en línea con los del trabajo en tilapia. Aún cuando el reto osmótico utilizado es el opuesto, los resultados muestran una respuesta en espejo en la regulación de la D2 hepática. A diferencia de lo observado en tilapia, en donde la demanda de HT es suplida con la liberación de T<sub>4</sub> por la glándula tiroidea, nuestros resultados sugieren que en el caso del *Fh*, el requerimiento de HT para contender con el reto opuesto es suplementado a nivel local con la activación de la D2 y por ende producción a este nivel de HT activa. Los resultados de esta tesis muestran que en una situación de estrés hidroosmótico, el efecto de la 3,5-T<sub>2</sub> y la T<sub>3</sub> sobre los

distintos genes analizados es similar. Además, sugieren que las HT bioactivas, incluyendo a la 3,5-T<sub>2</sub>, son importantes en los procesos de adaptación a cambios hidrosmóticos, actuando a través de mecanismos pre-traduccionales, sin descartar la participación de mecanismos a otro nivel. De esta manera, los resultados obtenidos utilizando este modelo experimental, en el cual se genera una demanda fisiológica de HT, se suman a la evidencia del papel de las HT en la adaptación a cambios de osmolaridad ambiental y apoyan la noción de que la 3,5-T<sub>2</sub> es una yodotiroinina activa que podría tener un papel fisiológico en el *Fh*.

#### IV. MODELO DE HIPOTIROIDISMO POR HIPERCORTISOLISMO.

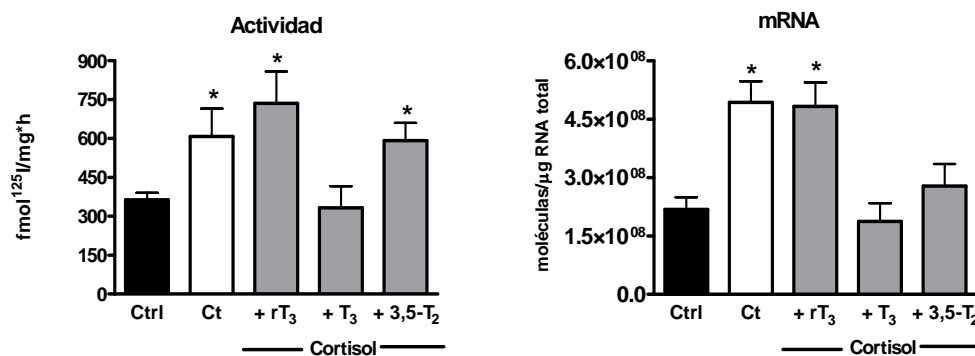
El cortisol (Ct), como la T<sub>3</sub>, es una hormona con efectos metabólicos en un gran número de tejidos. El cortisol y las HT se encuentran íntimamente relacionadas de tal suerte que cada una de ellas influye sobre el efecto biológico de la otra. Un ejemplo de lo anterior es el efecto del cortisol sobre la tasa del recambio metabólico de las HT en vertebrados. En efecto, concentraciones suprafisiológicas de cortisol aumentan la tasa de degradación de las HT, disminuyendo así su vida media (Orozco y Valverde, 2005). Esta degradación acelerada puede entonces inducir transitoriamente un estado semejante al hipotiroidismo en algunos tejidos del organismo. Para probar esta hipótesis, previamente se trataron *Fh* con cortisol (25 µg/g X 48h, implante ip) y en efecto se observó un incremento en la actividad D2 hepática, semejante a lo observado ante un estado hipotiroideo (Orozco *et al.*, 1998). Se decidió utilizar este otro modelo experimental de hipotiroidismo, esta vez secundario a hipercortisolismo y evaluar si la administración de las hormonas tiroideas con actividad biológica bloquearía la respuesta en la regulación de la expresión génica observada en los otros modelos de hipotiroidismo evaluados en esta tesis.



**Figura 24.** Concentración intrahepática de T<sub>3</sub> cuantificada por RIA en animales tratados con cortisol (Ct, 25µg/g) y HT (T<sub>3</sub>, rT<sub>3</sub> y 3,5-T<sub>2</sub>, 30 nM) por 48 h. (n = 6 ± SEM; p<0.01).

Tal como se observa en la figura 24, la cuantificación de la concentración intrahepática de T<sub>3</sub> confirmó el estado hipotiroideo inducido con el tratamiento con cortisol. Así mismo, mostró que la administración exógena de T<sub>3</sub>, más no 3,5-T<sub>2</sub>, revierte la concentración hepática de T<sub>3</sub> a niveles eutiroideos.

Los resultados muestran que el tratamiento con cortisol no solo estimula la actividad D2, también incrementa la expresión de su mRNA (Fig. 25) Aun cuando estos resultados pueden explicarse por el estado hipotiroideo con el que cursan los animales, no descartan que el cortisol podría tener un efecto directo sobre la regulación de la D2 hepática. Estudios previos, utilizando líneas celulares de tumores hipofisarios, han mostrado que los glucocorticoides tienen un efecto estimulador sobre la actividad D2, el cual es sensible al uso del inhibidor de la transcripción, actinomicina D (Araki *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 1998).

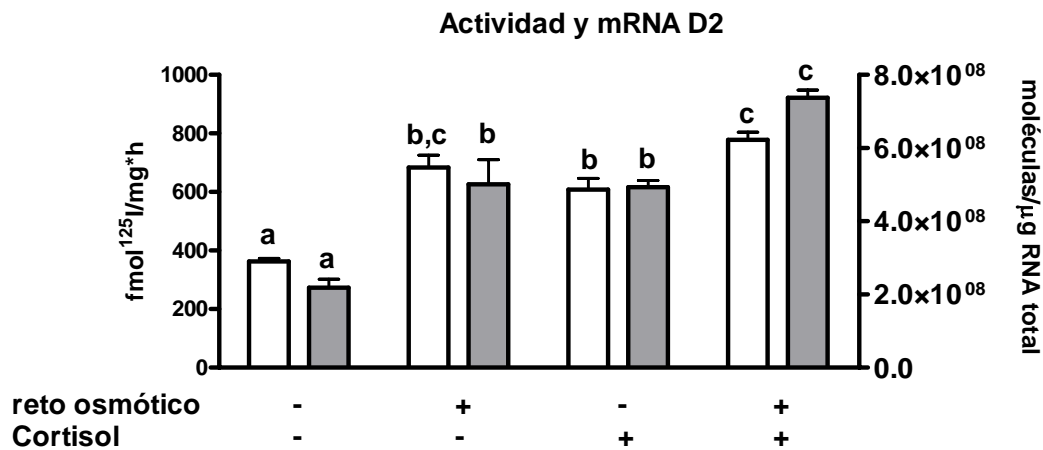


**Figura 25.** Efecto de la co-administración de cortisol (Ct, 25 µg/g) y HT (T<sub>3</sub>, rT<sub>3</sub> y 3,5-T<sub>2</sub>, 30 nM) por 48 h sobre la actividad D2 hepática. (n = 6 ± SEM; p<0.01) y sobre la concentración hepática del mRNA D2 (n = 2-3 pools ± SEM; p<0.01).



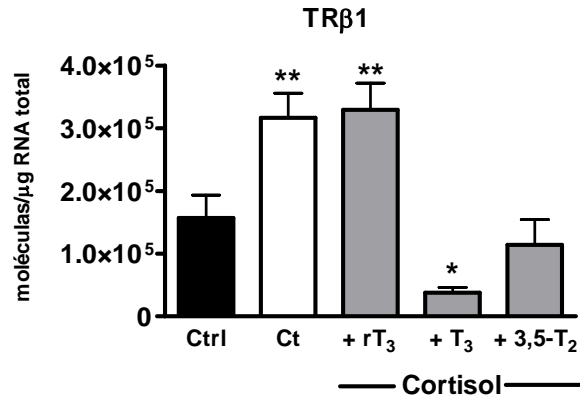
El tratamiento simultáneo con cortisol y HT arrojó datos distintos a los observados en los dos modelos previos. Como se observa en la figura 25, únicamente la co-administración con  $T_3$  inhibe la estimulación de la actividad D2 secundaria a la administración de cortisol. Sin embargo, a nivel del mRNA, tanto la co-administración con  $T_3$  como con 3,5- $T_2$  bloquean el incremento en la expresión de dicho mensajero (Fig. 25). Estos resultados muestran que aún cuando ambas yodotironinas actúan inhibiendo la expresión del mRNA D2, este efecto no es suficiente para compensar el incremento en la actividad D2 secundario al tratamiento con cortisol, ya que únicamente  $T_3$  es capaz de reestablecer la actividad D2. Este efecto diferencial de las yodotironinas estudiadas nos permite proponer dos hipótesis: Por una parte, que a diferencia de la 3,5- $T_2$ , la  $T_3$  actúa tanto a nivel transcripcional como traduccional. En especies mamíferas, en donde el mecanismo de acción de las HT sobre la regulación de la D2 ha sido bien estudiada, se sabe que la  $T_4$  induce la degradación de la D2 actuando como señal de ubiquitinación, mientras que la  $T_3$  actúa únicamente a nivel genómico disminuyendo la expresión del mRNA de la D2 a través de la unión a un TRE negativo putativo (Bianco *et al.*, 2002). La diferencia en el mecanismo de regulación de la D2 ha sido definida en relación al lugar que ocupan estas HT en la reacción catalizada por la D2. Así, se ha denominado como regulación por sustrato, a aquella inducida por la  $T_4$ , mientras que el efecto de la  $T_3$  se define como regulación por producto. En el presente trabajo la 3,5- $T_2$  es un segundo producto de la reacción catalizada por D2 que tiene efecto sobre la regulación de la D2 únicamente a nivel transcripcional, mientras que el efecto de la  $T_3$  puede ser observado tanto a nivel de la concentración del mRNA D2, como sobre su actividad enzimática. La segunda hipótesis propone que el cortisol actúa directamente sobre la expresión y/o actividad de la D2, y que este efecto es adicional al efecto sobre el recambio metabólico de la HT. De acuerdo con esta hipótesis, nosotros observamos que el reto hipoosmótico en peces previamente implantados con cortisol induce un incremento en la actividad enzimática (2.1 X vs 1.7 X cortisol y 1.8 X reto) y en la expresión del mRNA de la D2 (3.8 X vs 2.2 X cortisol y 2.3 X reto) el cual es significativamente mayor que el efecto de ambos factores por separado, cuando estos se comparan con el grupo control (Fig. 26). Esto sugiere que el cortisol pudiera actuar en la regulación de la D2 tanto a nivel

transcripcional como directamente en la vida media de la enzima. De esta manera, el efecto de cortisol + HT observado sugiere una interacción diferencial del cortisol con las dos yodotironinas con actividad biológica estudiadas. Así, mientras que la interacción del cortisol con 3,5-T<sub>2</sub> mantiene únicamente la expresión del mRNA D2 a niveles control predominando el efecto del cortisol sobre la actividad D2, la co-administración con T<sub>3</sub> revierte tanto la actividad D2 como la expresión de su mRNA como resultado del efecto dual de ambas hormonas sobre la proteína y el mRNA de la D2. Así, estos resultados sugieren que a pesar de tener efectos finales semejantes, la T<sub>3</sub> y la 3,5-T<sub>2</sub> pudieran actuar a través de mecanismos de regulación distintos.



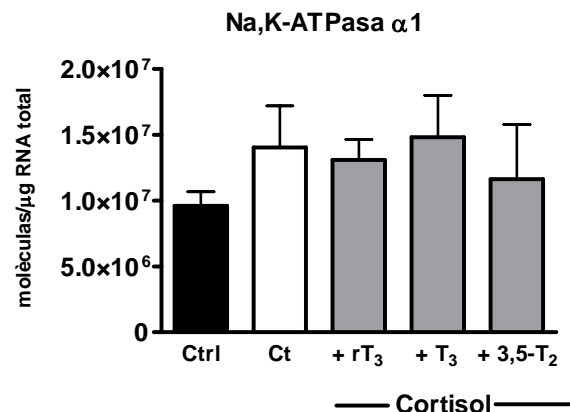
**Figura 26.** Efecto del reto osmótico (50% AS X 12 h), de la administración de cortisol (Ct, 25 μg/g X 48 h) ó ambas manipulaciones sobre la actividad D2 hepática (barras claras; n = 6 ± SEM; p<0.001) y sobre la concentración hepática del mRNA D2 (barras oscuras; n = 2-3 pools ± SEM; p<0.001). Las letras muestran diferencias al comparar todos los grupos entre sí.

Por otra parte, la regulación del gen TRβ1 por T<sub>3</sub> y 3,5-T<sub>2</sub> también mostró diferencias. Como se observa en la figura 27, el tratamiento con cortisol ó Ct más rT<sub>3</sub>, inducen un incremento en la concentración del mRNA TRβ1. Sin embargo y aún cuando la co-administración con T<sub>3</sub>, así como con 3,5-T<sub>2</sub>, inhiben el efecto estimulador del hipotiroidismo secundario a hipercortisolismo, el efecto de la T<sub>3</sub> resultó mayor, logrando una inhibición de la expresión de dicho gen inclusive cuando se compara con respecto al nivel control.



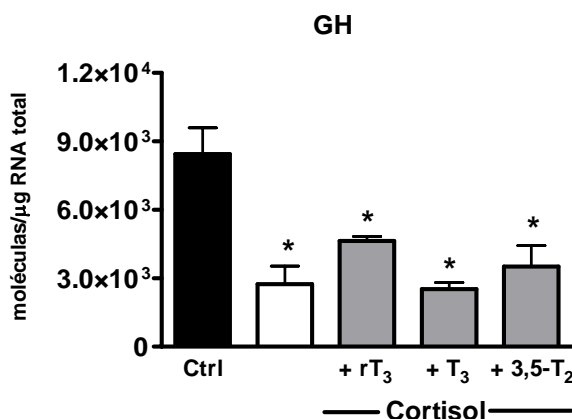
**Figura 27.** Concentración (moléculas/μg RNA total) del mRNA TRβ1 en animales co-tratados con cortisol (25 μg/g) y HT (T<sub>3</sub>, rT<sub>3</sub> y 3,5-T<sub>2</sub>, 30 nM) por 48 h, comparados con un grupo control (n = 3 pools ± SEM; \*p < 0.05, \*\*p < 0.01)

El análisis de la expresión del gen de la Na,K-ATPasa α1 mostró un incremento significativo en los animales tratados con cortisol (Fig. 28). Dicho efecto ha sido previamente descrito tanto en especies de salmonidos (Madsen, 1990; Madsen y Korsgaard, 1991; Mc Cormick 1996) como en el *Fh* (Mancera y Mc Cormick, 1999) y se ha propuesto como uno de los mecanismos a través de los cuales el cortisol participa en la osmoregulación de los peces que habitan en agua salada. Es de notar que en acuerdo con lo que observamos en el modelo de hipotiroidismo farmacológico, la co-administración de cortisol con las distintas HT no modificó la expresión del gen de la Na,K-ATPasa α1 con respecto al grupo tratado con cortisol. Estos resultados apoyan la noción de que el efecto de la 3,5-T<sub>2</sub> se constriñe a aquellos genes que son responsivos a yodotironinas.



**Figura 28.** Concentración (moléculas/μg RNA total) del mRNA Na,K-ATPasa α1 en animales co-tratados con cortisol (25 μg/g) y HT (T<sub>3</sub>, rT<sub>3</sub> y 3,5-T<sub>2</sub>, 30 nM) por 48 h, comparados con un grupo control (n = 3 pools ± SEM; p < 0.01)

Los resultados muestran que el mRNA de la GH es inhibido por el tratamiento con cortisol (Fig. 29). Previamente se ha descrito un efecto dual de los glucocorticoides sobre la regulación de la expresión y de la secreción de la GH. Mientras que la administración aguda de glucocorticoides estimula su expresión y secreción (Casanueva *et al.*, 1990), el tratamiento crónico tiene el efecto contrario (Suda *et al.*, 1980; Dieguez *et al.*, 1996; Hochberg, 2002). De manera interesante nuestros resultados mostraron que, a pesar de ser GH un gen responsivo a yodotironinas, el efecto inhibitorio del cortisol no fue modificado por la administración de las distintas HT. Estos resultados sugieren que bajo las condiciones experimentales utilizadas, el efecto del cortisol predomina sobre el de  $T_3$  en la regulación de la expresión de la GH. Además, muestran que al igual que la  $T_3$ , la 3,5- $T_2$  pierde su efecto regulatorio sobre el mRNA de la GH, cuando se co-administra con cortisol.



**Figura 29.** Concentración (moléculas/μg RNA total) del mRNA GH en animales co-tratados con cortisol (25 μg/g) y HT ( $T_3$ ,  $rT_3$  y 3,5- $T_2$ , 30 nM) por 48 h, comparados con un grupo control (n = 3 pools ± SEM;  $p < 0.01$ )

El análisis del modelo de hipotiroidismo secundario al hiper cortisolismo resulta valioso para los fines de este trabajo, ya que corroboran nuestra propuesta de la 3,5- $T_2$  como una yodotironina bioactiva semejante a la  $T_3$ . Sin embargo, de manera distinta a los otros modelos experimentales, este mostró diferencias en la potencia y el posible mecanismo de acción de ambas HT. Dichas discrepancias pueden ser el resultado de una interacción diferencial de estas yodotironinas con los glucocorticoides.

Desde finales de la década de los ochentas se han realizado diversos intentos para demostrar el efecto biológico de la 3,5-T<sub>2</sub>. Derivados de estos estudios, actualmente es ampliamente aceptado que la 3,5-T<sub>2</sub> tiene efectos claros sobre el consumo de oxígeno, los cuales son distintos a los ejercidos por la T<sub>3</sub>, además de no depender de síntesis protéica (Goglia, 2005; Lombardi *et al.*, 2006). De acuerdo con estos efectos no genómicos, tanto en mamíferos (Leeson *et al.*, 1988) como en teleosteos (Darling *et al.*, 1982; Bres y Eales, 1986) se ha reportado una baja afinidad de la 3,5-T<sub>2</sub> por los TR  $\alpha$ 1,  $\beta$ 1, y  $\beta$ 2 (~100 x menor vs. T<sub>3</sub>). No obstante, diversos estudios que han utilizado tanto sistemas *in vitro* como ratas *in vivo* han demostrado que la 3,5-T<sub>2</sub> puede modificar la expresión ó la concentración de los mRNAs de la enzima málica, la GH, el TR $\beta$ 2 (Ball *et al.*, 1997), la TSH (Baur *et al.*, 1997) y la proteína de unión a IGF tipo 4 (Demori *et al.*, 2004). Sin embargo, en la mayoría de estos estudios se requieren dosis de 3,5-T<sub>2</sub> 100 veces mayores en comparación con T<sub>3</sub> para tener efectos comparables. En apoyo a estos efectos nucleares, previamente se mostró que tanto la D1 como la D2 son reguladas a la baja a nivel pretranscripcional por dosis suprafisiológicas tanto de T<sub>3</sub> como de 3,5-T<sub>2</sub> (García-G *et al.*, 2004). El presente trabajo extiende estos hallazgos al mostrar que en los distintos modelos utilizados, la 3,5-T<sub>2</sub> al igual que la T<sub>3</sub>, tienen efectos transcripcionales sobre genes tironino-dependientes, cuando se utilizan a dosis equivalentes. Más aún, estos hallazgos sugieren que aún cuando el resultado final es el mismo, los mecanismos de acción de ambas HT son diferentes. Estudios paralelos en *Fh* que cursan con hipotiroidismo farmacológico, y utilizando el metodo de ensayo de retardo en la movilidad electroforética (EMSA), han mostrado que la administración de 3,5-T<sub>2</sub>, al igual que la T<sub>3</sub>, inducen la formación de un complejo TRE-proteínas nucleares. Sin embargo, el peso molecular del complejo formado por 3,5-T<sub>2</sub> es distinto al inducido por T<sub>3</sub> (Garcia-G *et al.*, 2007). Los componentes de estos complejos aún no han sido descifrados, sin embargo, por los resultados de la presente tesis sugieren que ambos contienen al TR $\beta$ 1. En conjunto estos resultados muestran que la 3,5-T<sub>2</sub> es capaz de regular los distintos genes tironino-dependientes estudiados en el *Fh*. El trabajo experimental a futuro deberá estar encaminado a dilucidar los mecanismos de acción de esta nueva hormona tiroidea.

## CONCLUSIONES.

Los hallazgos más importantes de este trabajo son los siguientes:

1. La 3,5-T<sub>2</sub> mostró tener actividad biológica en los tres modelos de hipotiroidismo estudiados.
2. La 3,5-T<sub>2</sub> ejerce sus efectos biológicos con la misma potencia que T<sub>3</sub> y a concentraciones similares.
3. La 3,5-T<sub>2</sub> reestablece la expresión eutiroidea de genes clasicamente dependientes a HT.
4. El mecanismo de acción de la 3,5-T<sub>2</sub> en la regulación de los genes estudiados es a nivel transcripcional, probablemente a traves de la unión al TRβ1.

## REFERENCIAS

- Abel ED, Ahima RS, Boers ME, Elmquist JK y Wondisford FE. (2001). Critical role for thyroid hormone receptor beta2 in the regulation of paraventricular thyrotropin-releasing hormone neurons. *J. Clin. Invest.* **107**, 1017-1023.
- Aceves C, Rojas-Huidobro R, Marina N, Morales MT y Mena F. (1999a). Mammary gland sympathetic innervation is a major component in type I deiodinase regulation. *Endocrine* **11**, 115-121.
- Aceves C, Pineda O, Ramírez-C I, Navarro L y Valverde-R C. (1999b). Mammary type I deiodinase is dependent on the suckling stimulus: Differential role of norepinephrine and prolactin. *Endocrinology* **140**, 2948-2953.
- Aceves C y Valverde C. (1989). Type I, 5'-monodeiodinase activity in the lactating mammary gland. *Endocrinology* **124**, 2818-2820.
- Araki O, Morimura T, Ogiwara T, Mizuma H, Mori M y Murakami M. (2003). Expression of type 2 iodothyronine deiodinase in corticotropin-secreting mouse pituitary tumor cells is stimulated by glucocorticoid and corticotropin-releasing hormone. *Endocrinology* **144**, 4459-4465.
- Arnold S, Goglia F y Kadenbach B. (1998). 3,5-Diiodothyronine binds to subunit Va of cytochrome-c oxidase and abolishes the allosteric inhibition of respiration by ATP. *Eur. J. Biochem.* **252**, 325-330.
- Ausó E, Lavado-Autric R, Cuevas E, Escobar del Rey F, Morreale de Escobar G y Berbel P. (2004). A moderate and transient deficiency of maternal thyroid function at the beginning of fetal neocortico genesis alters neuronal migration. *Endocrinology* **145**, 4037-4044.
- Ball SG, Sokolov J y Chin WW. (1997). 3,5-Diiodothyronine (T<sub>2</sub>) has selective thyromimetic effects *in vivo* and *in vitro*. *J. Mol. Endocrinol.* **19**, 137-147.
- Baqui M, Botero D, Gereben B, Cuicio C, Harney JW, Salvatore D, Sorimachi K, Larsen PR y Bianco AC. (2003). Human type 3 iodothyronine selenodeiodinase is located in the plasma membrane and undergoes rapid internalization to endosomes. *J. Biol. Chem.* **278**, 1206-1211.
- Baqui M, Gereben B, Harney JW, Larsen PR y Bianco AC. (2000). Distinct subcellular localization of transiently expressed types 1 and 2 iodothyronine deiodinases as determined by immunofluorescence confocal microscope. *Endocrinology* **141**, 4309-4312.

Barlow JW, Voz MLJ, Eliard PH, Mathy-Hartert M, De Nayer P, Economidis IV, Belayew A, Martial JA y Rousseau GG. (1986). Thyroid hormone receptors bind to defined regions of the growth hormone and placental lactogen genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **83**, 9021-9025.

Bauer K, Schomburg L, Heuer H y Schäfer M. (1999). Thyrotropin Releasing Hormone (TRH), the TRH-receptor and the TRH-degrading ectoenzyme; three elements of a peptidergic signaling system. *Result Probl Cell Differ.* **26**, 13-42.

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.

Becker KB, Schneider MJ, Davey JC y Galton VA. (1995). The type III 5-deiodinase in *Rana catesbeiana* tadpoles is encoded by a thyroid hormone-responsive gene. *Endocrinology* **136**, 4424-4431.

Becker KB, Stephens KC, Davey JC, Schneider MJ y Galton VA. (1997). The type 2 and type 3 iodothyronine deiodinases play important roles in coordinating development in *Rana catesbeiana* tadpoles. *Endocrinology* **138**, 2989-2997.

Behne D y Kyriakopoulos D. (2001). Mammalian selenium-containing proteins. *Annu. Rev. Nutr.* **21**, 453-473.

Berry MJ. (1992). Identification of essential histidine residues in rat type I iodothyronine deiodinase. *J. Biol. Chem.* **267**, 18055-18059.

Berry MJ, Banu L y Larsen PR. (1991). Type I iodothyronine deiodinase is a selenocysteine-containing enzyme. *Nature* **349**, 438-440.

Berry MJ, Grieco D, Taylor BA, Maia AL, Kieffer JD, Beamer W, Glover E, Poland A y Larsen PR. (1993). Physiological and genetic analyses of inbred mouse strains with a type I iodothyronine 5'-deiodinase deficiency. *J. Clin. Invest.* **92**, 1517-1528.

Bianco AC y Larsen PR. (2005). Cellular and Structural Biology of the Deiodinases. *Thyroid* **15**, 777-787.



- 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.
- Bracco D, Morin O, Schutz Y, Liang H, Jequier E y Burger AG. (1993). Comparison the metabolic and endocrine effects of 3,5,3'-triiodothyroacetic acid and thyroxine. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **77**, 221-228.
- Bradford M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* **72**, 249-254.
- Bres O y Eales JG. (1986). Thyroid hormone binding to isolated trout (*Salmo gairdneri*) liver nuclei *in vitro*: binding affinity, capacity and chemical specificity. *Gen. Comp. Endocrinol.* **61**, 29-39.
- Brown DD. (2005). The Role of Deiodinases in Amphibian Metamorphosis. *Thyroid* **15**, 815-821.
- Buaboocha W y Gemmell RT. (1996). The effect of methimazole on the growth of the developing brushtail possum, *Trichosurus vulpecula*. *Growth Dev. Aging* **60**, 163-169.
- Buettner C, Harney JW y Larsen PR. (1998). The 3'-untranslated region of human type 2 iodothyronine deiodinase mRNA contains a functional selenocysteine insertion sequence element. *J. Biol. Chem.* **273**, 33374-33378.
- Burrow GN, Fisher DA y Larsen PR. (1994). Maternal and fetal thyroid function. *N. Engl. J. Med.* **331**, 1072-1078.
- Burstein PJ, Draznin B, Johnson CJ y Schalch DS. (1979). The effect of hypothyroidism on growth, serum growth hormone, the growth hormone-dependent somatomedin, insulin-like growth factor, and its carrier protein in rats. *Endocrinology* **104**, 1107-1111.
- Capen C. (2000). 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*. 8a ed J. B. Lippincot Company. EUA. pp 20-28.
- Carson-Jurica MA, Scradler WT y O'Malley BW. (1990). Steroid receptor family: structure and function. *Endocr. Rev.* **11**, 201-220.
- Carrasco N. 1993. Iodine trasport in the thyroid gland. *Biochem. Biophys. Acta.* **1154**, 65-82.

- Casanueva FF, Burguera B, Muruais C y Dieguez C. (1990). Acute administration of corticoids: a new and peculiar stimulus of growth hormone secretion in man. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **70**, 234-237.
- Celi FS, Canettieri G, Yarnall DP, Burns DK, Andreoli M, Schuldiner AR y Centanni M. (1998). Genomic characterization of the coding region of the human type II 5'-deiodinase gene. *Mol. Cell. Endocrinol.* **141**, 49-52.
- Chan H H y Eales JG. (1976). Influence of bovine TSH on plasma thyroxine levels and thyroid function in brook trout, *Salvelinus fontinalis* (Mitchill). *Gen. Comp. Endocrinol.* **28**, 461-472.
- Charli JL, Vargas MA, de Gortari P, Baeza MA, Jasso P, Bourdais J, Perez L, Uribe RM y Joseph-Bravo P. (1998). TRH inactivation in the extracellular compartment: role of pyroglutamil peptidasa II. *Neurobiology* **6**, 45-57.
- Chomczynski P y Sachi N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* **162**, 156-159.
- Chopra IJ, Santini F, Wu SY y Hurt RE. (1994). The role of sulfation and desulfation in hormone thyroid metabolism. En: Wu SY y Visser TJ (Eds) *Thyroid Hormone Metabolism: Molecular Biology and Alternate Pathways*. CRC Press, Boca Raton, FL, EUA. pp. 119-138.
- Cimmino M, Mion F, Goglia F, Minaire Y y Gélœn A. (1996). Demonstration of *in vivo* metabolic effects of 3,5-T<sub>2</sub> diiodothyronine. *J. Endocrinol.* **149**, 327-333.
- Crantz FR, Silva JE y Larsen PR (1982). An analysis of the sources and quantity of 3,5,3'-triiodothyronine specifically bound to nuclear receptors in rat cerebral cortex and cerebellum. *Endocrinology* **110**, 367-375
- Croteau W, Whittemore SL, Schneider MJ y St. Germain DL. (1995). Cloning and expression of a cDNA for a mammalian type III iodothyronine deiodinase. *J. Biol. Chem.* **270**, 16569-16575.
- Curcio-Morelli C, Zavacki AM, Christofollete M, Gereben B, de Freitas BCG, Harney JW, Li Z, Wu G y Bianco A. (2003). Deubiquitination of type 2 iodothyronine deiodinase by von Hippel-Lindau protein-interacting deubiquitinating enzymes regulates thyroid hormone activation. *J. Clin. Invest.* **112**, 189-196.
- Cyr DG y Eales JG. (1996). Interrelationships between thyroidal and reproductive endocrine systems in fish. *Rev. Fish. Biol. Fish.* **6**, 165-200.
- Darling DS, Dickhoff WW y Gorbman A. (1982). Comparison of thyroid hormone binding to hepatic nuclei of the rat and a teleost (*Oncorhynchus kisutch*). *Endocrinology* **111**, 1936-1943.

- Davey JC, Becker KB, Schneider MJ, St. Germain DL y Galton VA. (1995). Cloning of a cDNA for the type II iodothyronine deiodinase. *J. Biol. Chem.* **270**, 26786–26789.
- Davey JC, Schneider MJ, Becker JB y Galton VA. (1999). Cloning of a 5.8 kb cDNA for a mouse type 2 deiodinase. *Endocrinology* **140**, 1022-1025.
- Davis PJ, Leonard JL y Davis FB. (2008). Mechanisms of nongenomic actions of thyroid hormone. *Front Neuroendocrinol* **29**, 211-218.
- De Herder WW, Hazenberg MP, Pennock-Schroder AM, Oosterlaken AC, Rutgers M y Visser TJ. (1989). On the entero-hepatic cycle of triiodothyronine in rats; Importance of the intestinal microflora. *Life Sci.* **45**, 849-856.
- Demori I, Gerdoni E, Fugassa E, Voci A. (2004). 3,5-diiodothyronine mimics the effect of triiodothyronine on insulin-like growth factor binding protein-4 expression in cultured rat hepatocytes. *Horm. Metab. Res.* **36**,679-685.
- Denver RJ y Licht P. (1991). Dependence of body growth on thyroid activity in turtles. *J. Exp. Zool.* **258**, 48-59.
- Dieguez C, Mallo F, Señaris R, Pineda J, Martul P, Leal-Cerro A, Pombo M y Casanueva FF. (1996). Role of glucocorticoids in the neuroregulation of growth hormone secretion. *J. Pediatr. Endocrinol. Metab. Suppl* **3**, 255-260.
- Dohán O, de la Vieja A, Paroder V, Riedel C, Artani M, Reed M, Ginter CS y Carrasco N. (2003). The sodium/iodine symporter (NIS): Characterization, regulation and medical significance. *Endocrine Reviews* **24**, 48-77.
- DuBois EF. (1936). *Basal Metabolism in Health and Disease*. Lea & Febiger, Filadelfia.
- Duthie SM, Taylor PL, Anderson L, Cook J y Eidne KA (1993). Cloning and functional characterization of the human TRH receptor. *Mol. Cell. Endocrinol.* **95**, R11-R15.
- 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.
- Essner JJ, Breuer JJ, Essner RD, Fahrenkrug SC y Hackett PB. (1997). The zebrafish thyroid hormone receptor  $\beta$ 1 is expressed during early embryogenesis and can function in transcriptional repression. *Differentiation* **62** 107–117.

- Essner JJ, Johnson RG y Hackett PB. (1999) Overexpression of thyroid hormone receptor  $\beta$ 1 during zebrafish embryogenesis disrupts hindbrain patterning and implicates retinoic acid receptors in the control of hox gene expression. *Differentiation* **62**, 107–117.
- Evans RM. (1988). The steroid and thyroid receptors superfamily. *Science* **240**, 889-895.
- Evans RM y Hollenberg S. (1988). Zinc fingers: guilt by association. *Cell* **52**, 1-3.
- Evans ES, Schooley RA, Evans A B, Jenkins CA y Taurog A. (1966). Biological evidence for extrathyroidal thyroxine formation. *Endocrinology* **78**, 983-1001.
- Everts ME, Visser TJ, Moerings EPCM, Tempelars AMP, van Toor H, Docter R, De Jong M, Krenning EP y Hennemann G. (1995). Uptake of 3,3',5,5'-tetraiodothyroacetic acid and triiodothyronine in cultured rat anterior pituitary cells and its effects on thyrotropin secretion. *Endocrinology* **136**, 4454-4461.
- Ewart H S y Klip A. (1995). Hormonal regulation of the Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase: mechanisms underlying rapid and sustained changes in pump activity. *Am. J. Physiol.* **269** (Cell Physiol. **38**), C295-C311.
- Fagegaltier D, Lescure A, Walczack R, Carbon P y Krol A. (2000). Structural analysis of the new local features in SECIS RNA hairpins. *Nucleic Acids Res.* **15**, 2679-2689.
- Fenton B, Orozco A y Valverde-R C. (1997). Kinetic characterization of skin inner-ring deiodinase pathways and its correlation with circulating levels of reverse T<sub>3</sub> (rT<sub>3</sub>) in developing rainbow trout. *J. Endocrinol.* **154**, 547-554.
- Findlay KA, Kaptein E, Visser TJ y Burchell B. (2000). Characterization of the uridine diphosphate-glucuronosyltransferase catalyzing thyroid hormone glucuronidation in man. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **85**, 2876-2883.
- Flamant F y Samarut J. (2003). Thyroid hormone receptors: lessons from knockout and knock-in mutant mice. *Trends Endocrinol. Metab.* **14**, 85-90.
- Forman BM, Casanova J, Raaka BM, Ghysdael J y Samuels HH. (1992). Half-site spacing and orientation determines whether thyroid hormone and retinoic acid receptors and related factors bind to DNA monomers, homodimers or heterodimers. *Mol. Endocrinol.* **6**, 502-514.
- Forman BM y Samuels HH. (1990). Interactions among a subfamily of nuclear hormone receptors; the regulatory zipper model. *Mol. Endocrinol.* **4**, 1293-1301.

Fujita K, Nagata K, Shimada M y Yamazoe Y. (1999). Bacterial expression and functional characterization of a rat thyroid hormone sulfotransferase, ST1B1. *Jpn. J. Pharmacol.* **79**, 467-475.

Fuse Y, Polk DH, Lam RW y Fisher DA. (1991). Ontogeny of thyrotropin releasing hormone and precursor peptide in the rat. *Pediatr. Res.* **30**, 28-33.

Galton VA, Martinez E, Hernandez A, St. Germain EA, Bates JM y St. Germain DL. (1999). Pregnant rat uterus expresses high levels of the type 3 iodothyronine deiodinase. *J. Clin. Invest.* **103**, 979-987.

Galton VA y Hierbert A (1987). The ontogeny of iodothyronine 5-deiodinase activity in *Rana catesbiana* tadpoles at different stages of the life cycle. *Endocrinology* **121**, 42-47.

García-G C, López-Bojorquez LN, Nuñez J, Valverde-R C, Orozco A. (2007). 3,5-Diiodothyronine *in vivo* maintains euthyroidal expression of type 2 iodothyronine deiodinase, growth hormone, and thyroid hormone receptor  $\beta$ 1 in the killifish. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **293**, 877-883.

García-G C, Jeziorski M, Valverde C y Orozco A. (2004). Effects of iodothyronines on the hepatic outer ring deiodinating pathway in killifish. *Gen. Comp. Endocrinol.* **135**, 201-209.

Gereben B, Bartha T, Tu HM, Harney JW, Rudas P y Larsen PR. (1999). Cloning and expression of the chicken type 2 iodothyronine 5'-deiodinase. *J. Biol. Chem.* **274**, 13768–13776.

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. Endo.* **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

Gerwien RW Y John-Alder HB. (1992). Growth and behaviour of thyroid deficient lizards (*Sceloporus undulatus*). *Gen. Comp. Endocrinol.* **87**, 312-324.

Glass CK, Franco R, Weinberger C, Albert VR, Evans RM y Rosenfeld MG. (1987). A c-erb-A binding site in rat growth hormone gene mediates trans-activation by thyroid hormone. *Nature* **329**, 738–741.

Goglia A. (2005). Biological Effects of 3,5-Diiodothyronine ( $T_2$ ). *Biochemistry (Moscow)* **70**, 164-172.

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

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

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.

Grau EG, Helms LM, Shimoda SK, Ford CA, LeGrand J y Yamauchi K. (1986). The thyroid gland of the Hawaiian parrot-fish and its use as an *in vitro* model system. *Gen. Comp. Endocrinol.* **61**, 100–108.

Green S y Chambon P. (1986). A superfamily of potentially oncogenic hormone receptors. *Nature* **324**, 615-617.

Guadaño-Ferraz A, Escámez MJ, Rausell E y Bernal J. (1999). Expression of type 2 iodothyronine deiodinase in hypothyroid rat brain indicates an important role of thyroid hormone in the development of specific primary sensory systems. *J. Neurosci.* **19**, 3430-3439.

Guerrero JM, Puig-Domingo M, Vaughan GM y Reiter RJ. (1988). Thyroxine 5'-deiodinase activity in pineal gland and frontal cortex: Night time increase and the effect of either continuous light exposure or superior cervical ganglionectomy. *Endocrinology* **122**, 236-241.

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

Hernandez A, Lyon GJ, Schneider MJ y St Germain DL. (1999). Isolation and characterization of the mouse gene for the type 3 iodothyronine deiodinase. *Endocrinology* **140**, 124-130.

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

Hernandez A, Park JP, Lyon GJ, Mohandas TK y St Germain DL. (1998). Localization of the type 3 iodothyronine deiodinase (*DIO3*) gene to human chromosome 14q32 and mouse chromosome 12F1. *Genomics* **53**, 119-121.

Hochberg Z. (2002). Mechanisms of steroid impairment of growth. *Horm. Res.* **58**, 33–38.

Hodin RA, Lazar MA yChin WW. (1990). Differential and tissue specific regulation of multiple rat c-erbA messenger RNA species by thyroid hormone. *J. Clin. Invest.* **85**, 101-105.

Hoffmann PR y Berry MJ. (2005) Selenoprotein Synthesis: A Unique Translational. Mechanism Used by a Diverse Family of Proteins. *Thyroid* **15**, 769-775.

Horowitz B, Hensley CB, Quintero M, Azuma KK, Putnam D y Mc-Donough AA. (1990). Differential regulation of Na,K-ATPase alpha 1, alpha 2 and beta subunit mRNA and protein levels by thyroid hormone. *J. Biol. Chem.* **265**, 14308–14314.

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

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

Hosoi Y, Murakami M, Mizuma H, Ogiwara T, Imamura M y Mori M. (1999). Expression and regulation of type II iodothyronine deiodinase in cultured human skeletal muscle cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **84**, 3293-3300.

Hulbert AJ. (2000). Thyroid hormones and their effects; a new perspective. *Biol. Rev.* **75**, 519-631.

Hummerich H y Soboll S. (1989). Rapid stimulation of calcium uptake into rat liver by L-tri-iodothyronine. *Biochem. J.* **258**, 363-367.

Inui Y y Miwa S. (1985). Thyroid hormone induces metamorphosis of flounder larvae. *Gen. Comp. Endocrinol.* **60**, 450–454.

Inui Y, Tagawa M, Miwa S y Hirano T. (1989). Effects of bovine TSH on the tissue thyroxine level and metamorphosis in prometamorphic flounder larvae. *Gen. Comp. Endocrinol.* **74**, 68–76.

Kaiser-Siegrist CA y Burger AG. (1994). Modification on the side chain of thyroid hormones. En: Wu SY y Visser TJ (Eds) *Thyroid Hormone Metabolism: Molecular Biology and Alternate Pathways*. CRC Press, Boca Raton, pp. 183-190.

Kamiya Y, Murakami M, Araki O, Hosoi Y, Ogiwara T, Mizuma H and Mori M. (1999). Pretranslational regulation of rhythmic type II iodothyronine deiodinase expression by  $\beta$ -adrenergic mechanism in the rat pineal gland. *Endocrinology* **140**, 1272-1278.

Kanamori A y Brown DD. (1992). The regulation of thyroid hormone receptor  $\beta$  genes by thyroid hormone in *Xenopus laevis*. *J. Biol. Chem.* **267**, 739-745.

- Kaplan MM y Yaskoski KA. (1980). Phenolic and tyrosil ring deiodination of iodothyronines in rat brain homogenates. *J. Clin. Invest.* **66**, 551-562.
- 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-polymerase chain reaction. *Endocrinology* **139**, 4895-4905.
- Koenig RJ, Brent GA, Warne RL, Larsen PR y Moore DD. (1987). Thyroid hormone receptor binds to a site in the rat growth hormone promoter required for induction by thyroid hormone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 5670-5674.
- 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.
- Kühn ER, Mol KA y DArras VM. (1993). Control strategies of thyroid hormone monodeiodination in vertebrates. *Zoological Sci (Tokyo)* **10**, 873-885.
- Kuiper GGJM, Kester MHA, Peeters RP y Visser TJ. (2005). Biochemical mechanisms of thyroid hormone deiodination. *Thyroid.* **15**, 787-799.
- Kvetny J. (1992). 3,5-T<sub>2</sub> stimulates oxygen consumption, but not glucose uptake in human mononuclear blood cells. *Horm. Metab. Res.* **24**, 322-325.
- Lanni A, Moreno M, Cioffi M y Goglia F. (1992). Effect of 3,3'-diiodothyronine and 3,5-diiiodothyronine 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-diiiodothyronine on rat liver mitochondria. *J. Endocrinol.* **136**, 59-64.
- 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.
- Lanni A, Moreno M, Lombardi A y Goglia F. (1994). Rapid stimulation *in vitro* of rat liver cytochrome oxidase activity by 3,5-diiodo-L-thyronine and by 3,3'-diiodo-L-thyronine. *Mol. Cell. Endocrinol.* **99**, 89-94.
- Lanni A, Moreno M, Lombardi A y Goglia F. (1996). Calorigenic effect of diiodothyronines in the rat. *J. Physiol.* **494**, 831-837.



- Larsson M, Petterson T y Carlstrom A. (1985). Thyroid-hormone binding in the serum of 15 vertebrate species: Isolation of thyroxine binding globulin and prealbumin analogs. *Gen. Comp. Endocrinol.* **58**, 360–375.
- Lavado-Autric R, Ausó E, García-Velasco JV, Arufe MC, Escobar del Rey F, Berbel P y Morreale de Escobar G. (2003). Early maternal hypothyroxinemia alters histogenesis and cerebral cortex cytoarchitecture of the progeny. *J. Clin. Inves.* **111**, 1073–1082.
- Lazar MA. (1993). Thyroid hormone receptors: multiple forms, multiple possibilities. *Endocrine Reviews.* **14**, 184-193.
- Lazar MA. (2003). Thyroid hormone action: a binding contract. *J Clin Invest.* **112**, 497-499.
- Lechan RM y Fekete C. (2005). Role of thyroid deiodination in the hypothalamus. *Thyroid* **15**, 883-898.
- Lecham RM, Wu P, Jackson IM, Wolf H, Coopermen S, Mandel G y Goodman RH. (1986). Thyrotropin releasing hormone precursor: characterization in rat brain. *Science* **231**, 159-161.
- Leeson PD, 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.
- Lin K-H, Parkinson C, McPhie P y Cheng S-Y. (1991). An essential role of domain D in the hormone-binding activity of human  $\beta 1$  thyroid hormone nuclear receptor. *Mol. Endocrinol.* **5**, 485-492.
- 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.
- 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, Lanni A, Silvestri E, de Lange P, Goglia F y Moreno M. (2006). 3,5-Diiodothyronine: Biological actions and therapeutic perspectives. *Immun. Endoc. & Metab. Agents in Med. Chem.* **6**, 255-265.

- López-Bojórquez L, Villalobos P, García-G C, Orozco A y Valverde-R C. (2007) Functional identification of an osmotic response element (ORE) in the promoter region of the killifish deiodinase 2 gene (*FhDio2*). *J. Exp. Biol.* **210**, 3126-3132.
- Luna M, Guzman G, Navarro L, Sanchez de la Peña S y Valverde-R C. (1995). Circadian rhythm of type II 5'deiodinase activity in the rat hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Endocrine* **3**, 597-601.
- Machuca I, Esslemont G, Fairclough L y Tata JR. (1995). Analysis of structure and expression of the *Xenopus* thyroid hormone receptor  $\beta$  (xTR $\beta$ ) gene to explain its autoinduction. *Mol. Endocrinol.* **9**, 96–108.
- Madsen SS. (1990). The role of cortisol and growth hormone in seawater adaptation and development of hypoosmoregulatory mechanisms in sea trout parr (*Salmo trutta trutta*). *Gen. Comp. Endocrinol.* **79**, 1-11.
- Madsen SS y Korsgaard B. (1991). Opposite effects of 17 beta-estradiol and combined growth hormone-cortisol treatment on hypo-osmoregulatory performance in sea trout presmolts, *Salmo trutta*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **83**, 276-282.
- Magnus-Levy A. (1895). Uber den respiratorischen gaswechsel unter dem einfluss der thyroidea sowie unter verschiedenen pathologischen zustanden. *Berlin Klin. Wochenschr.* **34**, 650.
- Maia AL, Berry MJ, Saberg R, Herney JW y Larsen PR. (1995). Structural and functional differences in the dio 1 gene mice with inherited type I deiodinase deficiency. *Mol. Endocrinol.* **9**, 969-980.
- Mancera JM y Mc Cormick SD. (1999). Influence of cortisol, growth hormone, insulin-like growth factor and 3,3',5-triiodo-L-thyronine on hypoosmoregulatory ability in the euryhaline teleost *Fundulus heteroclitus*. *Fish Physiol. Biochem.* **21**, 25-33.
- Mangelsdorf DF, Ong ES, Dyck JA y Evans RM. (1990). Nuclear receptor that identifies a novel retinoic acid response pathway. *Nature* **345**, 224-229.
- Marchand O, Safi R, Escriva H, Van Rompaey E, Prunet P y Laudet V. (2001). Molecular cloning and characterization of thyroid hormone receptors in teleost fish. *J. Mol. Endocrinol.* **26**, 51–65.
- Matre V, Karlsen HE, Wright MS, Lundell I, Fjeldheim AK, Gabrielsen OS, Larhammar D y Gautvik M. (1993). Molecular cloning of the functional human thyrotropin-releasing hormone receptor. *Biochem. Biophys Res. Commun.* **195**, 179-185.

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

Matty AJ. (1985). The thyroid gland. En: *Fish Endocrinology*. Croom Helm, Australia. pp 54-83, 267.

Mc Cormick SD. (1996). Effects of growth hormone and insulin-like growth factor 1 on salinity tolerance and gill  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase in Atlantic salmon (*Salmo salar*): Interactions with cortisol. *Gen. Comp. Endocrinol.* **101**, 3-11.

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

Miell JP, Taylor A M, Zini M, Maheshwari HG, Ross RJM y Valcavi, R. (1993). Effects of hypothyroidism and hyperthyroidism on insulin-like growth factors (IGFs) and growth hormone- and IGF-binding proteins. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **76**, 950-955.

Milne RS y Leatherland JF. (1980). Studies on the relationship between osmotic or ionic regulation and thyroid gland activity in two salmonid fishes, *Salmo gairdneri* Richardson and *Oncorhynchus kisutch* Walbaum. *J. Fish Biol.* **16**, 349–360.

Miwa S, Tagawa M, Inui Y y Hirano T. (1988) Thyroxine surge in metamorphosing flounder larvae. *Gen. Comp. Endocrinol.* **70**, 158–163.

Mol KA, Van der Geyten S, Burel C, Kühn ER, Boujard T y Darras VM. (1998). Comparative study of iodothyronine outer ring and inner ring deiodinase activities in five teleostean fishes. *Fish Physiol. Biochem.* **18**, 253-266.

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  $\text{T}_3$  on resting metabolic rate in euthyroid rats entirely caused by  $\text{T}_3$  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.

- Morreale de Escobar G, Obregón MJ, Escobar del Rey F. (2007). Iodine deficiency and brain development in the first half of pregnancy. *Public Health Nutr.* **12A**, 1554-1570.
- Morvan Dubois G, Sebillot A, Kuiper GG, Verhoelst CH, Darras VM, Visser TJ y Demeneix BA. (2006). Deiodinase activity is present in *Xenopus laevis* during early embryogenesis. *Endocrinology* **147**, 4941-4949.
- Muñoz A y Bernal J. (1997). Biological activities of thyroid hormone receptors. *Eur. J. Endocrinol.* **137**, 433-445.
- Murakami M, Araki O, Hosoi Y, Kamiya Y, Morimura T, Ogiwara T, Mizuma H y Mori M. (2001). Expression and regulation of type II iodothyronine deiodinase in human thyroid gland. *Endocrinology* **142**, 2961-2967
- Ng L, Goodyear RJ, Woods CA, Schneider MJ, Diamond E, Richardson GP, Kelley MW, Germain DL, Galton VA y Forrest D. (2004). Hearing loss and retarded cochlear development in mice lacking type 2 iodothyronine deiodinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **101**, 3474-3479.
- Norris DO. (1985). *Vertebrate Endocrinology*. Capítulo 8. Lea & Febiger. USA. pp 161-202.
- Oppenheimer JH, Koerner K, Schmartz HL y Surk MI. (1972). Specific nuclear triiodothyronine binding sites in rat liver and kidney. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **35**, 330-333.
- Oppenheimer JH. (1999). Evolving concepts of thyroid hormone action. *Biochimie.* **81**, 539-543.
- O'Reilly I y Murphy MP. (1992). Studies on the rapid stimulation of mitochondrial respiration by thyroid hormones. *Acta Endocrinol. (Copenh.)* **127**, 542-546.
- 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.
- Orozco A, Linser PJ y Valverde-R C. (1998). Salinity modifies hepatic outer-ring deiodinating activity in *Fundulus heteroclitus*. *Trends in comparative Endocrinology and Neurobiology Ann. N.Y. Acad. Sci* **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 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, Ruiz-Juvera A y Valverde-R C. (1992). The importance of employing homologous serum free of thyronines in radioimmunoassays to assess circulating thyroid hormones in rainbow trout. *Bol. Estud. Med. y Biol.* **1-4**, 41-49.

Orozco A, Silva E y Valverde-R CM (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 y Valverde-R C. (2005). Thyroid Hormone Deiodination in Fish. *Thyroid* **15**, 799-813.

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.

Pinna G, Brodel O, Visser T, Jeitner 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**, 1789-1800.

Pinna G, Meinhold H, Hiedra L, Thoma R, Hoell T, Graf KJ, Stoltenburg-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.

Power DM, Elias NP, Richardson SJ, Mendes J, Soares CM, y Santos CRA. (2000). Evolution of the Thyroid Hormone-Binding Protein, Transthyretin. *Gen. Comp. Endocrinol.* **119**, 241-255.

Ranjan M, Wong J y Shi Y-B. (1994). Transcriptional expression of *Xenopus* TR gene is mediated by a thyroid hormone response element located near the start site. *J. Biol. Chem.* **269**, 24699-24705.

Rao JN, Liang JY, Chakraborti P y Feng P. (2003) Effect of thyroid hormone on the development and gene expression of hormone receptors in rat testes in vivo. *J. Endocrinol. Invest.* **26**, 435-443.

Richard K, Hume R, Kaptein E, Sanders JP, Van Toor H, De Herder WW, den Hollander JC, Krenning EP y Visser TJ. (1998). Ontogeny of iodothyronine deiodinases in human liver. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **83**, 2868-2874.

Richardson SJ, Bradley AJ, Duan W, Wettenhall REH, Harms PJ, Babon JJ, Southwall BR, Nicol S, Donnellan SC y Schreiber G. (1994). Evolution of marsupial and other vertebrate thyroxine-binding plasma proteins. *Am. J. Physiol.* **266**, R1359–R1370.

Richardson SJ, Monk JA, Shepherdley CA, Ebbesson LOE, Sin F, Power DM, Frappell PB, Kohrle J y Renfree MB. (2005). Developmentally regulated thyroid hormone distributor proteins in marsupials, a reptile, and fish. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **288**, R1264–R1272.

Richter K, Kawashima E, Egger R y Kreil G. (1984). Biosynthesis of thyrotropin realizing hormone in the skin of *Xenopus laevis*: partial sequence of the precursor deduced from cloned cDNA. *EMBO Journal* **3**, 617-621.

Robbins J. (2000). Thyroid hormone transport proteins and the physiology of hormone binding. En: Braverman LE y Utiger RD (Eds.) Werner and Ingbar's *The Thyroid. A Fundamental and Clinical Text*. 8a ed. Lippincott-Raven publishers. EUA. pp 220-234.

Rodriguez AM, Perron Lacroix L, Caillou B, Leblanc G, Schumberger M, Bidart JM y Pourcher T. (2002). Identification and characterization of a putative human iodine transporter located at the apical membrane of thyrocytes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **87**, 3500-3503.

Roti E, Braverman LE, Fang SL, Alex S y Emerson CH. (1982). Ontogenesis of placental inner ring thyroxine deiodinase and amniotic fluid 3,3',3'-triiodothyronine concentration in the rat. *Endocrinology* **111**, 959-963.

Sakamoto T y McCormick SD. (2006). Prolactin and growth hormone in fish ormoregulation. *Gen. Comp. Endocrinol.* **147**, 24-30.

Salvatore D, Low SC, Berry M, Maia AL, Harney JW, Croteau W, St. Germain DL y Larsen PR. (1995). Type 3 iodothyronine deiodinase: cloning, *in vitro* expression, and functional analysis of the placental selenoenzyme. *J. Clin. Invest.* **96**, 2421–2430.

Salvatore D, Tu HM, Harney JW y Larsen PR. (1996). Type 2 iodothyronine deiodinase is highly expressed in human thyroid. *J. Clin. Invest.* **98**, 962-968.

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

Samuels MH, Wierman ME, Wang C y Ridgway EC. (1989). The effect of altered thyroid status on pituitary hormone messenger ribonucleic acid concentrations in the rat. *Endocrinology* **124**, 2277-2282.

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

Sanders JP, Van der Geyten S, Kaptein E, Darras VM, Kühn ER, Leonard JL y Visser TJ. (1999). Cloning and characterization of a type III iodothyronine deiodinase from the fish *Oreochromis niloticus*. *Endocrinology* **140**, 3666-3673.

Sánchez E, Charli JL, Morales C, Corkidi G, Seidah NG, Joseph-Bravo P y Uribe RM. (1997). Expression of the proprotein convertases PC1 and PC2 mRNAs in thyrotropin releasing hormone neurons of the rat paraventricular nucleus of hypothalamus. *Brain Res.* **761**, 77-86.

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

Santos CRA y Power DM. (1999). Identification of transthyretin in fish (*Sparus aurata*): cDNA cloning, and characterization. *Endocrinology* **140**, 2430–2433.

Sap J, Munoz A, Damn K, Goldberg Y, Ghysdael J, Lentz A, Beng H y Venntrom B. (1986). The c-erb-A protein is a high affinity receptor for thyroid hormone. *Nature* **324**, 635-640.

Scanlon MF y Toft AD. (2000). Regulation of thyrotropin secretion. En: Braverman LE y Utiger RD (Eds.) Werner and Ingbar's *The Thyroid. A Fundamental and Clinical Text*. 8a ed. Lippincott-Raven publishers. EUA. pp 220-234.

Schaner P, Todd RB, Seidah NG y Niñi EA. (1997). Processing of prothyrotropin-releasing hormone by the family of prohormone convertases, *J. Biol. Chem.* **272**, 19958-19968.

Schneider M, Fiering SN, Pallud SE, Parlow AF, St. Germain DL y Galton VA. (2001). Targeted disruption of the type 2 selenodeiodinase gene (*DIO2*) results in a phenotype of pituitary resistance to T<sub>4</sub>. *Mol. Endocrinol.* **15**, 2137-2148.

Schneider M, Fiering S, Thai B, Wu SY, St. Germain E, Parlow AF, St. Germain D y Galton A. (2006) Targeted disruption of the type 1 selenodeiodinase gene (*Dio1*) results in marked changes in thyroid hormone economy in mice. *Endocrinology* **147**, 580-589.

Schomburg L, Bauer K (1995). Thyroid hormones rapidly and stringently regulate the messenger RNA levels of the thyrotropin-releasing hormone (TRH) receptor and the TRH-degrading ectoenzyme. *Endocrinology* **136**, 3480-3485.

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

Scott DA, Wang R, Kreman TM, Sheffield VC y Karniski LP. (1999). "The pendred syndrome gene encodes a chloride-iodine transport protein. *Nat. Genet.* **21**, 440-443.

Semple J, Green H y Schulte P (2002). Molecular cloning and characterization of two Na/K ATPase isoforms in *Fundulus heteroclitus*. *Mar. Biotechnol.* **4**, 512-519.

Shepherdley CA, Richardson SJ, Evans BK, Kühn ER y Darras VM. (2002). Thyroid hormone deiodinases during embryonic development of the saltwater crocodile (*Crocodylus porosus*). *Gen. Comp. Endocrinol.* **126**, 153-164.

Siegrist-Kaiser CA, Juge-Aubrey C, Tranter MP, Ekenbarger DM y Leonard JL. (1990). Thyroxine-dependent modulation of actin polymerization in cultured astrocytes. *J. Biol. Chem.* **265**, 5296-5302.

Siegrist-Kaiser CA y Burger AG. (1994). Modification on the side chain of thyroid hormones. En: Wu SY y Visser TJ (Eds) *Thyroid Hormone Metabolism: Molecular Biology and Alternate Pathways*. CRC Press, Boca Raton, pp. 183-190.

Silva JE y Larsen PR (1977) Pituitary nuclear 3,5,3'-triiodothyronine and thyrotropin secretion: an explanation for the effect of thyroxine. *Science* **198**, 617-620

Silva J y Leonard J. (1985). Regulation of rat cerebrocortical and adenohipofyseal type II 5'-deiodinase by thyroxine, triiodothyronine and reverse triiodothyronine. *Endocrinology* **116**, 1627-1635.

Snyder PJ. (2000). The pituitary in hipothyroidism. En: Braverman LE y Utiger RD (Eds.) Werner and Ingbar's *The Thyroid. A Fundamental and Clinical Text*. 8a ed. Lippincott-Raven publishers. EUA. pp 811-814.

Soboll S. (1993). Thyroid hormone action on mitochondrial energy transfer. *Biochim. Biophys. Acta* **1144**:1-16.

Solís-S JC y Valverde-R CM. (2006) Hipotiroidismo neonatal: Fisiopatogenia, aspectos moleculares, metabólicos y clínicos. *Rev. Invest. Clin.* **58**, 318-334.



Solis-S JC, Villalobos P, Orozco A y Valverde-R C. (2004). Comparative kinetic characterization of rat thyroid iodotyrosine dehalogenase and iodothyronine deiodinase type 1. *J. Endocrinol.* **181**, 385-392.

Steinsapir 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 enzyme's active center. *Endocrinology* **141**, 1127-1135.

St. Germain DL. (1999). Development effects of thyroid hormone: the role of deiodinases in regulatory control. *Biochem. Soc. Trans.* **27**, 83-88

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

St. Germain DL, Schwartzman RA, Croteau W, Kanamori A, Wang Z, Brown DD y Galton VA. (1994). A thyroid hormone-regulated gene in *Xenopus laevis* encodes a type III iodothyronine 5-deiodinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**, 7767-7771.

Strait KA, Schwartz H L, Perez-Castillo A y Oppenheimer JH. (1990). Relationship of c-erbA mRNA content to tissue triiodothyronine nuclear binding capacity and function in developing and adult rats. *J. Biol. Chem.* **265**, 10514-10521.

Suda T, Demura H y Demura R. (1980). Anterior pituitary hormones in plasma and pituitaries from patients with Cushing's disease. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **51**, 1048-1053.

Surks MI, Koerner D, Dillman W y Oppenheimer JH. (1973). Limited capacity binding sites for L-triiodothyronine (T<sub>3</sub>) in rat liver nuclei: localization to the chromatin and partial characterization of the T<sub>3</sub>-chromatin complex. *J. Biol. Chem.* **248**, 7066-7072.

Surks Mi, Koerner DH y Oppenheimer JH. (1975). *In vitro* binding of L-triiodothyronine to receptors in rat liver nuclei: kinetics of binding, extraction properties and lack of requirements for cytosol proteins. *J. Clin. Invest.* **55**, 50-60.

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

Swanson P, Grau EG, Helms LMH y Dickhoff WW. (1988). Thyrotropic activity of salmon pituitary glycoprotein hormones in the Hawaiian parrotfish thyroid *in vitro*. *J. Exp. Zool.* **245**, 194-199.

- Tagama M y Hirano T. (1990). Changes in tissue and blood concentrations of thyroid hormones in developing chum salmon. *Gen. Comp. Endocrinol.* **76**, 437-443.
- Tata JR. (1963). Inhibition of the biological action of thyroid hormones by actinomycin D and puromycin. *Nature* **197**, 1167-1168.
- Tata JR. (1975). How specific are nuclear 'receptors' for thyroid hormones? *Nature* **257** 18-23.
- Tata JR, Ernster L, Lindberg O. (1962). Control of basal metabolic rate by thyroid hormones and cellular function. *Nature* **193**, 1058-1060.
- Tata JR, Ernster L, Lindberg O, Arrhenius E, Pederson S y Hedman R. (1967). The action of thyroid hormones at the cell level. *Biochem. J.* **86**, 408-428.
- Tata JR y Widnell CC. (1966). Ribonucleic acid synthesis during the early action of thyroid hormones. *Biochem. J.* **98**, 604-620.
- Taurog A. (1970). Thyroid peroxidase and thyroxine biosynthesis. *Recent. Prog. Horm. Res.* **26**, 189-247.
- Tomasi TE. (1991). Utilization rates of thyroid hormones in mammals. *Comp. Biochem. Physiol.* **100A**, 503-516.
- Toyoda N, Harney JW, Berry MJ y Larsen PR. (1994). Identification of critical amino acids for 3,5,3'-triiodothyronine deiodination by human type I deiodinase based on comparative functional-structural analyses of the human dog and rat enzymes. *J. Biol. Chem.* **32**, 20329-20334.
- Toyoda N, Kaptein E, Berry MJ, Harney JW, Larsen PR y Visser TJ. (1997). Structure-activity relationships for thyroid hormone deiodination by mammalian type I iodothyronine deiodinases. *Endocrinology* **138**, 213-219.
- 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.
- Tu HM, Legradi G, Bartha T, Salvatore D, Lechan RM y Larsen PR. (1999). Regional expression of type 3 iodothyronine deiodinase messenger ribonuclei acid in the rat central nervous system and its regulation by thyroid hormone. *Endocrinology* **140**, 784-790.

- Tu HM, Kim SW, Salvatore D, Bartha T, Legradi G, Larsen PR y Lechan RM. (1997). Regional distribution of type 2 thyroxine deiodinase messenger ribonucleic acid in rat hypothalamus and pituitary and its regulation by thyroid hormone. *Endocrinology* **138**, 3359-3368
- Tukey RH y Stassburg CP. (2001). Genetic multiplicity of the human UDP-glucuronosyltransferases and regulation in the gastrointestinal tract. *Mol. Pharmacol.* **59**, 405-414.
- Umesono K, Giguere V, Glass CK, Rosenfeld MG y Evans RM. (1988). Retinoic acid and thyroid hormone induce gene expression through a common responsive element. *Nature* **336**, 262-265.
- Umesono K, Murakami KK, Thompson CC y Evans RM. (1991). Direct repeats as selective response elements for the thyroid hormone, retinoic acid and vitamin D3 receptors. *Cell* **65**, 1255-1266.
- Umesono K y Evans RM. (1989). Determinants of target gene specificity for steroid/thyroid hormone receptors. *Cell* **57**, 1139-1146.
- Utiger RD. (1999). Maternal hypothyroidism and fetal development. *N. Eng. J. Med.* **341**, 601-602.
- Valverde-R C, Aceves C y Reyes-Z E. (1993). Ontogenesis of iodothyronine deiodinase activities in brain and liver of the chick embryo. *Endocrinology* **132**, 867-872.
- Valverde-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.
- Valverde-R C, Orozco A, Becerra A, Jeziorski MC, Villalobos P y Solis-S JC. (2004). Halometabolites and cellular dehalogenase systems: an evolutionary perspective. *Int. Rev. Cytol.* **234**, 143-199.
- Van der Geyten S, Sanders JP, Kaptein E, Darras VM, Kühn ER, Leonard JL y Visser TJ. (1997). Expression of chicken hepatic type I and type III iodothyronine deiodinases during embryonic development. *Endocrinology* **138**, 5144-5152.
- Van der Geyten S, Toguyeni A, Baroiller JF, Fauconneau B, Fostier A, Sanders JP, Visser TJ, Kühn 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.

- Visser TJ, Van der Does-Tobe I, Docter R y Hennemann G. (1975). Conversion of thyroxine into triiodothyronine by rat liver homogenate. *Biochem. J.* **150**, 489–493
- Visser TJ. (1996). Pathways of thyroid metabolism. *Acta Med. Austriaca* **23**, 10-16.
- Visser TJ, Kaptein E, Glatt H, Hagen M y Coughtrie MWH. (1998). Characterization of thyroid hormone sulfotransferases. *Chem. Biol. Interact.* **109**, 279-291.
- Watanabe M, Yasuo S, Watanabe T, Yamamura T, Nakao N, Ebihara S y Yoshimura T. (2004). Photoperiodic regulation of type 2 deiodinase gene in Djungarian hamster: possible homologies between avian and mammalian photoperiodic regulation of reproduction. *Endocrinology* **145**, 1546-1549.
- Weinberger C, Thompson CC, Ong ES, LeboR, Gruol DJ y Evans RM. (1986). The c-erb-A gene encodes a thyroid hormone receptor. *Nature.* **324**, 641,649.
- Wondisford FE, Magner JA y Weintraub BD. (2000) Factors that control thyroid function. Chemistry and biosynthesis of thyrotropin. En: Braverman LE y Utiger RD (Eds.) Werner and Ingbar's *The Thyroid. A Fundamental and Clinical Text*. 8a ed. Lippincott-Raven publishers. EUA. pp 190-202
- Wu S, Green WL, Huang W, Hays MT y Chopra IJ. (2005). Alternate pathways of thyroid hormone metabolism. *Thyroid* **15**, 943-958.
- Yamada M, Radovick S, Wondisford FE, Nakayama Y, Weintraub BD y Wilber JF. (1990). Cloning ad structure of human genomic DNA and hypothalamic cDNA encoding human prepro thyrotropin-releasing hormone. *Mol. Endocrinol.* **4**, 551-556.
- Yamano K, Araki K, Sekikawa K y Inui Y. (1994). Cloning of thyroid hormone receptor genes expressed in metamorphosing flounder. *Dev. Genet.* **15**, 378-382.
- Yamano K y Miwa S. (1998) Differential gene expression of thyroid hormone receptor  $\alpha$  and  $\beta$  in fish development. *Gen. Comp. Endocrinol.* **109** 75-85
- Yamauchi K, Nakajima JI, Hayashi H y Hara A. (1999). Purification and characterization of thyroid hormone binding protein from masu salmon serum: A homolog of higher-vertebrate transthyretin. *Eur. J. Biochem.* **265**, 944–949.
- Yang BY, Greene M y, Chen TT. (1999). Early embryonic expression of the growth hormone family protein genes in the developing rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Mol. Reprod. Dev.* **53**, 127–134.

Yoshimura T, Yasuo S, Watanabe M, Iigo M, Yamamura T, Hirunagi K y Ebihara S. (2003). Light-induced hormone conversion of T<sub>4</sub> to T<sub>3</sub> regulates photoperiodic response of gonads in birds. *Nature* **426**, 178-181.

## Abreviaturas.

3,5-T <sub>2</sub>	3,5-diyodo-L-tironina.
Alb	Albúmina.
AIT	Transportador apical de yodo.
AS	Agua salada ó de mar.
BAT	Tejido graso pardo.
COX	Citocromo oxidasa.
CRE	Elemento de respuesta a AMPc.
Ct	Cortisol.
D1	Desyodasa tipo 1.
D2	Desyodasa tipo 2.
D3	Desyodasa tipo 3.
DBD	Dominio de unión al DNA.
<i>Dio</i>	Gen que codifica para desyodasas.
DIT	Diyodotorosina.
DR4	Motivo de repetición directa espaciado por 4 pares de bases.
EHHT	Eje hipotálamo-hipófisis-tiroides.
EMSA	Ensayo de retardo en la movilidad electroforética.
Fh	<i>Fundulus heteroclitus</i> .
GH	Hormona de crecimiento.
HT	Hormonas tiroideas.
I	Yodo.
IGF-I	Factor de crecimiento insulínico tipo 1.
IOP	Ácido iopanóico.
IRD	Desyodación del anillo interno (Inner ring deiodination).
KO	“Knock out”, organismo al que se le ha bloqueado la expresión de un gen.
LAO	L-aminoácido oxidasa.
MIT	Monoyodotirosina.
MMI	1-metil-2-mercaptoimidazol o metimazol.
Na,K-ATPasa $\alpha$ 1	Subunidad $\alpha$ 1 de la bomba sodio, potasio ATPasa.
NIS	Simporter Na <sup>+</sup> /I <sup>-</sup> .
ORD	Desyodación del anillo externo (outer ring deiodination)
ORE	Elemento de respuesta osmótica.
PAPS	Donador universal 3'-fosfoadenosin-5'-fosfosulfato.
PTU	6-n-propil-2-tiouracilo.
RAR	Receptor al ácido retinóico.
Ratas N	Ratas eutiroideas.
Ratas N + P + I	Ratas a las que se les induce una inhibición aguda de las vías desyodativas con la administración de PTU y IOP.
Ratas P + I	Ratas a las que se les induce hipotiroidismo e inhibición de las vías desyodativas con la administración de PTU y IOP.
RE	Retículo endoplásmico.
rT <sub>3</sub>	3,3',5'-triyodo-L-tironina.
RXR	Receptor a retinoide.

SECIS	Secuencia de inserción de SeCys.
SeCys	Selenocisteína.
SRIH	Somatostatina.
SULT	Sulfotransferasa.
T <sub>3</sub>	3,5,3'-triyodo-L-tironina
T <sub>4</sub>	3,5,3',5'-tetrayodo-L-tironina o tiroxina.
TBG	Globulina transportadora de tiroxina.
Tetrac	Ácido tetrayodoacético
TetracS	tetrac sulfato
Tg	Tiroglobulina.
THRE element).	Elemento de respuesta a yodotiroininas (thyroid hormone response
TMB	Tasa de metabolismo basal.
TPO	Tiroperoxidasa.
TR	Receptor nuclear a hormonas tiroideas.
TRβ1	Receptor a hormonas tiroideas tipo β1
TRH	Hormona liberadora de tirotropina.
TriacS	Triac sulfato.
Triac	Ácido triyodoacético.
TSH	Hormona estimulante de la tiroides o tirotropina
TTR	Transtiretina.
SNC	Sistema nervioso central
UDP-GT o UGT	Uridin difosfato-glucoroniltransferasa.

## ANEXOS.

### I. CONTROL ENDOCRINO DE LA OSMOREGULACIÓN.

El mantenimiento de las condiciones iónicas y osmóticas intra- y extracelulares es crítico para el funcionamiento celular normal. Con algunas excepciones, la mayoría de los vertebrados mantienen un contenido extracelular de sales constante. Excluyendo a la lamprea cuya concentración de NaCl es prácticamente igual a la del agua de mar, en el resto de los peces de agua salada (AS) y de agua dulce (AD), la concentración plasmática de NaCl es de alrededor de 1/3 con respecto a la del AS, o bien, alrededor de 300 veces más elevada que la del AD respectivamente. La conservación de esta homeostasis hidroosmótica implica la continua operación de mecanismos de osmorregulación que permitan, en el caso de los organismos marinos, enfrentar la catastrófica hipovolemia e hipernatremia que dicho ambiente impondría, o bien, en los organismos de AD, la hipervolemia e hiponatremia que resulta del medio acuático correspondiente.

Los animales acuáticos que son capaces de vivir únicamente en un estrecho intervalo de salinidad del medio externo se denominan estenohalinos y presentan mecanismos de osmorregulación diferentes si habitan en AD o en AS. En los peces estenohalinos de AD que continuamente introducen agua a su organismo por la piel, los riñones están especializados en excretar el excedente de agua produciendo orina abundante y diluida, y el intestino no participa en la absorción de agua y sales. En estos peces, la branquia es el órgano osmorregulador más importante y excreta amonio ( $\text{NH}_3$ ) y carbonatos ( $\text{HCO}_3^-$ ), intercambiándolos por sodio ( $\text{Na}^+$ ) y cloro ( $\text{Cl}^-$ ) respectivamente. Se ha propuesto que este mecanismo de osmorregulación está mediado por proteínas de la membrana plasmática que acarrear y/o intercambian dichos iones de manera activa y específica. En contraste, los peces estenohalinos que habitan en los océanos pierden continuamente agua por la piel; tienen un riñón muy poco desarrollado que excreta principalmente iones bivalentes ( $\text{Mg}^{++}$ ,  $\text{Ca}^{++}$ ), y el intestino participa absorbiendo agua y sales. Al igual que en los peces de AD, las branquias excretan  $\text{NH}_3^+$  pero con la diferencia de que en lugar de introducir sales, las excretan. Esta excreción está mediada por la actividad de la bomba Na,K-ATPasa (Maetz, 1970; Hoar, 1979).



Una cantidad minoritaria (~5%) de las especies de peces tienen la capacidad de mantener la composición de sus fluidos corporales tanto en ambientes diluidos como concentrados y son conocidas como especies eurihalinas (Marshall y Grosell, 2006). En las especies eurihalinas, la respuesta a los cambios de salinidad puede ser rápida, como los que ocurren durante los ciclos de mareas y en los cambios de lugar dentro de los mismos estuarios; o lenta en especies migratorias que modifican su tolerancia a la salinidad de manera estacional u ontogenética. Estas especies eurihalinas mantienen su concentración osmótica plasmática aproximadamente a un tercio de la concentración del AS, sin importar el medio en el que se encuentren. En estos organismos, los riñones y las branquias modifican su función al cambiar la salinidad del medio. En el caso concreto de las branquias, esto significa que tienen la capacidad de introducir o eliminar  $\text{Na}^+$  utilizando mecanismos distintos, de tal manera que en uno de ellos no se requiere de energía, mientras que el otro implica un gasto importante de ATP.

Como se describirá a continuación, en los peces el sistema neuroendocrino es una parte esencial de estas adaptaciones osmoregulatorias, siendo el vínculo entre los cambios medioambientales y la respuesta fisiológica (Mc Cormick, 2001; 2006).

## ACLIMATACIÓN AL MEDIO MARINO.

### Eje GH/IGF-I

La hormona del crecimiento (GH), junto con el factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-I) juegan un papel primordial en la adaptación al agua salada. El tratamiento a corto y largo plazo con GH estimula el crecimiento y la tolerancia a la salinidad de distintas especies de salmones y de la trucha arcoiris (Komourdjian *et al.*, 1976; Saunders *et al.*, 1998; Devlin *et al.*, 2000; Bolton *et al.*, 1987). Al menos parte del efecto osmoregulatorio de la GH se produce a través del IGF-I, cuya administración incrementa la tolerancia al AS (Mc Cormick *et al.*, 1991b; 1996; Seidelin *et al.*, 1999).

Los cambios en la respuesta endocrina a la exposición al agua de mar también han aportado evidencias sobre el papel de la GH y el IGF-I. Tras la exposición a una mayor salinidad:

- Los niveles plasmáticos de la GH incrementan en distintos salmonidos y en la trucha arcoiris (Sakamoto *et al.*, 1993).
- Se incrementa la tasa metabólica de depuración de la GH (Sakamoto *et al.*, 1990).
- Los niveles plasmáticos del IGF-I permanecen elevados de 2 a 14 días posteriores a la exposición en el salmón del Atlántico, (Mc Cormick *et al.*, 2001).
- En la tilapia Mozambique se han encontrado niveles elevados del IGF-I en las células de cloro ricas en mitocondrias (CCRM) de la branquia y en las células epiteliales del túbulo proximal del riñón (Reinecke *et al.*, 1997).
- Los niveles del mRNA IGF-I hepático, branquial y renal incrementan en el salmon coho (Sakamoto *et al.*, 1995).
- La ocupación de los receptores a la GH del hígado incrementa (Sakamoto y Hirano (1991).

El principal órgano blanco de la GH y el IGF-I es la branquia. Tanto la GH como el IGF-I estimulan el número y el tamaño de las CCRM, en salmonidos y en tilapia (Fig. 1; Sakamoto *et al.*, 1993; Xu *et al.*, 1997). Estas células son el principal sitio de excreción salina en la branquia. Además, ambas hormonas incrementa tanto la actividad como el nivel del mRNA de la Na,K-ATPasa branquial en salmonidos, tilapia y *Fh* (Madsen *et al.*, 1995; Mancera y Mc Cormick 1998; Xu *et al.*, 1997; Sakamoto *et al.*, 1997). Asimismo, la GH regula positivamente al cotrasportador  $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$  de las CCRM en el salmon del Atlántico (Pelis y Mc Cormick, 2001).

El efecto de la GH sobre la Na,K-ATPasa parece ser indirecto, a través de IGF-I. Tras la inyección de GH ó tras la exposición a agua de mar, los niveles del mRNA IGF-I se incrementan tanto en la branquia como en el riñón, indicando que la producción local de IGF-I actúa de manera parácrina en estos órganos (Sakamoto y Hirano, 1991).

### Cortisol.

El cortisol es el principal mineralocorticoide en los peces. El cortisol promueve la excreción de electrolitos en peces que habitan en AS (Henderson *et al.*, 1970; Maetz *et al.*, 1970). En especies eurihalinas no migratorias transferidas a diferentes

salinidades se han observado incrementos en las concentraciones circulantes de cortisol (Assem y Hanke, 1981), que se acompañan de un aumento en la actividad Na,K-ATPasa en la branquia (Redding *et al.*, 1984; 1991; Langhorne y Simpson, 1986; Björnsson *et al.*, 1987; Richman y Zaugg, 1987).

El eje GH/IGF-I actúa conjuntamente con el cortisol en la regulación de la secreción salina en los teleósteos:

- La estimulación de la actividad de la Na,K-ATPasa y la tolerancia a la salinidad en salmonidos y en el *Fh* es mayor tras la administración conjunta de cortisol y GH que por cada una de estas hormonas (Madsen, 1990; Madsen y Korsgaard, 1991; Mc Cormick 1996; Mancera y Mc Cormick, 1999).
- La co-administración del IGF-I y cortisol estimulan la actividad de la Na,K-ATPasa, aunque en menor medida comparado con la co-administración de GH y cortisol (Mc Cormick, 1996).
- El tratamiento con GH produce un incremento en el número de receptores a cortisol en la branquia en dos especies de salmones (Shrimpton *et al.*, 1995; Shrimpton y Mc Cormick, 1998). El número de receptores a cortisol correlaciona con la capacidad del cortisol de inducir la actividad de la Na,K-ATPasa tanto *in vivo* como *in vitro* (Mc Cormick *et al.*, 1991a; Shrimpton *et al.*, 1994; Shrimpton y Mc Cormick, 1999).
- Mientras que la GH produce una proliferación celular generalizada en la branquia, el cortisol participa en la diferenciación de dichas células hacia CCRM (Fig. 1; Laurent *et al.*, 1994).
- La exposición a GH incrementa la sensibilidad a la adrenocorticotropina (ACTH) - hormona hipofisiaria que estimula la liberación de cortisol- en el tejido interrenal del salmon Coho (Young, 1988).
- La hormona liberadora de corticotropina es un potente estimulador de la liberación de la GH en la anguila europea (Rousseau *et al.*, 1999).

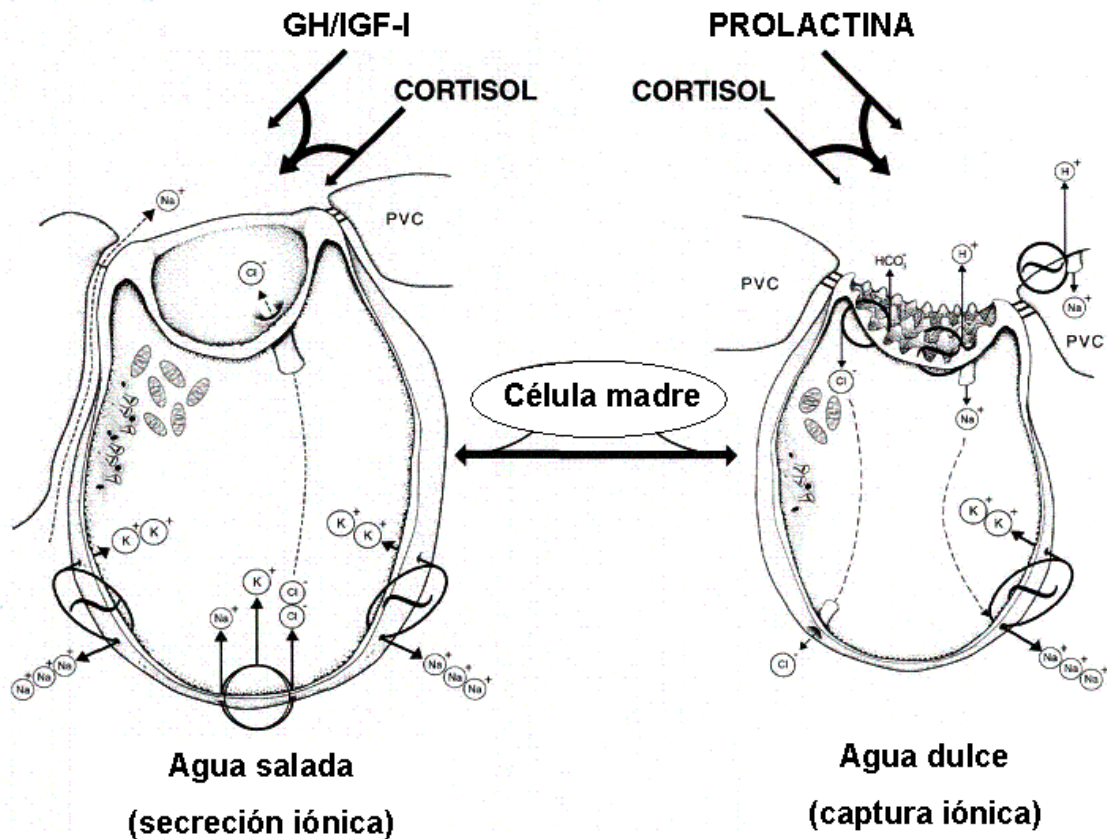


Figura 1. Morfología y mecanismo de transporte de de las CCRM branquiales en agua dulce y agua salada. En el agua salada las CCRM son más grandes y presentan una cripta apical, mientras que en agua dulce son de menor tamaño y presentan microvellosidades apicales. La GH y el cortisol pueden promover la diferenciación de las CCRM de agua salada de manera individual e interactuar en el control de la capacidad de transporte epitelial. La prolactina inhibe la formación de la CCRM de agua salada y promueve el desarrollo de las CCRM de agua dulce. PVC, células pavimentosas (McCormick, 2001).

## ACLIMATACION AL MEDIO DULCEACUÍCOLA.

### Prolactina.

La prolactina juega un papel esencial en la adaptación al agua dulce, al incrementar la concentración iónica plasmática (principalmente de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$ ) así como disminuir la permeabilidad al agua de los órganos osmoregulatorios (branquia, riñón, intestino, vejiga urinaria y piel) (Pickford y Phillips, 1959):

- La administración de PRL en el sargo dorado (*Rhabdosargus sarba*) produce una disminución en la concentración del mRNA de la subunidad  $\alpha$  de la  $\text{Na},\text{K}\text{-ATPasa}$  de la branquia, sin modificar la subunidad  $\beta$  (Deane *et al.*, 1999); mientras que en

la trucha (*Salmo trutta*), la subunidad  $\alpha$  no se modifica (Seidelin y Madsen , 1999).

- Modifica la morfología y distribución de las CCRM (Fig. 1) inhibiendo el desarrollo de las CCRM de tipo específico de agua salada (Herndon *et al.*, 1991; Madsen *et al.*, 1997) mientras que promueve la morfología de las células de captura iónica (Pisam *et al.*, 1993; Perry y Goss, 1994).
- Disminuye la permeabilidad osmótica branquial (Clarke y Bern, 1980; Brown y Brown, 1987) y actúa aumentando la secreción de las células mucosas de la branquia, lo cual contribuye en la regulación del balance iónico e hídrico en el agua dulce, impidiendo el paso de las moléculas a través de las células branquiales (Bentley, 1998).
- En el riñón, incrementa la reabsorción de  $\text{Na}^+$  y la excreción de agua . La inyección con PRL incrementa la actividad  $\text{Na,K-ATPasa}$  renal en *Fh* hipofisectomizados (Pickford *et al.*, 1970).
- Disminuye la osmolaridad urinaria presumiblemente al disminuir la permeabilidad al agua de los túbulos renales (Clarke y Bern, 1980).
- En el intestino, disminuye la absorción de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  y agua posiblemente al disminuir la permeabilidad del intestino al agua y a las sales y al disminuir la actividad  $\text{Na,K-ATPasa}$  intestinal; sin embargo existen variaciones entre las especies (Collie y Hirano, 1987; Manzon, 2002).
- En la vejiga natatoria, disminuye la permeabilidad osmótica, aumenta ó no modifica el transporte de  $\text{Na}^+$ , aumenta la actividad  $\text{Na,K-ATPasa}$  y permite una expansión de los espacios intercelulares epiteliales en especies eurihalinas marinas (Clarke y Bern, 1980, Bentley, 1987; Hirano *et al.*, 1973).
- En la piel, aumenta el número y secreción de las células mucosas dando como resultado la reducción de la permeabilidad de la piel a iones y agua (Manzon, 2002).

## Cortisol.

Existe también evidencia sólida indicando que el cortisol participa en la captura iónica durante la adaptación al agua dulce:

- La transferencia de agua salada a agua dulce de distintas especies resulta en un incremento transitorio (anguila europea, tilapia, *Fh* y carpa) ó que perdura por varias semanas (lisa, lenguado, robalo y pez dorado) en la concentración plasmática del cortisol (Mc Cormick, 2001).
- El tratamiento con dosis fisiológicas de cortisol incrementa la captura de  $\text{Na}^+$  branquial y renal tanto en animales intactos como adrenalectomizados adaptados al agua dulce (Maetz y Morel 1965; Mayer *et al.*, 1967, Chan *et al.*, 1969).
- La administración de cortisol a animales hipofisectomizados restaura (Lahlou y Giordan, 1970) o incrementa (Chan *et al.*, 1968) la osmolaridad plasmática en el pez dorado y la anguila.
- El tratamiento con ACTH incrementa la supervivencia de dos especies de teleósteos (*Gambusia* y *Amia calva*) sometidas a hipofisectomía (Chambolle, 1967; Hanson *et al.*, 1976).
- El tratamiento con cortisol también incrementa el área de la superficie de las CCRM y el influjo de sodio y cloro en la trucha arcoiris, la anguila europea, la tilapia mozambique y el pez gato (Perry *et al.*, 1992).
- El cortisol incrementa los niveles plasmáticos de cloro en animales hipofisectomizados; y es necesario, junto con la prolactina, para mantener la homeostasis iónica y los niveles plasmáticos de  $\text{Na}^+$  (Fortner y Pickford, 1982; Parwez y Gozwami, 1985; Eckert *et al.*, 2001).

El mecanismo a través del cual el cortisol participa en la regulación en el agua dulce ha sido poco estudiado. Chester Jones y cols (1969) propusieron la hipótesis de que la ACTH y el cortisol pudieran ser importantes manteniendo activa la bomba de sodio, mientras que la prolactina principalmente regularía la permeabilidad. Aún no es claro si la regulación de la  $\text{Na,K-ATPasa}$  por cortisol es parte del mecanismo de captura iónica. Si este es el caso, entonces el efecto del cortisol sobre la  $\text{Na,K-ATPasa}$  branquial pudiera ser un mecanismo a través del cual el cortisol participe de manera dual en la osmoregulación. Además, el cortisol

aparentemente actúa promoviendo la diferenciación de las CCRM hacia la morfología específica necesaria en el agua dulce (Perry *et al.*, 1992).

#### PAPEL DE LAS HORMONAS TIROIDEAS.

La evidencia acerca del efecto osmoregulatorio de las hormonas tiroideas (TH) en peces es escasa y confusa:

- Las yodotiroininas modifican la actividad Na,K-ATPasa en retos de salinidad tanto en el *Oncorhyncus kisutch* (Folmar y Dickhoff, 1979) como en el *Salmo salar* (Prunet *et al.*, 1989; Persson *et al.*, 1998).
- La administración de T<sub>4</sub> contribuye al incremento en la actividad Na,K-ATPasa en la branquia y en el número de CCRM en el salmón del Atlántico (Madsen y Korsgaard, 1991).
- Dosis fisiológicas de T<sub>4</sub> y T<sub>3</sub> en tilapia Mozambique resultan en un incremento en el tamaño de las CCRM, en la actividad Na,K-ATPasa branquial y en los niveles plasmáticos de Na<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup>, sugiriendo que las TH pudieran participar en la secreción iónica en esta especie (Peter *et al.*, 2000).
- La administración de T<sub>3</sub> a truchas arcoiris incrementa el número de CCRM, sin modificar la actividad Na,K-ATPasa (Trombetti *et al.*, 1996).
- La inhibición del eje tiroideo con tiourea provoca un incremento en la osmolaridad y los niveles séricos de Na<sup>+</sup> en *Fh* aclimatados al agua salada, pero no en el agua dulce (Knoeppel *et al.*, 1982).
- La T<sub>4</sub> parece tener un papel importante en el desarrollo de la habilidad hiposmorregulatoria en el lenguado (Schreiber y Specker, 1999; 2000).

Algunos estudios han mostrado que las TH pudieran tener una interacción sinérgica con otras hormonas clásicamente osmoregulatorias como el cortisol y el eje GH/IGF-I:

- El tratamiento con T<sub>4</sub> potencia el efecto del cortisol ó de la GH, sobre la actividad Na,K-ATPasa branquial en la tilapia en el *Oncorhyncus rhodurus*, respectivamente (Dange, 1986; Miwa y Inui, 1985).

- La inhibición de la conversión de  $T_4$  a  $T_3$  obstaculiza la aclimatación al agua salada tanto fisiológica y como la inducida por GH en la trucha arcoiris, (Lebel y Leloup, 1992; Leloup y Lebel, 1993).
- La  $T_3$  incrementa el número de receptores a cortisol en la branquia del salmón del Atlántico y de la trucha arcoiris. Este efecto se potencia con la co-administración con GH (Shrimpton y Mc Cormick, 1998; 1999).
- La  $T_3$  incrementa la capacidad del cortisol de inducir la actividad de la Na,K-ATPasa *in vitro* (Shrimpton y Mc Cormick, 1999).

Otra evidencia del papel de las hormonas tiroideas en la osmoregulación ha sido sugerida por las modificaciones en los niveles circulantes de TH así como en sus vías metabólicas durante los cambios de salinidad.

- La exposición de la trucha arcoiris a un reto hiperosmótico discreto induce un incremento en la concentración plasmática de  $T_4$  (2-4h post-reto) y de  $T_3$  (24-48 h post-reto) acompañada de una disminución sostenida de la actividad D1 renal y D2 hepática a partir de las 8 h post-reto. Sin embargo, las actividades D1 branquial y hepática no presentaron modificaciones, sugiriendo que la respuesta tiroidea a este cambio de salinidad es de tipo órgano-específica (Orozco *et al.*, 2000).
- La exposición de *S. auratus* a un reto hiposmótico a mediano plazo (18 días) induce un incremento en los niveles circulantes de  $T_4$  acompañado de una disminución en la actividad D1 branquial. (Klaren *et al.*, 2000).
- Un cambio de salinidad hiposmótico en el *F. heteroclitus* mostró un aumento significativo en la actividad D2 hepática a partir de las 12 h post-reto y que perdura por 72 h; la actividad D1 no sufrió modificaciones (Orozco *et al.*, 1998).

Quizá la evidencia más clara de la contribución de las HT a la aclimatación a cambios de salinidad sea la identificación de dos elementos de respuesta a osmolaridad (ORE) en la región promotora del gen de la D2 del *Fh*. Estos elementos se unen a proteínas nucleares específicas en respuesta a un cambio de salinidad hiposmótico y el reclutamiento proteínico precede al incremento de la actividad y de



la concentración de mRNA de la D2 hepática (López-Bojórquez *et al.*, 2007). De esta manera, aún cuando el estudio de la participación de las HT en la osmoregulación debe fortalecerse, parece evidente que estas hormonas juegan un papel primordial en la osmoregulación en peces.

#### REFERENCIAS.

- Assem H y Hanke W. (1981). Cortisol and osmotic adjustment of the euryhaline teleost, *Sarotheron mossambicus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **43**, 370-380.
- Bentley PJ. (1987). Actions of hormones on salt and water transport across cutaneous and urinary bladder epithelia. En: Pang PKT y Schreibman MP (Eds). *Vertebrate Endocrinology: Fundamentals and Biomedical Implications*. Academic Press, San Diego. Vol 2, pp. 271-291.
- Bentley PJ. (1998). *Comparative Vertebrate Endocrinology*. 3a ed. Cambridge University Press.
- Björnsson BT, Yamauchi K, Nishioka RS, Deftos LJ y Bern HA. (1987). Effects of hypophysectomy and subsequent hormonal replacement therapy on hormonal and osmoregulatory status of coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **68**, 421-430.
- Bolton JP, Collie NL, Kawauchi H y Hirano T. (1987). Osmoregulatory actions of growth hormone in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J. Endocrinol.* **112**, 63-68.
- Brown PS y Brown SC. (1987). Osmoregulatory actions of prolactin and other adenohypophysial hormones. En: Pang PKT y Schreibman MP (Eds). *Vertebrate Endocrinology: Fundamentals and Biomedical Implications*. Academic Press, San Diego. Vol 2, pp. 45-85.
- Chambolle P. (1967). Influence de l'injection d'ACTH sur la survie de *Gambusia sp* (poisson teleostéen) privé d'hypophyse. *C. R. Hebd. Seances Acad. Sci.* **264**, 1464-1466.
- Chan DKO, Chester Jones I y Mosley W. (1968). Pituitary and adrenocortical factors in the control
- Chan DKO, Rankin JC y Chester Jones I. (1969). Influences of the adrenal cortex and the corpuscles of Stannius on osmoregulation in the European eel (*Anguilla anguilla* L). *Gen. Comp. Endocrinol Suppl.* **2**, 342-353.
- Chester Jones I, Chan DKO, Hederson W y Ball JN. (1969). Adrenocortical steroids, adrenocorticotropin and corpuscle of Stannius. En: Hoar WS y Randall DJ (Eds.). *Fish physiology*, Academic Press, New York. pp 321-376.
- Clarke WC y Bern HA. (1980). Comparative endocrinology of prolactin. En: Li CH (Ed) *Hormonal Proteins and Peptides*. Academic Press, Nueva York. Vol III pp. 105-197.

- Collie NL y Hirano T. (1987). Mechanisms of hormone actions on intestinal transport. En: Pang PKT y Schreibman MP (Eds). *Vertebrate Endocrinology: Fundamentals and Biomedical Implications*. Academic Press, San Diego. Vol 2, pp 239-270.
- Dange AG. (1986). Branchial Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity in freshwater and seawater acclimated tilapia *Oreochromis (Sarotherodon) mossambicus*: Effects of cortisol and thyroxine. *Gen. Comp. Endocrinol.* **62**, 341-343.
- Deane EE, Kelly SP y Woo NYS. (1999). Hormonal modulation of branchial Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase subunit mRNA in a marine teleost *Sparus Sarba*. *Life Sci.* **64**, 1819-1829.
- Devlin RH, Swanson P, Clarke WC, Plisetskaya E, Dickhoff W, Moriyama, Yesaki TY y Hew CL. (2000). Seawater adaptability and hormone levels in growth-enhanced transgenic coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. *Aquaculture* **191**, 367-385.
- Eckert SE, Yada T, Shephard KL, Stetson MH, Hirano T y Grau EG. (2001). Hormonal control of osmoregulation in the channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **122**, 270-286.
- Folmar LC y Dickhoff WW(1979). Plasma thyroxine and gill Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase changes during seawater acclimation of coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. *Comp. Biochem. Physiol. A* **63**, 329-332.
- Fortner NA y Pickford GE. (1982). The effects of hypophysectomy and replacement therapy with prolactin, cortisone or their combination on the blood of the black bullhead *Ocatalurus melas*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **47**, 111-119.
- Hanson RC, Duff D, Brehe J y Fleming WR. (1976). The effects of various salinities, hypophysectomy, and hormone treatments on the survival and sodium and potassium content of juvenile bowfin, *Amia calva*. *Physiol. Zool.* **49**, 376-385.
- Henderson IW, Chan DKO, Sandor T y Jones C. (1970). The adrenal cortex and osmoregulation in teleost. En: *Hormones and Environment*. Memoirs of the Society for Endocrinology. Benson GK y Phillips JG (Eds).
- Herndon TM, Mc Cormick SD y Bern HA. (1991). Effects of prolactin on chloride cells in opercular membrane of seawater-adapted tilapia. *Gen. Comp. Endocrinol.* **83**, 282-289.
- Hirano T. (1986). The spectrum of prolactin action in teleost. En: *Comparative Endocrinology: Development and Directions*. Ralph CL (Ed). AR Liss, Nueva York, pp 53-74.
- Hirano T, Johnson DW, Bern HA y Utida S. (1973). Studies on water and ion movements in the isolated urinary bladder of selected freshwater, marine and euryhaline teleosts. *Comp Biochem Physiol A.* **45**, 529-540.
- Hoar WS. (1979). *Fisiología Animal Comparada*. Capítulos 8 y 11. 2ª ed. Ed. Omega. Barcelona.
- Klaren PHM, Guzmán JM, Mancera JM, Geven EJW, Flik G. (2000). The Involvement of Thyroid Hormone Metabolism in Gilthead Sea Bream (*Sparus auratus*) Osmoregulation. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1040**: 360-362

- Knoeppel SJ, Atkins DL y Packer RK. (1982). The role of the thyroid gland in osmotic and ionic regulation in *Fundulus heteroclitus* acclimated to freshwater and seawater. *Comp. Biochem. Physiol.* **73A**, 25-29.
- Komourdjian MP, Saunders RL y Fenwick JC. (1976). The effect of porcine somatotropin on growth and survival in seawater of Atlantic salmon (*Salmo salar*) parr. *Can. J. Zool.* **54**, 531-535.
- Lahlou B y Giordan A. (1970). Le controle hormonal des eschages et de la balance de l'eau chez le Teleosteen de 'eau douce *Carassius auratus*, intact et hypophysectomise. *Gen. Comp. Endocrinol.* **14**, 491-509.
- Langhorne P y Simpson TH. (1986). The interrelationship of cortisol, gill (Na<sup>+</sup> K<sup>+</sup>) ATPase, and homeostasis during the Parr-Smolt transformation of Atlantic salmon (*Salmo salar L.*). *Gen. Comp. Endocrinol.* **61**, 203-213.
- Laurent P, Dunelerb S, Chevalier C y Lignon J. (1994). Gill epithelial cells kinetics in a freshwater teleost, *Oncorhynchus mykiss* during adaptation to ion-poor water and hormonal treatment. *Fish Physiol. Biochem.* **13**, 353-370.
- Lebel JM y Leloup J. (1992). Triiodothyronine is required for the acclimation to seawater of the brown trout (*salmo trutta*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiis*). *C. R. Acad. Sci. (III)* **314**, 461-468.
- Leloup J y Lebel JM. (1993). Triiodothyronine is necessary for the action of growth hormone in acclimation to seawater of brown (*Salmo trutta*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish. Physiol Biochem.* **11**, 165-173.
- López-Bojórquez L, Villalobos P, García-G C, Orozco A y Valverde-R C. (2007) Functional identification of an osmotic response element (ORE) in the promoter region of the killifish deiodinase 2 gene (*FhDio2*). *J. Exp. Biol.* **210**, 3126-3132.
- Madsen SS. (1990). The role of cortisol and growth hormone in seawater adaptation and development of hypoosmoregulatory mechanisms in sea trout parr (*Salmo trutta trutta*). *Gen. Comp. Endocrinol.* **79**, 1-11.
- Madsen SS, Jensen MK, Nohr J y Kristiansen. (1995). Expression of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase in the brown trout, *Salmo trutta*: *In vivo* modulation by hormones and seawater. *Amer. J. Physiol. -Regul. Integr. C* **38**, R1339-R1345.
- Madsen SS, Noshioka RS y Bern H. (1997). Prolactin antagonises seawater acclimation in the anadromous striped bass, *Morone saxatilis*. En: *Advances in Comparative Endocrinology*. Kawashirna S y Kikuyama S (Eds) Monduzzi Editore, Italy. Vol 2, pp. 1011-1015
- Madsen SS y Korsgaard B. (1991). Opposite effects of 17 beta-estradiol and combined growth hormone-cortisol treatment on hypo-osmoregulatory performance in sea trout presmolts, *Salmo trutta*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **83**, 276-282.
- Maetz J. (1970). Mechanisms of salt and water transfer across membranes in teleost in relation to aquatic environment. En: *Hormones and Environment*. Memoirs of the Society for Endocrinology. Benson GK y Phillips JG. (Eds).

- Maetz J y Morel F. (1965). Mecanismos endocrines comuns de l'osmoregulation chez les vertebres. *Arch. Anat. Microsc. Morphol. Exp.* **54**, 515-530.
- Mancera JM y Mc Cormick SD. (1998). Evidence for growth hormone/insulin-like growth factor I axis regulation of seawater acclimation in the euryhaline teleost *Fundulus heteroclitus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **111**, 103-112.
- Mancera JM y Mc Cormick SD. (1999). Influence of cortisol, growth hormone, insulin-like growth factor and 3,3',5-triiodo-L-thyronine on hypoosmoregulatory ability in the euryhaline teleost *Fundulus heteroclitus*. *Fish Physiol. Biochem.* **21**, 25-33.
- Manzon LA. (2002). The role of prolactin in fish osmoregulation: A review. *Gen. Comp. Endocrinol.* **125**, 291-310.
- Marshal W y Grosell M. (2006). Ion transport, osmoregulation and acid-base balance. En: Evans DH y Claiborne JB (Eds.) *The physiology of fishes*. CRC Press. Boca Raton, FL, EUA. pp 179-203.
- Mayer N, Maetz J, Cham DKO, Forster ME y Chester Jones I. (1967). Cortisol, a sodium excreting factor in the eel (*Anguilla anguilla*). *Nature* **214**, 1118-1120.
- Mc Cormick SD. (1996). Effects of growth hormone and insulin-like growth factor 1 on salinity tolerance and gill  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase in Atlantic salmon (*Salmo salar*): Interactions with cortisol. *Gen. Comp. Endocrinol.* **101**, 3-11.
- Mc Cormick SD. (2001). Endocrine Control of Osmoregulation in Teleost Fish. *Amer. Zool.* **41**, 781-794.
- Mc Cormick SD, Bradshaw D. (2006). Hormonal control of salt and water balance in vertebrates. *Gen. Comp. Endocrinol.* **147**, 3-8.
- Mc Cormick SD, Dickhoff WW, Duston J, Nishioka RS y Bern HA. (1991a). Developmental differences in the responsiveness of gill  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase to cortisol in salmonids. *Gen. Comp. Endocrinol.* **84**, 308-317.
- Mc Cormick SD, Sakamoto T, Hasegawa S y Hirano T. (1991b). Osmoregulatory action of insulin-like growth factor I in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Endocr.* **130**, 87-92.
- Miwa S y Inui Y. (1985). Effects of L-thyroxine and ovine growth hormone on smoltification of amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*). *Gen. Comp. Endocrinol.* **58**, 436-442.
- Orozco A, Linser Paul J y Valverde-R C. (1998). Salinity modifies hepatic outer-ring deiodinating activity in *Fundulus heteroclitus*. *Trends in comparative Endocrinology and Neurobiology Ann. N.Y. Acad. Sci* **839**, 409-411.
- Orozco A, Villalobos P y Valverde-R C. (2002). Environmental salinity modifies outer-ring deiodinating activity of liver, kidney and gill in the rainbow trout. *Comp. Biochem. Physiol. Part A* **131**, 387-395.
- Parwez I y Gozwami SV. (1985). Effects of prolactin, adrenocorticotrophin, neurohypophysial peptides, cortisol and androgens on some osmoregulatory parameters of the hypophysectomized catfish, *Heteropneustes fossilis* (Block). *Gen. Comp. Endocrinol.* **58**, 51-68.
- Pelis R y Mc Cormick SD. (2001). Effects of growth hormone and cortisol on  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ - $2\text{Cl}^-$  co-transporter localization and abundance in the gills of Atlantic salmon. *Gen. Comp. Endocrinol.* **124**, 134-143.

- Perry SF, Goss GG y Laurent P. (1992). The interrelation between gill chloride cell morphology and iodine uptake in four freshwater teleosts. *Can. J. Zool.* **70**, 1775-1786.
- Perry SF y Goss GG. (1994). The effects of experimentally altered gill chloride cell surface area on acid-base regulation in rainbow trout during metabolic alkalosis. *J. Comp. Physiol. B* **164**, 327-336.
- Persson P, Sundell K, Bjornsson BT y Lundqvist H. (1998). Calcium metabolism and osmoregulation during sexual maturation of river running Atlantic salmon. *J. Fish Biol.* **52**, 334-349
- Peter MS, Lock RC y Bonga SW. (2000). Evidence for an osmoregulatory role of thyroid hormones in the freshwater mozambique tilapia *Oreochromis mossambicus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **120**, 157-167.
- Pickford GE, Griffith RW, Torretti J, Hendlez E y Epstein FH. (1970). Branchial reduction and renal stimulation of (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase by prolactin in hypophysectomized killifish in fresh water. *Nature.* **228(5269)**, 378-379.
- Pickford GE y Phillips JG. (1959). Prolactin, a factor promoting survival of hypophysectomized killifish in freshwater. *Science* **130**, 454-455.
- Pisam M, Auperin B, Prunet P, Retier-Delrue F, Martial J y Rambourg A. (1993). Effects of prolactin on  $\alpha$  and  $\beta$  chloride cells in the gill epithelium of the saltwater adapted tilapia *Oreochromis niloticus*. *Anat. Rec.* **235**, 275-284.
- Prunet P, Boeuf G, Bolton J P y Young G. (1989). Smoltification and seawater adaptation in atlantic salmon (*Salmo salar*): Plasma prolactin, growth hormone, and thyroid hormones. *Gen. Comp. Endocrinol.* **74**, 355-364.
- Redding JM, Patino R y Schreck CB. (1984). Clearance of corticosteroids in yearling coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*, in fresh water and seawater and after stress. *Gen. Comp. Endocrinol.* **54**, 433-443.
- Redding JM, Patino R y Schreck CB. (1991). Cortisol effects on plasma electrolytes and thyroid hormones during smoltification in coho salmon *Oncorhynchus kisutch*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **81**, 373-82.
- Reinecke M, Schmid A, Ermatinger R y Loffingcueni D. (1997). Insulin-like growth factor I in the teleost *Oreochromis mossambicus*, the tilapia: Gene sequence, tissue expression and cellular localization. *Endocrinology* **138**, 3613-3619.
- Richman NH 3o y Zaugg WS. (1987). Effects of cortisol and growth hormone on osmoregulation in pre- and desmoltified coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Gen. Comp. Endocrinol.* **65**, 189-198.
- Rousseau K, Le Belle N, Marchelidon J y Dufour S. (1999). Evidence that corticotropin-releasing hormone acts as a growth hormone-releasing factor in a primitive teleost, the European eel (*Anguilla anguilla*). *J. Neuroendocrinol.* **11**, 385-392.
- Sakamoto T, Hirano T, Madsen SS, Nishioka RS y Bern HA. (1995). Insulin-like growth factor -I gene expression during parr- smolt transformation of coho salmon. *Zool. Sci.* **12**, 249-252.
- Sakamoto T, Mc Cormick SD y Hirano T. (1993). Osmoregulatory actions of growth hormone and its mode of action in salmonids: A review. *Fish Physiol. Biochem.* **11**, 155-164.

- Sakamoto T, Ogasawara T y Hirano T. (1990). Growth hormone kinetics during adaptation to a hyperosmotic environment in rainbow trout. *J. Comp. Physiol. B* **160**, 1-6.
- Sakamoto T, Shepherd BS, Masen SS, Nishioka RS, Siharath K, Richman NH, Bern HA y Grau EG. (1997). Osmoregulatory actions of growth hormone and prolactin in an advanced teleost. *Gen. Comp. Endocrinol.* **106**, 95-101.
- Sakamoto T y Hirano T. (1991). Growth hormone receptors in the liver and osmoregulatory organs in rainbow trout: Characterization and dynamics during adaptation to seawater. *J. Endocrinol.* **130**, 425-433.
- Saunders RL, Fletcher GL y Hew CL. (1998). Smolt development in growth hormone transgenic Atlantic salmon. *Aquaculture* **168**, 177-193.
- Schreiber AM y Specker JL (1999). Metamorphosis in the summer flounder, *Paralichthys dentatus*: Thyroidal status influences salinity tolerance. *J. Exp. Zool.* **284**, 414-424.
- Schreiber AM y Specker JL. (2000). Metamorphosis in the summer flounder, *Paralichthys dentatus*: Thyroid status influences gill mitochondria-rich cells. *Gen. Comp. Endocrinol.* **117**, 238-250.
- Seidelin M, Madsen SS, Byrialsen A y Kristiansen K. (1999). Effects of insulin-like growth factor.I and cortisol on Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase expression in osmoregulatory tissues of brown trout (*Salmo trutta*). *Gen. Comp. Endocrinol.* **113**, 331-342.
- Seidelin M y Madsen SS. (1999). Endocrine control of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase and chloride cell development in brown trout (*Salmo trutta*): Interaction of insulin-like growth factor-1 with prolactin and growth hormone. *J. Endocrinol.* **162**, 127-135.
- Shrimpton JM, Bernier NJ y Randall DJ. (1994). Changes in cortisol dynamics in wild and hatchery-reared juvenile coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) during smoltification. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **51**, 2179-2187.
- Shrimpton JM, Devlin RH, McLean E, Byatt JC, Donaldson EM y Randall DJ. (1995). Increases in gill cytosolic corticosteroid receptor abundance and saltwater tolerance in juvenile coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) treated with growth hormone and placental lactogen. *Gen. Comp. Endocrinol.* **98**, 1-15.
- Shrimpton JM y Mc Cormick SD. (1998). Regulation of gill cytosolic corticosteroid receptors in juvenile Atlantic salmon: interaction effects of growth hormone with prolactin and triiodothyronine. *Gen. Comp. Endocrinol.* **112**, 262-274.
- Shrimpton JM y Mc Cormick SD. (1999). Responsiveness of gill Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase to cortisol is related to gill corticosteroid receptor concentration in juvenile rainbowtrout. *J. Exp. Biol.* **202**: 987-995.
- Trombetti F, Ventrella V, Pagliarani A, Ballestrazzi R, Galeotti M, Trigari G, Pirini M y Borgatti AR. (1996). Response of rainbow trout gill (Na<sup>+</sup>+K<sup>+</sup>)-Atpase and chloride cells to T3 and NaCl administration. *Fish Physiol. Biochem.* **15**, 265-274.

Xu B, Miao H, Zhang P y Li D. (1997). Osmoregulatory actions of growth hormone in juvenile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fish Physiol. Biochem.* **17**, 295-301.

Young G. (1988). Enhanced response of the interrenal of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) to ACTH after growth hormone treatment in vivo and in vitro. *Gen. Comp. Endocrinol.* **71**, 85-92.

## Effects of iodothyronines on 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, Queretaro 76230, Qro., Mexico*

Accepted 15 September 2003

### Abstract

Substrate availability has been thought to be a major regulator of the outer-ring deiodinating pathway (ORD) in fish. However, current information strongly suggests that while fish iodothyronine deiodinase type 2 (D2) responds to iodothyronines in the same manner as its mammalian counterpart, fish deiodinase type 1 (D1) exhibits a distinct response. Furthermore, 3,5-T<sub>2</sub>, generally considered to be an inactive product of iodothyronine metabolism, has recently been described as bioactive, but its effects upon D1 and D2 are not yet known. We examined the effect that short-term immersion in T<sub>4</sub>, T<sub>3</sub>, and 3,5-T<sub>2</sub> (0.1 μM; 12 or 24 h) exerts on both D1 and D2 activities and on the levels of expression of D1 and D2 mRNAs in killifish liver. In agreement with previous reports in teleosts, no iodothyronine exerted a significant effect on D1 enzymatic activity. However, all three iodothyronines significantly decreased D2 activity. Furthermore, at 24 h post-immersion T<sub>4</sub>, T<sub>3</sub>, and 3,5-T<sub>2</sub> inhibited both D1 and D2 transcription. Together, the present results confirm the differential effect of iodothyronines upon the hepatic ORD pathway in fish and show that this effect can occur at a transcriptional level. Furthermore, we provide the first evidence that 3,5-T<sub>2</sub> can affect both activity and transcription of hepatic deiodinases in teleosts.

© 2003 Elsevier Inc. All rights reserved.

*Keywords:* Iodothyronine deiodinases; 3,5-T<sub>2</sub>; Thyroid hormone metabolism; *Fundulus heteroclitus*

### 1. Introduction

Iodothyronine deiodinases are the major determinants of intracellular 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-deiodinating pathway (ORD) by converting T<sub>4</sub> to T<sub>3</sub>. The inactivating inner ring-deiodinating (IRD) pathway is mainly catalyzed by the enzyme 5-deiodinase type 3 (D3), which converts T<sub>4</sub> and T<sub>3</sub> to inactive metabolites (reverse triiodothyronine [rT<sub>3</sub>] and 3,3'-diiodothyronine [T<sub>2</sub>], respectively). Deiodinases have differing catalytic properties, are expressed in a tissue- and development-specific fashion, and are tightly and differentially regu-

lated by thyroid hormones. Thus, in mammals, D1 activity and/or its mRNA are up-regulated by hyperthyroidism and down-regulated by hypothyroidism. In contrast, D2 transcription and/or activity exhibit the opposite changes in response to increased or decreased TH levels (for review see Bianco et al., 2002).

Fish thyroid physiology is distinct among vertebrates. Fish thyroid gland does not secrete T<sub>3</sub> 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, 2000, 2002b, 2003; Valverde-R et al., 1997), 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

\* Corresponding author. Fax: +52-442-238-10-38.

E-mail address: [aureao@servidor.unam.mx](mailto:aureao@servidor.unam.mx) (A. Orozco).



their co-expression in a sizable 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 thyroidal status in the same manner as its mammalian counterpart, fish D1 exhibits a different response. Chronic T<sub>3</sub> administration down-regulates hepatic D2 both in the rainbow trout (Finnson and Eales, 1999) and in tilapia (Mol et al., 1999) while D1 remains unmodified. Furthermore, long-term pharmacologically induced hypothyroidism increases both hepatic D1 and D2 activities and their corresponding mRNA levels in tilapia (Van der Geyten et al., 2001).

Recent studies indicate that 3,5-diiodothyronine (3,5-T<sub>2</sub>), generally considered a metabolite of iodothyronine metabolism, exhibits a rapid mitochondrial-mediated effect upon the oxidative capacity and respiration rate in mammals (Horst et al., 1989; Lanni et al., 1993; Moreno et al., 1997; O'Reilly and Murphy, 1992) and fish (Leary et al., 1996). 3,5-T<sub>2</sub> has also been implicated in other non-mitochondrial thyromimetic effects; for example, it inhibits TSH secretion and the expression of TR $\beta$ 2 receptors (Ball et al., 1997), and stimulates mRNA synthesis of GH (Moreno et al., 1998) and D1 activity (Baur et al., 1997). Nevertheless, the effect of this iodothyronine upon teleost deiodinases has not been analyzed.

The present study was designed to further understand the regulatory effect that thyroidal status exerts on the hepatic ORD pathway in fish. Specifically, we analyzed the effect of short-term exposure to T<sub>4</sub>, T<sub>3</sub>, and 3,5-T<sub>2</sub> (12 and 24 h) on both D1 and D2 activity and on the levels of expression of D1 and D2 mRNAs.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Animals

Male *Fundulus heteroclitus* (killifish) ranging from 4 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 seawater (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 and Sons) 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 ( $n = 2/\text{pool}$ ).

### 2.2. Determination of hepatic iodothyronines

Individual livers used for T<sub>4</sub> and T<sub>3</sub> 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;  $100 \pm 7$  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  $\mu$ l of assay buffer Tris–HCl (0.05 M; pH 8.6). 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 from the liver homogenates ranged from 70 to 90% for T<sub>3</sub> and 50 to 70% for T<sub>4</sub>.

### 2.3. Experimental design

To validate the method of hormonal administration by immersion, tanks were supplemented with 0.1  $\mu$ M of either T<sub>4</sub> or T<sub>3</sub> 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 h post-immersion. Iodothyronines were extracted from individual livers (see above) and hepatic T<sub>4</sub> and T<sub>3</sub> were measured by RIA. Two separate experiments were conducted. For each experiment, fish ( $n = 10$ –12) were placed into each of four tanks prepared with running SW and constant aeration. After 12 h of acclimation, the water supply was shut down and the water volume of each tank was adjusted to 5 L. The tanks were supplemented with 0.1  $\mu$ M T<sub>4</sub>, T<sub>3</sub>, or 3,5-T<sub>2</sub>, or an equivalent concentration of the NaOH vehicle. Half the fish in each experimental tank were sacrificed after 12 h of treatment and the remaining half after 24 h. Of each group, half the livers were individually prepared for deiodinase activity determination and the remaining livers were pooled in groups of 2–5 per experimental group for mRNA extraction. Four pools were prepared for each experimental group.

### 2.4. Radioimmunoassay of iodothyronines

Hepatic content of T<sub>4</sub> and T<sub>3</sub> 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% for T<sub>4</sub> and 9.5 and 6.6% for

T<sub>3</sub>. 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 for T<sub>4</sub>, 12.5–800 ng/dl; for T<sub>3</sub>, 6.25–1000 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<sub>4</sub>) or 25 (T<sub>3</sub>) µl of the experimental sample. A second antibody (anti-rabbit IgG; Sigma) was used to separate free from bound fractions.

### 2.5. 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 <sup>125</sup>I-T<sub>4</sub> or <sup>125</sup>I-rT<sub>3</sub> (sp. act. 1200 and 1174 µCi/µg, respectively; New England Nuclear), plus a concentration of the corresponding non-radioactive thyronine (Henning), and DTT (Calbiochem) 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). The released acid-soluble <sup>125</sup>I was isolated by chromatography on Dowex 50W-X2 columns (BioRad). Specific activity was calculated 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 <sup>125</sup>I-rT<sub>3</sub>, 200 nM rT<sub>3</sub>, and 5 mM DTT for D1 activity and 1 nM <sup>125</sup>I-T<sub>4</sub> and 25 mM DTT for D2 determination. The assays were incubated for 1 h at 37 °C. To detect possible interference from residual D1 activity, deiodinase activity was also measured in the presence of 100 nM T<sub>4</sub>, as described by Van der Geyten et al. (2001). Under these assay conditions, I<sup>-</sup> production was minimal (between 0 and 0.3%), indicating that the enzyme activity in the assay using 1 nM T<sub>4</sub> was true D2 activity. For D2 apparent K<sub>m</sub> and V<sub>max</sub> determinations, liver homogenates from each experimental group (n = 5) were independently used. The concentrations of non-labeled T<sub>4</sub> used were 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, and 10 nM. Protein content was measured by Bradford's method (BioRad).

### 2.6. Competitive PCR

A unique *Hind*III site was inserted by PCR-mediated site-directed mutagenesis into D1 and D2 cDNA fragments previously cloned from *F. heteroclitus* (Orozco et al., 2002b, 2003). The altered fragments were subcloned (pGEM-T, Promega), cut with *Hind*III (NEB), and dephosphorylated, and a 44 bp *Hind*III 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 fragment was then diluted in TE buffer to concentrations ranging from 1 × 10<sup>9</sup> to 1 × 10<sup>4</sup> 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 (D1: CAAACAGGTGAAAC TTGGCT; D2: TTCAGAGCTCATCTACTATCGT). 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. The oligonucleotides used were TGGGCTACAATCCACAAGAG (D1 sense), AAC CACATGTAGAGATAGCAG (D1 antisense), CAAA CAGGTGAAACTTGGCT (D2 sense), and TCG TCGATGTAGACCAGC (D2 antisense). A high annealing temperature was used to minimize non-specific amplification (40 s at 94°, 40 s at 65°, 30 s at 72° for 35 cycles). In all cases, Taq was combined with Taq antibody (Platinum, Invitrogen) to avoid the need for a hot start. Identical PCRs from the RNA samples prior to the reverse transcription reaction yielded no detectable products, indicating that the RNA was not contaminated with genomic DNA. 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.

### 2.7. Statistical analysis

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

## 3. Results

### 3.1. Validation of the competitive PCR method

To determine the accuracy of competitive PCR, we conducted control experiments in which 1 × 10<sup>7</sup> molecules of purified target D1 or D2 cDNA were combined

in a series of reactions with the corresponding competitor cDNA in amounts ranging from  $1 \times 10^5$  to  $1 \times 10^8$  molecules (Figs. 1A and B). 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  $1.07 \times 10^7$  D1 molecules and  $1.27 \times 10^7$  D2 molecules were obtained ( $n = 3$ ). Deviation of the measured values from  $1.0 \times 10^7$  occurs because shorter target molecules are amplified more efficiently. 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.

### 3.2. 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

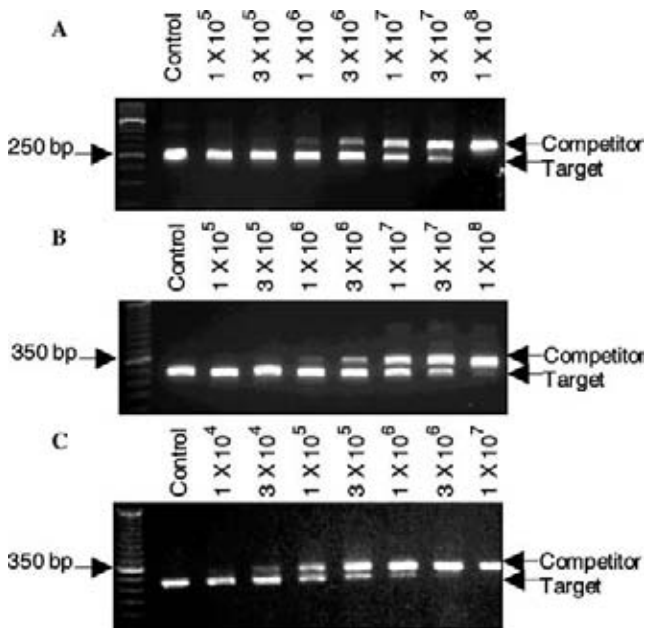


Fig. 1. Examples of competitive PCR. The upper figures show control experiments for (A) D1 and (B) D2 cDNA. As many as  $1 \times 10^7$  molecules of target cDNA from a purified plasmid were combined with the corresponding competitor in increasing amounts ranging from  $1 \times 10^5$  to  $1 \times 10^8$  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  $1.15 \times 10^5$  molecules/ $\mu\text{l}$ .

Table 1

Hepatic concentrations of  $T_4$  or  $T_3$  in killifish treated by immersion in  $0.1 \mu\text{M}$  of the corresponding iodothyronine

Experimental group	Hepatic $T_4$ (nM) ( $n = 4 \pm \text{SEM}$ )	Hepatic $T_3$ (nM) ( $n = 4 \pm \text{SEM}$ )
Control 12 h	$2.863 \pm 0.055$	$7.050 \pm 0.388$
Treated 12 h	$4.622 \pm 0.658^*$	$11.900 \pm 0.594^*$
Control 24 h	$2.601 \pm 0.210$	$4.293 \pm 0.319$
Treated 24 h	$4.305 \pm 0.113^*$	$24.470 \pm 2.657^{**}$

\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.001$ ; as compared to the corresponding control group.

( $p < 0.05$ ) 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.

### 3.3. 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 or 24 h of treatment. In contrast, D1 mRNA levels decreased markedly after exposure to each iodothyronine.  $T_4$  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.

### 3.4. 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  $V_{\text{max}}$  values decreased 50 and 70% ( $p < 0.05$ ) 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  $V_{\text{max}}$  values decreased 55% ( $p < 0.05$ ) and 80% ( $p < 0.001$ ) 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).

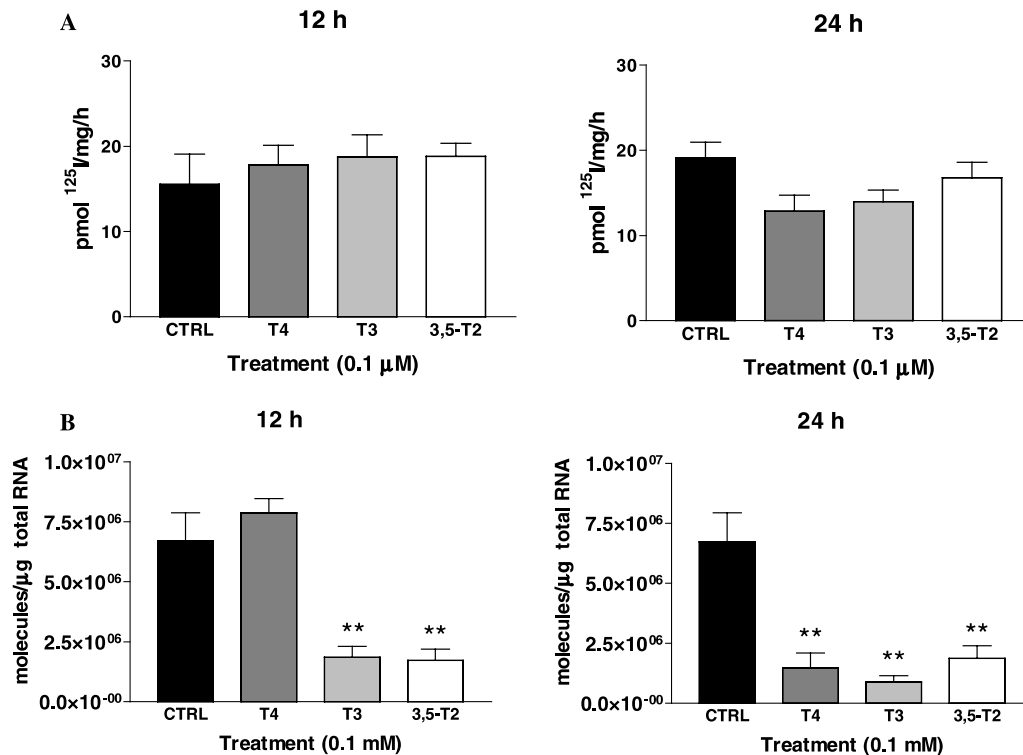


Fig. 2. Effect of short-term T<sub>4</sub>-, T<sub>3</sub>-, and 3,5-T<sub>2</sub>-induced hyperthyroidism on killifish hepatic D1 ORD (A) activity ( $n = 12 \pm \text{SEM}$ ) and (B) mRNA expression (pooled livers,  $n = 4$  pools/experimental group) after 12 or 24 h of exposure. For D1 activity determinations, assay conditions included 2 nM <sup>125</sup>I-rT<sub>3</sub>, 200 nM rT<sub>3</sub>, 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 <sup>125</sup>I/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  $1 \times 10^9$  to  $1 \times 10^4$  molecules/μl. For each pool, values were determined by densitometry of PCR fragments electrophoresed in a 3% agarose gel and averaged from three assays of pooled cDNA; the interassay coefficient of the method was 13.4%. Significance is indicated by \* ( $p < 0.05$ ) and \*\* ( $p < 0.01$ ).

In contrast to the other iodothyronines, the effects of 3,5-T<sub>2</sub> upon D2 activity were evident after 12 h of treatment. Hepatic D2 activity was significantly decreased ( $p < 0.05$ ) by 3,5-T<sub>2</sub> treatment after 12 h of immersion, a decrease that remained significant after 24 h. As for the other iodothyronines, apparent  $K_m$  values were similar and  $V_{\text{max}}$  values decreased 88% ( $p < 0.001$ ) and 37% at 12 and 24 h, respectively (Table 2). Concomitantly, hepatic D2 mRNA was significantly ( $p < 0.01$ ) suppressed after 12 h of treatment and reached a 7-fold decrease after 24 h (Fig. 3B).

#### 4. Discussion

It is well established that immersion of aquatic vertebrates in water containing dissolved hydrophobic hormones, e.g., TH, provides an efficient, non-invasive, and minimally stressful means of chronically administering these hormones (Eales, 1974; Etkin, 1935; Omeljaniuk and Eales, 1985; Yamamoto et al., 1966). Although we were unable to measure intra-hepatic 3,5-T<sub>2</sub>, in the present work we have shown that intra-hepatic T<sub>4</sub> and T<sub>3</sub> concentrations are significantly raised

after 12 or 24 h of immersion in each hormone. Despite the fact that both iodothyronines were administered at similar doses, T<sub>3</sub> hepatic concentration reached higher levels at 24 h post-immersion. This finding is consonant with previous work in which a steady state between ambient and plasma hormone levels in the rainbow trout develops more slowly for T<sub>3</sub> than for T<sub>4</sub>, due in part to a different effectiveness of hormone uptake (Eales and Collicut, 1974; Omeljaniuk and Eales, 1985). Other studies in *F. heteroclitus* treated by immersion with T<sub>3</sub> or T<sub>4</sub> at doses similar to those used in the present work showed a dose-dependent significant increase in serum T<sub>4</sub> levels, but still within the physiological range of this species (Grau and Stetson, 1977). We do not know the efficacy of gut absorption of the different iodothyronines administered here, but studies in mammals have shown a greater absorption efficacy of T<sub>3</sub> than T<sub>4</sub> (95 vs 50–80%, respectively). Further studies would need to be conducted in order to elucidate this matter.

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,

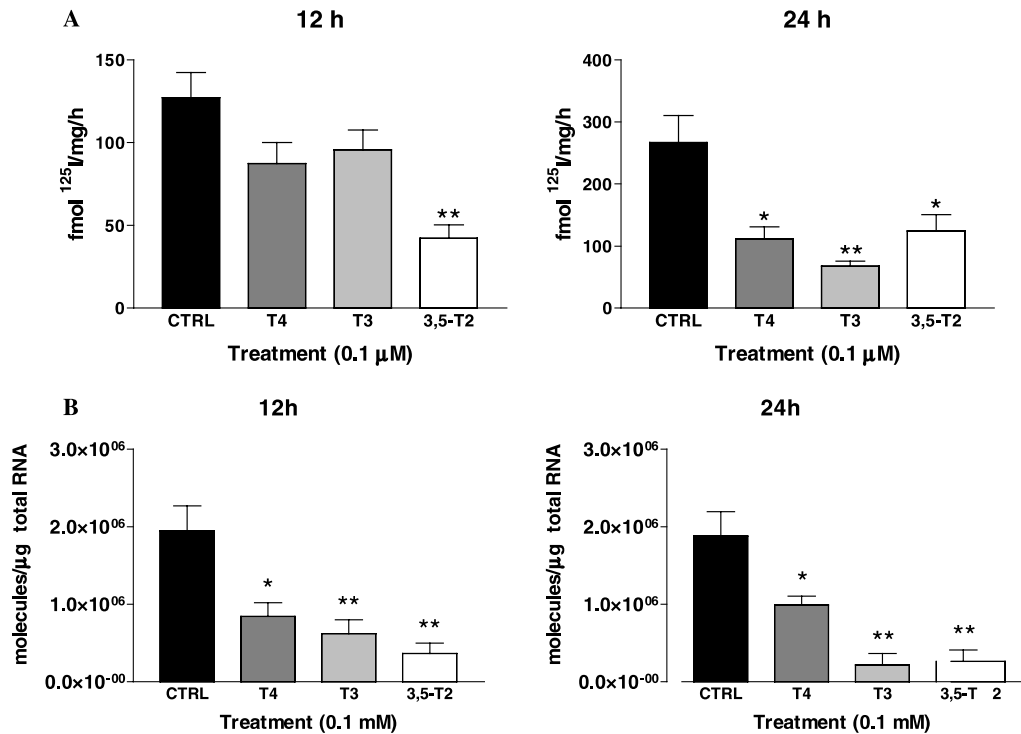


Fig. 3. Effect of short-term T<sub>4</sub>-, T<sub>3</sub>-, and 3,5-T<sub>2</sub>-induced hyperthyroidism on killifish liver D2 (A) activity ( $n = 5 \pm \text{SEM}$ ) and (B) mRNA expression (pooled livers,  $n = 4$  pools/experimental group) at 12 and 24 h post-exposure. For D2 activity determinations, assay conditions included 1 nM <sup>125</sup>I-T<sub>4</sub> and 25 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 fmol <sup>125</sup>I/mg/h. For D2 mRNA quantitation, PCR conditions included cDNA reverse transcribed from 10 μg of total RNA, and a D2 competitor in concentrations ranging from  $1 \times 10^9$  to  $1 \times 10^4$  molecules/μl. For each pool, values were averaged from three assays of pooled cDNA; the in-rassay coefficient of the method was 12.5%. Significance is indicated by \* ( $p < 0.05$ ) and \*\* ( $p < 0.01$ ).

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

Experimental group	$V_{\max}$ (fmol <sup>125</sup> I/mg/h $\pm$ SE)		$K_m$ (nM $\pm$ SE)	
	12 h	24 h	12 h	24 h
Control	1340 $\pm$ 260	1340 $\pm$ 260	2.0 $\pm$ 0.37	2.4 $\pm$ 0.47
T <sub>4</sub>	660 $\pm$ 90	440 $\pm$ 85*	2.8 $\pm$ 0.37	2.3 $\pm$ 0.44
T <sub>3</sub>	600 $\pm$ 70	245 $\pm$ 140**	2.3 $\pm$ 0.28	2.3 $\pm$ 0.37
3,5-T <sub>2</sub>	160 $\pm$ 70**	850 $\pm$ 110	2.8 $\pm$ 0.23	2.2 $\pm$ 0.16

\*  $p < 0.05$ .

\*\*  $p < 0.01$ .

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 T<sub>4</sub>, T<sub>3</sub>, or 3,5-T<sub>2</sub> do not affect 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 (Finsson and Eales, 1999), who have reported that T<sub>4</sub> and T<sub>3</sub> do not acutely up-regulate hepatic D1 activity in the rainbow trout. Furthermore, neither hypothyroidism nor hyperthyroidism alters 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 results complement

those previously described for tilapia liver in which both D1 activity and mRNA were up-regulated during long-term hypothyroidism (Van der Geysen et al., 2001). Both findings are contrary to the regulatory pattern described for mammals, however. One feasible interpretation of our results 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 D1 transcription. In support of this interpretation is the observation of negligible IRD deiodination of T<sub>3</sub> and T<sub>3</sub>S 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 half-life of D1 (St. Germain and Croteau, 1989) may account in part

for this discrepancy. Nevertheless, no effect has been found on hepatic (Finsson et al., 1999; Plohman et al., 2002) or renal (Mol et al., 1999) D1 activity in  $T_4$ - or  $T_3$ -treated fish after up to 15 days of treatment. Together, these results suggest that transcription of the killifish D1 gene displays a distinct response to substrate, being down-regulated during acute hyperthyroidism.

D2 mRNA levels and enzymatic activity were similarly reduced in these experiments. In agreement with the well-described down-regulatory effect of  $T_4$  and  $T_3$  on D2 in mammalian species (Bianco et al., 2002), killifish hepatic D2 activity was more acutely regulated than D1 after immersion in  $T_4$ ,  $T_3$ , or 3,5- $T_2$ , exhibiting a significant 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  $T_4$  ORD has been reported after administration of  $T_3$ -supplemented food as well as after fasting in the rainbow trout (Finsson et al., 1999). Furthermore,  $T_4$ -induced hyperthyroidism also significantly lowers hepatic D2 in tilapia liver, while  $T_3$ -induced hyperthyroidism abolishes it (Mol et al., 1999). It is important to note that these 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 post-translational levels in mammals (Bianco et al., 2002). Indeed, the present results indicate that  $T_3$ - and  $T_4$ -induced down-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  $T_4$ - and  $T_3$ -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). The molecular mechanisms that could explain the pre-translational D2 regulation by substrate have not been elucidated in mammalian (Bartha et al., 2000; Bianco et al., 2002) or teleostean species (Orozco et al., 2002b). 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 effects exhibited by 3,5- $T_2$  on D1 mRNA and D2 activity and mRNA. In addition to its well-established calorogenic mitochondrial actions (Goglia et al., 1999), 3,5- $T_2$  has been reported to have other non-mitochondrial thyromimetic effects. These effects can be either inhibitory (i.e., TSH secretion (Moreno et al., 1998);  $TR\beta_2$  receptor expression (Ball et al., 1997)) or stimulatory (i.e., GH mRNA synthesis (Moreno et al., 1998); D1 activity (Baur et al., 1997)). In the present study we observed a rapid and significant decrease in both D2 activity and D1 and D2 mRNA concentration. This apparent efficacy of 3,5- $T_2$  is not necessarily related to a higher potency of the iodothyronine, but could also be due in part to: (1) its more rapid absorption; (2) a difference in its affinity to plasma proteins; or (3) a different metabolism and clearance rate. To our understanding, little is known about the kinetics of 3,5- $T_2$  in vertebrates; nevertheless, the fact that this iodothyronine exerts a clear inhibitory effect on D1 and D2 suggests that this iodothyronine could play a physiological role in teleostean thyroidal systems. Although there has been no demonstration of conversion of  $T_3$  to 3,5- $T_2$  in teleosts *in vitro* (Orozco, unpublished observations; Sweeting and Eales, 1992) or *in vivo*, recent experimental evidence suggests that this conversion can occur in mammalian species (Moreno et al., 2002). The observed effects of 3,5- $T_2$  on hepatic D1 and D2 could be the consequence of an interaction of 3,5- $T_2$  with TH nuclear receptors. A very low binding of 3,5- $T_2$  to salmon hepatic nuclei (Bres and Eales, 1986; Darling et al., 1982) and of  $T_2S$  to mammalian liver and heart nuclei (Leeson et al., 1988) has been reported. The latency of the response is considered to be one of the features that differentiate the nuclear from the extra-nuclear actions of iodothyronines (Goglia et al., 1999). Thus, the rapid response elicited by 3,5- $T_2$  could suggest non-genomic effects. Further work is required to understand the mechanism of action of 3,5- $T_2$ .

Interestingly, D2 activity/mRNA ratios showed marked changes, increasing in the treated groups as compared to the corresponding controls. This variation is most evident in the 3,5- $T_2$  treated group after 24 h: thus, while transcription remained low, enzymatic activity and  $V_{max}$  increased, yielding a ratio 3-fold higher than the corresponding control. It is tempting to speculate that 3,5- $T_2$  might be acting through a mechanism different than that of  $T_4$  and  $T_3$ . This is something that deserves further attention and requires experiments beyond the scope of this paper.

In summary, the present study (1) confirms the differential effect of iodothyronines upon the activity of liver iodothyronine deiodinases that catalyze the ORD pathway in fish; (2) demonstrates the effects of iodothyronines upon deiodinase transcription in fish; and (3) provides the first evidence of the effects of 3,5- $T_2$  upon

both activity and transcription of the enzymes that catalyze the ORD pathway in teleosts.

## Acknowledgments

We gratefully acknowledge Patricia Villalobos for her technical assistance. This work was partially supported by Grants CONACYT 34311-N, PAPIIT IN201202 and IN221702.

## References

- Ball, S.G., Sokolov, J., Chin, W.W., 1997. 3,5-diiodo-L-thyronine (T<sub>2</sub>) 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* 141, 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. *Endocr. Rev.* 23, 38–89.
- Bres, O., Eales, J.G., 1986. Thyroid hormone binding to isolated trout (*Salmo gairdneri*) liver nuclei in vitro: binding affinity, capacity and chemical specificity. *Gen. Comp. Endocrinol.* 61, 29–39.
- Darling, D.S., Dickhoff, W.W., Gorbman, A., 1982. Comparison of thyroid hormone binding to hepatic nuclei of the rat and a teleost (*Oncorhynchus kisutch*). *Endocrinology* 111, 1936–1943.
- 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.
- Eales, J.G., Collicutt, J.M., 1974. Uptake of ambient radioactive L-thyroxine and 3,5,3'-triiodo-L-thyronine by rainbow trout, *Salmo gairdneri* (Richardson). *Gen. Comp. Endocrinol.* 24, 347–351.
- Etkin, W., 1935. The mechanism of anuran metamorphosis pattern. *J. Exp. Zool.* 71, 217–240.
- Finsson, K.W., Eales, J.G., 1999. Effect of T<sub>3</sub> treatment and food ration on hepatic deiodination and conjugation of thyroid hormones in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 115, 379–386.
- Goglia, F., Moreno, M., Lanni, A., 1999. Action of hormones at the cellular level: the mitochondria target. *FEBS Lett.* 452, 115–120.
- Grau, E.G., Stetson, M.H., 1977. Pituitary autotransplants in *Fundulus heteroclitus*: effect on thyroid function. *Gen. Comp. Endocrinol.* 32, 427–431.
- 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.
- 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 Sci.* 62, 2369–2377.
- Moreno, M., Lombardi, A., Beneduce, L., Silvestri, E., Pinna, G., Goglia, F., Lanni, A., 2002. Are the effects of T<sub>3</sub> on resting metabolic rate in euthyroid rats entirely caused by T<sub>3</sub> itself? *Endocrinology* 143, 504–510.
- 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 (T<sub>3</sub>): effects on plasma T<sub>3</sub> levels and hepatic nuclear binding. *Gen. Comp. Endocrinol.* 58, 81–88.
- Orozco, A., Ruiz-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. *Bol. Estud. Med. Biol.* 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., Linsler, 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. B* 126, 283–290.
- Orozco, A., Villalobos, P., Valverde-R, C., 2002a. Environmental salinity selectively modifies the outer-ring deiodinating activity of liver and kidney in the rainbow trout. *Comp. Biochem. Physiol. A* 131, 387–395.
- Orozco, A., Jeziorski, M.C., Linsler, P.J., Greenberg, R.M., Valverde-R, C., 2002b. 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., 2003. The liver of *Fundulus heteroclitus* expresses deiodinase type I mRNA. *Gen. Comp. Endocrinol.* 130 (1), 84–91.
- 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. E* 260, 175–182.
- Pinna, G., Brödel, O., Visser, T., Jeitner, A., Grau, H., Eravci, M., Meinhold, H., Baumgartner, A., 2002. Concentrations of seven iodothyronine metabolites in brain regions and the liver of the adult rat. *Endocrinology* 143, 1789–1800.
- Plohman, J.C., Dick, T.A., Eales, J.G., 2002. Thyroid of lake sturgeon, *Acipenser fluwescens* II. Deiodination properties, distribution, and effects of diet, growth, and a T<sub>3</sub> challenge. *Gen. Comp. Endocrinol.* 125, 56–66.
- Sanders, J.P., Van der Geyten, S., Kaptein, E., Darras, V.M., Kühn, E.R., Leonard, J.L., Visser, T.J., 1997. Characterization of a

- propylthiouracil-insensitive type I iodothyronine deiodinase. *Endocrinology* 138, 5153–5160.
- Sweeting, R.M., Eales, J.G., 1992. HPLC Analysis of in vitro hepatic deiodination products of thyroid hormones in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 85, 367–375.
- St. Germain, D.L., Croteau, W., 1989. Ligand-induced inactivation of type I iodothyronine 5'-deiodinase: protection by propylthiouracil in vivo and reversibly in vitro. *Endocrinology* 125, 2735–2744.
- Valverde-R, C., Croteau, W., LaFleur Jr., G.J., 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.



**C. García-G, L. López-Bojorquez, J. Nuñez, C. Valverde-R and A. Orozco**  
*Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 293:877-883, 2007. First published May 23, 2007;  
doi:10.1152/ajpregu.00101.2007

**You might find this additional information useful...**

---

This article cites 33 articles, 10 of which you can access free at:

<http://ajpregu.physiology.org/cgi/content/full/293/2/R877#BIBL>

Updated information and services including high-resolution figures, can be found at:

<http://ajpregu.physiology.org/cgi/content/full/293/2/R877>

Additional material and information about *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* can be found at:

<http://www.the-aps.org/publications/ajpregu>

---

This information is current as of November 25, 2008 .

## 3,5-Diiodothyronine in vivo maintains euthyroidal expression of type 2 iodothyronine deiodinase, growth hormone, and thyroid hormone receptor $\beta 1$ in the killifish

C. García-G,<sup>1</sup> L. López-Bojorquez,<sup>1</sup> J. Nuñez,<sup>2</sup> C. Valverde-R,<sup>1</sup> and A. Orozco<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Neurobiología, Departamento de Neurobiología Celular y Molecular, Universidad Nacional Autónoma de México, Querétaro, Mexico; and <sup>2</sup>The Whitney Laboratory, University of Florida, St. Augustine, Florida

Submitted 12 February 2007; accepted in final form 16 May 2007

**García-G C, López-Bojorquez L, Nuñez J, Valverde-R C, Orozco A.** 3,5-Diiodothyronine in vivo maintains euthyroidal expression of type 2 iodothyronine deiodinase, growth hormone, and thyroid hormone receptor  $\beta 1$  in the killifish. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 293: R877–R883, 2007. First published May 23, 2007; doi:10.1152/ajpregu.00101.2007.—Until recently, 3,5-diiodothyronine (3,5-T<sub>2</sub>) has been considered an inactive by-product of triiodothyronine (T<sub>3</sub>) deiodination. However, studies from several laboratories have shown that 3,5-T<sub>2</sub> has specific, nongenomic effects on mitochondrial oxidative capacity and respiration rate that are distinct from those due to T<sub>3</sub>. Nevertheless, little is known about the putative genomic effects of 3,5-T<sub>2</sub>. We have previously shown that hyperthyroidism induced by supraphysiological doses of 3,5-T<sub>2</sub> inhibits hepatic iodothyronine deiodinase type 2 (D2) activity and lowers mRNA levels in the killifish in the same manner as T<sub>3</sub> and T<sub>4</sub>, suggesting a pretranslational effect of 3,5-T<sub>2</sub> (García-G C, Jeziorski MC, Valverde-R C, Orozco A. *Gen Comp Endocrinol* 135: 201–209, 2004). The question remains as to whether 3,5-T<sub>2</sub> would have effects under conditions similar to those that are physiological for T<sub>3</sub>. To this end, intact killifish were rendered hypothyroid by administering methimazole. Groups of hypothyroid animals simultaneously received 30 nM of either T<sub>3</sub>, reverse T<sub>3</sub>, or 3,5-T<sub>2</sub>. Under these conditions, we expected that, if it were bioactive, 3,5-T<sub>2</sub> would mimic T<sub>3</sub> and thus reverse the compensatory upregulation of D2 and thyroid receptor  $\beta 1$  and downregulation of growth hormone that characterize hypothyroidism. Our results demonstrate that 3,5-T<sub>2</sub> is indeed bioactive, reversing both hepatic D2 and growth hormone responses during a hypothyroidal state. Furthermore, we observed that 3,5-T<sub>2</sub> and T<sub>3</sub> recruit two distinct populations of transcription factors to typical palindromic and DR4 thyroid hormone response elements. Taken together, these results add further evidence to support the notion that 3,5-T<sub>2</sub> is a bioactive iodothyronine.

deiodinase type 2; thyroid hormone receptor  $\beta 1$ ; thyroid hormone response element; killifish

IODOTHYRONINES OR THYROID hormones (TH) are essential in regulating energy expenditure and development. Triiodothyronine (T<sub>3</sub>) is the bioactive TH, which modulates gene expression in virtually every vertebrate tissue through ligand-dependent transcription factors, the TH receptors (TR). Sequential deiodination of thyroxine (T<sub>4</sub>) generates T<sub>3</sub> as well as other iodothyronines that have been considered inactive by-products, but, recently, interest has grown in identifying bioactive iodothyronines in addition to T<sub>4</sub> and T<sub>3</sub>. Studies from several laboratories have suggested that 3,5-diiodothyronine (3,5-T<sub>2</sub>),

a putative product of the deiodination pathway involved in T<sub>3</sub> metabolism, could be a peripheral mediator of some effects of TH on mitochondrial oxidative capacity and respiration rate. To date, results in mammals suggest that 3,5-T<sub>2</sub> has specific actions on oxygen consumption that are distinct from those of T<sub>3</sub>; they are not attenuated by inhibition of protein synthesis and are more rapid than those due to T<sub>3</sub> (for review, see Ref. 12). Genomic effects of 3,5-T<sub>2</sub> have been analyzed in only a few classic iodothyronine-dependent genes, such as thyroid stimulating hormone (TSH), thyroid receptor  $\beta 2$  (TR $\beta 2$ ), iodothyronine deiodinase type 1 (D1), and growth hormone (GH) (2, 3, 24). While 3,5-T<sub>2</sub> inhibits TSH and TR $\beta 2$  expression in vivo and in vitro, respectively (2, 24), it stimulates expression of D1 and GH under both experimental conditions (2, 3, 24). Interestingly, the potency of 3,5-T<sub>2</sub> with respect to these target genes seems to depend on the status of the deiodination pathways, as well as on the experimental model. Thus 3,5-T<sub>2</sub> is equipotent to T<sub>3</sub> in hypothyroid animals in which the deiodinating enzymes are inhibited. On the other hand, in euthyroid animals or in cell cultures, 3,5-T<sub>2</sub> is less potent than T<sub>3</sub> (see Ref. 12 for review).

One prevailing question is how 3,5-T<sub>2</sub> is formed in the target cell. Although conversion of T<sub>3</sub> to 3,5-T<sub>2</sub> has not been demonstrated in mammals (21) or in teleosts in vitro (A. Orozco, unpublished observations; Ref. 31), indirect but robust evidence indicates that 3,5-T<sub>2</sub> is indeed formed from T<sub>3</sub> in vivo through deiodination (23). It is not yet known which deiodinase catalyzes the conversion of T<sub>3</sub> to 3,5-T<sub>2</sub>, either in vivo or in vitro, but a likely candidate is iodothyronine deiodinase type 2 (D2). D2 catalyzes the removal of outer-ring iodine from T<sub>4</sub> to generate the bioactive hormone T<sub>3</sub> and thus determines T<sub>3</sub> availability at the cellular level. Conversion of T<sub>3</sub> to 3,5-T<sub>2</sub> would require similar outer-ring deiodination.

Our laboratory has previously studied whether 3,5-T<sub>2</sub> has a regulatory effect upon D2 in *Fundulus heteroclitus* (killifish). In this species, hepatic D2 expression is very abundant, among the highest in vertebrates so far examined (26, 28). The D2 gene is tightly downregulated by bioactive TH (for review: Refs. 4, 5). We have found that hyperthyroidism induced by a short-term immersion (up to 24 h) of killifish in seawater (SW) supplemented with 3,5-T<sub>2</sub> significantly decreased both mRNA expression and hepatic activity of D2, mimicking the effects of T<sub>4</sub> or T<sub>3</sub> (10). Because these effects were obtained with supraphysiological doses of the three iodothyronines, in this

Address for reprint requests and other correspondence: A. Orozco, Instituto de Neurobiología, UNAM, Campus UNAM-UAQ, Juriquilla, Querétaro, Qro 76230, México (e-mail: aureao@servidor.unam.mx).

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. The article must therefore be hereby marked “advertisement” in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

work, we asked whether 3,5-T<sub>2</sub>, when administered in doses similar to those known to be physiological for T<sub>3</sub>, could reestablish the euthyroidal activity and hepatic expression of D2 in hypothyroid killifish. We also examined the effects of 3,5-T<sub>2</sub> upon the hepatic expression of GH, which is upregulated in the pituitary by hyperthyroid status (1, 11, 32). Finally, as a first approach to study the action mechanism of 3,5-T<sub>2</sub> in the killifish, we analyzed the hepatic expression of the TRβ1 and the TH response element (TRE)-transcription factor complexes formed in response to treatment with 3,5-T<sub>2</sub> or T<sub>3</sub>.

## MATERIALS AND METHODS

**Animals.** SW-adapted male *Fundulus heteroclitus*, ranging from 4 to 6 g, were collected from the estuarine creeks of the Matanzas River (St. Augustine, FL). After capture, fish were kept in tanks with running SW piped directly from the ocean at a temperature of ~28°C. Animals were deparasitized after capture, fed ad libitum 24 h later (Silver Cup, Nelson and Sons), and maintained on a light-dark cycle of 14:10 h. Collection of the tissues for the different experiments was performed as follows: fish were decapitated, and the liver was rapidly removed. Each liver was divided in half to determine both deiodinase activity and mRNA levels. Segments used to measure deiodinase activity were homogenized in 10 volumes of ice-cold homogenization buffer [10 mM HEPES (Sigma), 0.25 M sucrose (Sigma), 10 mM EDTA (Sigma), pH 7]. Aliquots were quick-frozen in liquid nitrogen and stored at -70°C until assayed. To quantify mRNA, segments were pooled ( $n = 2-3$ /pool) for RNA extraction. All animal experimentation was conducted in accord with accepted standards of humane animal care, and procedures regarding handling and euthanasia of animals were reviewed and approved by the Animal Welfare Committee of our Institute.

**Experimental design.** Our laboratory (10) and others (9, 25) have established that the administration of hydrophobic drugs by immersion provides an efficient, noninvasive, and minimally stressful means of chronically administering these compounds in aquatic vertebrates. We used this method to deliver all treatments in the present work. The dose-response curves for T<sub>3</sub> and 3,5-T<sub>2</sub> were performed by supplementing the environmental SW with 10, 30, 100, and 300 nM of either iodothyronine (Sigma) for 24 h (vehicle: 0.01 N NaOH) or vehicle only. For time-response curves, a final concentration of 100 nM of either T<sub>3</sub> or 3,5-T<sub>2</sub> was administered by immersion for 3, 6, 12, 18, and 24 h ( $n = 6$ ). Fish were killed after the treatment, the liver was dissected, and D2 activity was determined.

Since the aim of the present study was to analyze the effects of 3,5-T<sub>2</sub> and to compare them to those exerted by physiological doses of T<sub>3</sub>, we treated the different experimental groups with methimazole (MMI; Sigma), an inhibitor of TH synthesis, at a final concentration of 4.5 mM, with or without simultaneous addition of T<sub>3</sub>, reverse T<sub>3</sub> (rT<sub>3</sub>), or 3,5-T<sub>2</sub> (Sigma) at a final concentration of 30 nM (vehicle: 0.01 N NaOH). Based on the dose-response curve results from euthyroid animals (see above), we simultaneously added different doses (10, 30, and 100 nM) of either T<sub>3</sub> or 3,5-T<sub>2</sub> to the MMI-treated fish. We found that 30 nM of exogenous T<sub>3</sub> merely restored intrahepatic concentrations of this hormone, whereas higher doses elevated intrahepatic T<sub>3</sub> above control levels (data not shown). Based on these results, we defined 30 nM as the effective immersion dose at which intrahepatic euthyroidism is attained. For each experiment, fish ( $n = 18$ /experimental group) were placed into tanks with running SW and constant aeration. After 12 h of acclimation, the water flow was shut off, and the water volume of each tank was adjusted to 6 liters. Control groups were handled in the same manner as the experimental groups. Fish were killed after 5 days of treatment. Six livers from control, MMI, MMI + T<sub>3</sub>, and MMI + 3,5-T<sub>2</sub> groups were individually prepared for iodothyronine extraction and measurement of T<sub>3</sub>

(RIA). All of the experimental treatments were performed at least twice in independent groups.

**RIA of iodothyronines.** To determine intrahepatic T<sub>3</sub> levels, individual livers were homogenized, and iodothyronines were extracted as previously described (10). Livers (average wet weight 100 ± 7 mg) were homogenized in 10 volumes of methanol-ammonium hydroxide (99:1) solution. The homogenates were centrifuged for 10 min at 700 g. The supernatants were collected, evaporated in a speed vacuum, and suspended 1:5 (initial weight/volume) in assay buffer Tris-HCl (0.05 M; pH 8.6). Hepatic content of T<sub>3</sub> was measured by RIA as previously described (27). The inter- and intra-assay coefficients of variation were 9.5 and 6.6%, respectively. The incubation mixture contained assay buffer and a working dilution (1:8,000) of anti-T<sub>3</sub> serum (Sigma), standard (standard curve, 7.8–1,000 pg/dl), the radioactive solution (10 pg/100 μl of the labeled T<sub>3</sub> plus 10 mg/10 ml of 8-anilino-1-naphthalene sulfonic acid, Sigma), and 50 μl of the experimental sample. Free and antibody-bound radioactive T<sub>3</sub> were separated using 0.5% activated charcoal/dextran suspension (Sigma).

**Deiodination assay.** Enzyme activities were measured in duplicate as previously described (26). The total volume of the reaction mixture was 100 μl and contained 1 nM <sup>125</sup>I-T<sub>4</sub> (sp. act. 1,200 μCi/μg; New England Nuclear) plus 25 mM DTT (Calbiochem) and liver homogenate at a protein concentration of ~100 μg. Assays were incubated for 1 h at 37°C. The released, acid-soluble <sup>125</sup>I was isolated by chromatography on Dowex 50W-X2 columns (BioRad). Specific activity was calculated as previously described (29) and expressed as femtomoles of <sup>125</sup>iodide per hour per milligram. Protein content was measured by the Bradford method (BioRad).

**Measurement of D2 mRNA.** RNA was isolated from treated or control livers using TRIzol (Invitrogen), and cDNA was reverse transcribed (Superscript, Invitrogen) from 10 μg RNA using a gene-specific primer (5' TTC AGA GCT CAT CTA CTA TCG T 3'). The concentration of D2 mRNA was measured in duplicate by competitive PCR, as previously described (10). The standard curve ranged from 10<sup>4</sup> to 10<sup>9</sup> molecules/μl. Oligonucleotides used (sense: 5' CAA ACA GGT GAA ACT TGG CT 3' and antisense: 5' TCG TCG ATG TAG ACC AGC 3') amplified a product of 270 bp (40 s at 94°, 40 s at 65°, 30 s at 72° for 35 cycles). Identical PCRs from the RNA samples before the reverse transcription reaction yielded no detectable products, indicating that the RNA was not contaminated with genomic DNA. Results are expressed as molecules per microgram of total mRNA used in the reverse transcription.

**Measurement of GH mRNA.** Total RNA was extracted from male killifish brains (including the pituitary) with TRIzol and used as a template for reverse transcription of cDNA using an oligo-dT-polylinker primer. A degenerate primer (5' TGY TTY AAR AAR GAY ATG CAY AAR 3') that contained a sequence conserved in 35 teleost GH cDNAs reported in GeneBank (CFKKDMHKV) was used with an oligo-dT-polylinker primer to generate a first fragment, which included the stop codon of the killifish GH cDNA. The 5' end of the cDNA was amplified using rapid amplification of cDNA ends. A cDNA was reversed transcribed using a specific antisense primer. This cDNA was purified and tailed with dCTP using terminal transferase, and an oligo-dG-polylinker primer was used in combination with exact primers in a series of nested amplifications to generate the 5' end. The open reading frame of the GH cDNA clone obtained had 64% identity to the other 35 teleost GH genes reported in GeneBank. This sequence was inserted into a vector (pGEM-T, Promega) and used to construct a standard curve. Primers specific for this sequence were designed for real-time PCR (see below).

Reverse transcription (Superscript) from 10 μg of total hepatic RNA was performed using an oligo(dT) primer (final volume of 20 μl). Real-time PCR was carried out in duplicate using β-actin as internal standard in reactions that contained 1 μl aliquots of the reverse transcription reaction described above, corresponding to 0.5 μg total RNA, 7.5 μl of TAQurate GREEN Real-Time PCR Master-Mix (EPICENTRE), and 500 nM forward and reverse primers in a

final volume of 15  $\mu$ l. A 233-bp fragment from killifish  $\beta$ -actin (accession number: CN985078) was cloned with oligonucleotides 5' GCG ACA TCA AGG AGA AGC T 3' (sense) and 5' CGA CGT CGC ACT TCA TGAT 3' (antisense) and used to construct a standard curve ( $10^3$ – $10^8$  molecules/ $\mu$ l). This same combination of primers was used to measure  $\beta$ -actin in the experimental samples (3 s at 94°C, 8 s at 61°C, 9 s at 72°C for 45 cycles). For GH cDNA, the standard curve ranged from  $10^1$  to  $10^6$  molecules/ $\mu$ l. The oligonucleotides used were 5' GAT CTC CCC CAA ACT GTC A 3' (sense) and 5' GAC TCA TCA GCT TCC AGA CT 3' (antisense). These primers generated a product of 146 bp (3 s at 94°C, 5 s at 55°C, 7 s at 72°C for 45 cycles). Detection and data analyses were carried out on a Light Cycler instrument, according to the manufacturer's instructions (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany). Fluorescence analysis was performed after each cycle, and the PCR products generated were analyzed with a melting curve to verify the specificity of the amplified products. The mRNA concentration (molecules/ $\mu$ l), obtained by comparison with the standard curve, was normalized to the concentration of  $\beta$ -actin in each experimental sample. As indicated for D2 expression, identical PCRs from the RNA samples before the reverse transcription reaction yielded no detectable products. Results are expressed as molecules/ $\mu$ g of total mRNA used in the reverse transcription.

**Measurement of Na-K-ATPase  $\alpha_1$ -mRNA.** Reverse transcription and real-time PCRs were conducted as described above. Based on the reported sequence for the killifish  $\alpha_1$ -subunit of the Na-K-ATPase cDNA (accession number AY057072; Ref. 30), a fragment containing the open-reading frame was amplified (sense: 5' GGG AAG TTT TGA AAA AGA AAA TTG 3' and antisense: 5' GCC TTG CAA CAC GAT GGT G 3' primers), subcloned (pGEM-T, Promega), and used to construct a standard curve ( $10^3$ – $10^8$  molecules/ $\mu$ l). A product of 256 bp was amplified with sense (5' GGA ACT GCC AGA GGA ATT G 3') and antisense (5' GGA GAC CTT CTG GCA CAT TA 3') primers (3 s at 94°C, 6 s at 64°C, 10 s at 72°C for 45 cycles). Identical PCRs from the RNA samples before the reverse transcription reaction yielded no detectable products.

**Measurement of TRβ1 mRNA.** Total RNA was extracted from male killifish livers (TRIzol, Invitrogen) and used as a template for reverse transcription of cDNA using an oligo-dT-polylinker primer. A pair of degenerate primers (sense: 5' TGA GTG CAG IGG GGG TGA AG 3' and antisense: 5' GAC ATG ATC TCC ATR CAR CA 3') that contained highly conserved TRβ1 cDNA sequences previously reported in several teleosts (22) was used to clone a 230-bp fragment that had 84% identity to the other teleost TRβ1 genes reported. This fragment was inserted into a vector (pGEM-T, Promega) and used to construct a standard curve ( $10^3$ – $10^8$  molecules/ $\mu$ l). Primers specific for this sequence were designed for real-time PCR.

Reverse transcription and real-time PCRs were conducted as described above. A product of 180 bp was amplified with sense (5' TGA GTG CAG GGG GGG GTG AAG 3') and antisense (5' GCA GCT CAC AGA ACA TGG GC 3') primers (3 s at 94°C, 5 s at 65°C, 8 s at 72°C for 45 cycles). Identical PCRs from the RNA samples before the reverse transcription reaction yielded no detectable products.

**Nuclear extracts.** Nuclear proteins were obtained as previously described (20). In brief, untreated fish (control) or fish treated with MMI only or MMI plus either T<sub>3</sub> or 3,5-T<sub>2</sub> (30 nM) for 5 days were killed, and the livers were resuspended 1:10 (wt/vol) in a hypotonic buffer (10 mM HEPES, pH 7.9, 10 mM KCl, 1 mM EDTA, 5 mM DTT). After mechanical disruption, the tissues were incubated at 4°C for 30 min, and the supernatants were collected. The quality of the nuclei was evaluated with a Trypan blue stain (1:1). Nuclei were centrifuged at 800 g for 10 min. The pellet was resuspended in hypertonic buffer (50 mM Tris·HCl, pH 7.5, 400 mM KCl, 400 mM NaCl, 10% glycerol, 1 mM EDTA, 5 mM DTT, 0.5 mM PMSF) and agitated at 4°C for 30 min. After centrifugation at 16,000 g for 25 min, the supernatant was diluted in an equal volume of dilution buffer (20 mM HEPES, pH 7.9, 50 mM KCl, 20% glycerol, 0.2 mM EDTA, 0.5

mM PMSF, 1 mM DTT) for protein quantification by the Bradford method.

**Electrophoretic mobility shift assay.** Nuclear protein extracts (10  $\mu$ g) of liver were incubated with <sup>32</sup>P-labeled TRE oligonucleotides for either DR4 (5' AGC TTC AGG TCA CAG GAG GTC AGA GAG 3') or palindromic sites (5' AAG ATT CAG GTC ATG ACC TGA GGA GA 3') (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). The binding reactions were incubated on ice for 40 min in a buffer containing 20 mM HEPES, 50 mM KCl, 20% glycerol, 0.2 mM EDTA, 0.5 mM PMSF, 1 mM DTT, 1  $\mu$ g/ $\mu$ l BSA, and 1  $\mu$ g/ $\mu$ l poly(dI-dC) (Pharmacia). The reaction mixture was loaded onto a 5% non-denaturing polyacrylamide gel and resolved at 120 V over the course of 4 h. The gel was dried, and the DNA-protein complexes were visualized by exposure in a Storage Phosphor Screen (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA). The screens were read in a Storm Phosphorimager and analyzed with the ImageQuant software (Molecular Dynamics).

**Statistical analysis.** Results obtained in all experiments were analyzed using a one-way analysis of variance coupled with Bonferroni's multiple-comparison test (control vs. treatments). Differences were considered statistically significant at *P* values of  $\leq 0.01$ .

## RESULTS AND DISCUSSION

In the present study, we investigated the genomic or extra-mitochondrial thyromimetic effects of 3,5-T<sub>2</sub> at concentrations similar to those physiological for T<sub>3</sub>. Previous data from our laboratory had shown that, as in other vertebrates (4, 5, 16), hepatic D2 activity in the killifish is highly sensitive to thyroidal status (10). Thus, and due to the difficulties of measuring 3,5-T<sub>2</sub>, we initially established the concentration range of its regulatory action on D2 by comparing the effects of 3,5-T<sub>2</sub> to those of T<sub>3</sub> in intact (euthyroid) killifish. Dose- and time-dependent activities for both hormones are shown in Fig. 1. The well-known downregulatory effect of T<sub>3</sub> was indistinguishable from that exerted by 3,5-T<sub>2</sub>, both showing a dose-dependent inhibition, which attained a plateau at an immersion dose of 100 nM and as early as 3 h postimmersion. These findings suggested that both hormones had comparable potencies at equivalent doses. To analyze 3,5-T<sub>2</sub> effects in more detail, we used a model of hypothyroidism where the administration of active TH was anticipated to maintain euthyroidal expression of the various thyroid-dependent genes. As shown in Fig. 2, intrahepatic T<sub>3</sub> levels were significantly decreased by the administration of MMI alone. As expected, this decrease was reversed by coadministration of T<sub>3</sub> but not 3,5-T<sub>2</sub>. In fact, levels of endogenous intrahepatic T<sub>3</sub> in fish treated with 3,5-T<sub>2</sub> combined with MMI were no higher than in fish treated with MMI alone. This finding is very important, because it shows that the livers of animals treated with MMI coadministered with 3,5-T<sub>2</sub> are indeed T<sub>3</sub> deficient.

We measured the effects of exogenous T<sub>3</sub>, rT<sub>3</sub>, and 3,5-T<sub>2</sub> on expression and activity of hepatic D2. Our hypothesis was that, if 3,5-T<sub>2</sub> were bioactive, the fish would remain euthyroid in those groups treated with MMI plus T<sub>3</sub> and 3,5-T<sub>2</sub> but not with the inactive metabolite rT<sub>3</sub>. Blocking TH production with MMI significantly increased expression of D2 mRNA by 1.8-fold (Fig. 3A), which was paralleled by a 4.6-fold increase in hepatic D2 activity (Fig. 3B). Concomitant treatment with MMI and T<sub>3</sub> prevented the MMI-induced increase in hepatic D2 mRNA and enzymatic activity (Fig. 3). These results are consistent with the tight regulation of D2 expression exerted by thyroidal status to maintain TH homeostasis (4, 5, 16). In

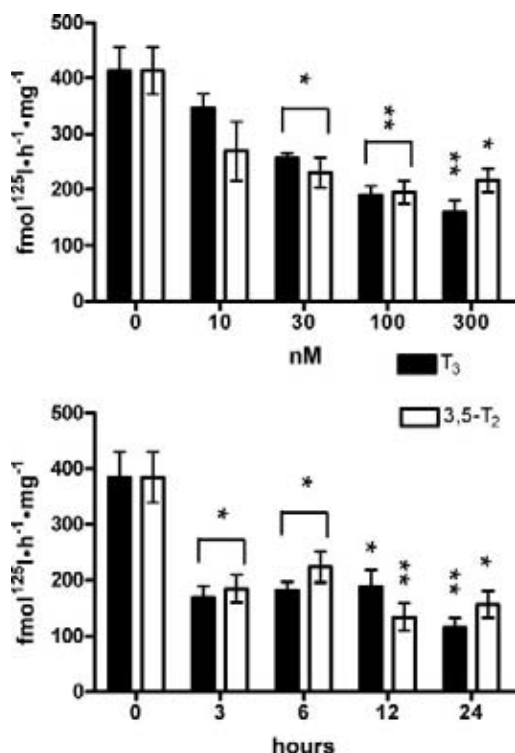


Fig. 1. Dose- (*top*) and time-response curves (*bottom*) of hepatic iodothyronine deiodinase type 2 (D2) activity after treatment with triiodothyronine (T<sub>3</sub>) or with 3,5-diiodothyronine (3,5-T<sub>2</sub>). Environmental seawater was supplemented with 10, 30, 100, and 300 nM of either iodothyronine for 24 h. For time-response curves, a final concentration of 100 nM of either T<sub>3</sub> or 3,5-T<sub>2</sub> was administered by immersion for 3, 6, 12, 18, and 24 h. Values are means ± SE (*n* = 6). Significance is indicated (\**P* < 0.01; \*\**P* < 0.001).

addition, these data further demonstrate that 30 nM T<sub>3</sub> can maintain normal physiological levels of D2 expression.

Despite the hypothyroid levels of endogenous intrahepatic T<sub>3</sub> in fish treated with 3,5-T<sub>2</sub>, D2 mRNA expression and enzymatic activity were maintained at levels similar to those of untreated controls or fish treated with MMI+T<sub>3</sub> (Fig. 3). These data strongly suggest that 3,5-T<sub>2</sub> is sufficient to maintain D2 expression in liver at euthyroid levels.

Treatment with the inactive iodothyronine rT<sub>3</sub> had no effect on MMI-induced increases in D2. This result differs from mammalian D2 regulation, where rT<sub>3</sub> increases D2 degradation

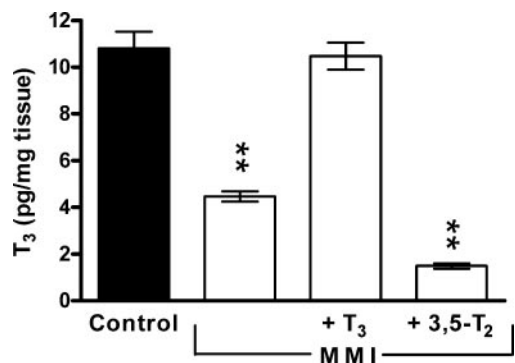


Fig. 2. Intrahepatic concentrations of T<sub>3</sub> in killifish treated for 5 days with 4.5 mM methimazole (MMI), either alone or with 30 nM T<sub>3</sub> or 30 mM 3,5-T<sub>2</sub>. Values are means ± SE (*n* = 6). Significance is indicated (\**P* < 0.01; \*\**P* < 0.001).

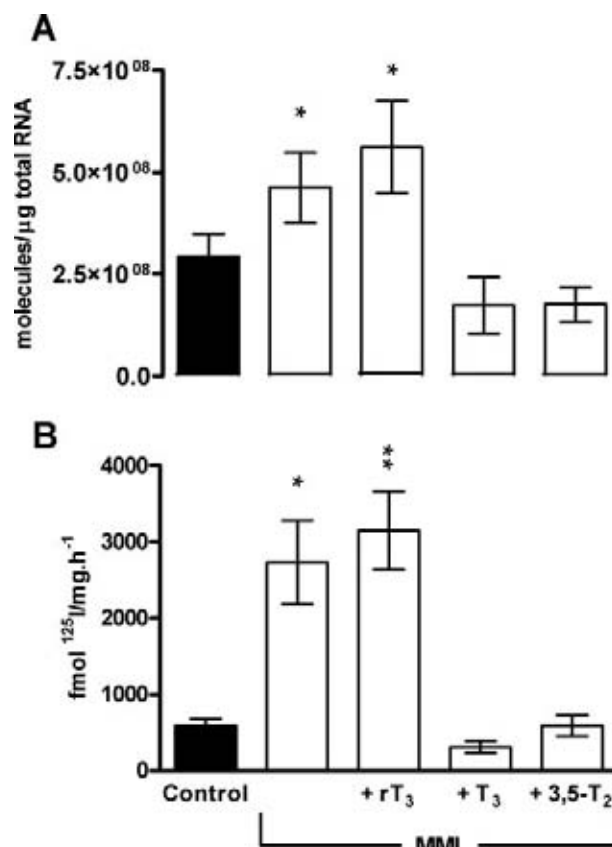


Fig. 3. Effect of a 5-day treatment with 4.5 mM MMI either alone or with 30 nM T<sub>3</sub>, reverse T<sub>3</sub> (rT<sub>3</sub>), or 3,5-T<sub>2</sub> on killifish D2 mRNA expression (competitive PCR; pooled livers, *n* = 4 pools/experimental group) (A) and hepatic D2 activity (*n* = 12–14) (B). Values are means ± SE. Significance is indicated (\**P* < 0.01; \*\**P* < 0.001).

in the cerebral cortex (for review see Refs. 4, 5). This is the first study of the rT<sub>3</sub> effect on the regulation of a teleostean D2. Although we cannot offer an explanation for the lack of effect of rT<sub>3</sub> upon D2 regulation, this result adds to the unique aspects of iodothyronine deiodinases in teleosts.

As another test of our hypothesis, we analyzed the expression of GH, a gene that is classically upregulated by TH in the pituitary (11, 15). Here we demonstrated GH expression in the liver of killifish, as reported earlier in trout (33). This finding allowed the same end tissue to be analyzed throughout the

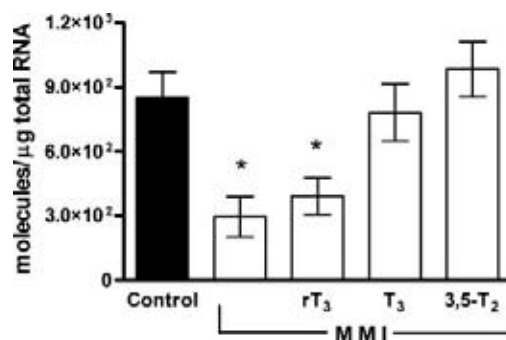


Fig. 4. Effect of a 5-day treatment with 4.5 mM MMI either alone or with 30 nM T<sub>3</sub>, rT<sub>3</sub>, or 3,5-T<sub>2</sub> on killifish hepatic growth hormone mRNA expression (real-time PCR; pooled livers, *n* = 4 pools/experimental group). Values are means ± SE. Significance is indicated (\**P* < 0.01).

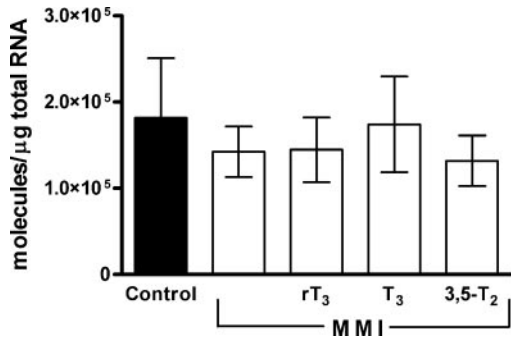


Fig. 5. Effect of a 5-day treatment with 4.5 mM MMI either alone or with 30 nM T<sub>3</sub>, rT<sub>3</sub>, or 3,5-T<sub>2</sub> on killfish hepatic Na-K-ATPase α<sub>1</sub>-mRNA expression (real-time PCR; pooled livers, *n* = 4 pools/experimental group). Values are means ± SE.

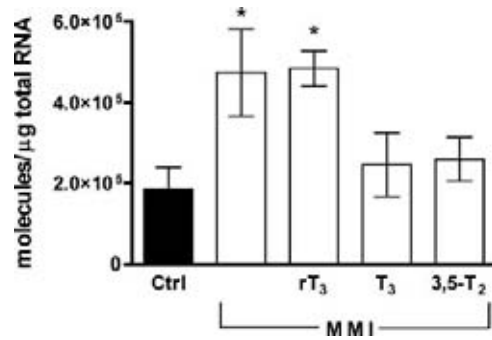


Fig. 7. Effect of a 5-day treatment with 4.5 mM MMI either alone or with 30 nM T<sub>3</sub>, rT<sub>3</sub>, or 3,5-T<sub>2</sub> on killfish hepatic thyroid receptor β1 mRNA expression measured by real-time PCR (pooled livers, *n* = 4 pools/experimental group). Values are means ± SE. Significance is indicated (\**P* < 0.01).

study. As expected (14) and shown in Fig. 4, hepatic GH mRNA levels were reduced by threefold in hypothyroid animals. The effects of MMI on GH expression were reversed by 30 nM T<sub>3</sub> but not by rT<sub>3</sub>, similar to the effects seen on D2 expression. When 3,5-T<sub>2</sub> was coadministered with MMI, hepatic GH mRNA levels were similar to those in untreated or MMI+T<sub>3</sub>-treated fish. These data add further support for the hypothesis that 3,5-T<sub>2</sub>, like T<sub>3</sub>, can reverse the impaired expression of hepatic GH associated with the hypothyroidal state.

To determine whether the effects of 3,5-T<sub>2</sub> on D2 and GH expression were specifically related to thyroidal status, we also measured the hepatic expression of the Na-K-ATPase α<sub>1</sub>-subunit gene. Na-K-ATPase α<sub>1</sub> has been cloned from killfish,

and its hepatic expression has been demonstrated (30). In contrast to the α<sub>2</sub>- and β-genes, the expression of the α<sub>1</sub>-isoform is unaffected by TH depletion (13), thus making it a suitable negative control for TH bioactivity. Hypothyroidism had no effect on hepatic Na-K-ATPase α<sub>1</sub> expression (Fig. 5). Furthermore, treatment with replacement doses of T<sub>3</sub>, 3,5-T<sub>2</sub>, or rT<sub>3</sub> induced no changes in Na-K-ATPase α<sub>1</sub> expression. Although these results suggest that 3,5-T<sub>2</sub> bioactivity could be limited to the expression of TH-dependent genes, additional work involving other nonthyroid-dependent genes is needed to confirm this possibility.

To establish the role of 3,5-T<sub>2</sub> in modulating expression of TH-responsive genes, we examined the binding of hepatic

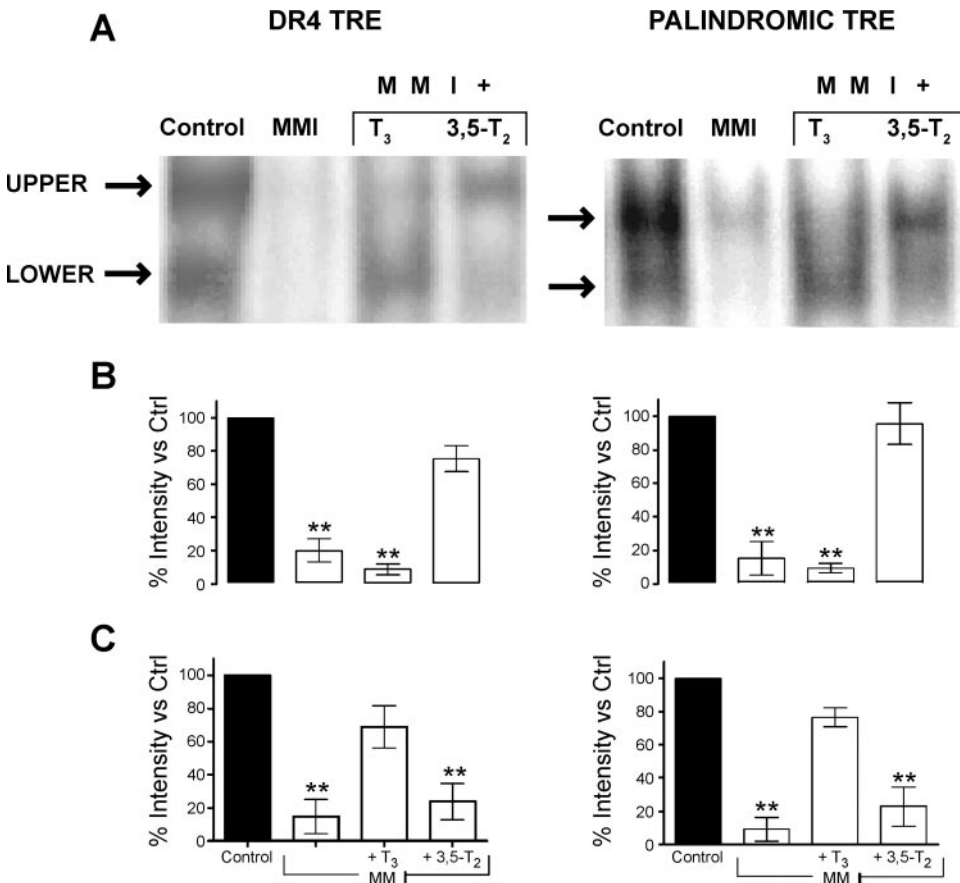


Fig. 6. A: representative EMSAs of nuclear extracts from killfish livers treated with MMI (4.5 mM) and replacement doses of 30 nM T<sub>3</sub> or 3,5-T<sub>2</sub>. The ideal DR4 or palindromic thyroid hormone response element (TRE) oligonucleotides were <sup>32</sup>P labeled. Densitometric analysis show the upper (B) and lower (C) complexes formed (*n* = 3 different assays from 3 independent experiments). Values are means ± SE. Significance is indicated (\*\**P* < 0.001).

nuclear protein extracts to oligonucleotides corresponding to known mammalian TREs. Canonical TREs identified in mammals include the AGGTCA half-site, repeated and separated by a four-base spacer (DR4), as well as a 12-base palindrome formed by inverted duplication of the half-site. Extracts from untreated fish formed two specific, protein-DNA complexes, with labeled oligonucleotides corresponding to either the DR4 or palindromic sequences (Fig. 6). Treatment with MMI virtually eliminated the paired protein-oligonucleotide complexes for both TREs. In animals treated with MMI+T<sub>3</sub>, the intensity of the lower molecular weight complex returned to normal levels, whereas the higher molecular weight band was unchanged. Conversely, cotreatment with 3,5-T<sub>2</sub> restored formation of only the high molecular weight complex with both oligonucleotides. These data not only demonstrate that T<sub>3</sub> and 3,5-T<sub>2</sub> stimulate binding of proteins to TREs, but suggest that the two THs activate different DNA-binding proteins. In this context, the upper band suggests the presence of heavier or additional proteins in the 3,5-T<sub>2</sub> recruited complex. Nevertheless, it is difficult to speculate about the composition of these complexes recruited by TRE, because variable and distinct recruitment patterns of coactivators occur on individual target genes regulated by TH (18). The exact mechanism of T<sub>3</sub>- and 3,5-T<sub>2</sub>-dependent recruitment of nuclear transcription factors or other DNA-binding proteins remains unknown.

Although other studies indicate that 3,5-T<sub>2</sub> exhibits low affinity for the canonical TR in both mammalian (17) and teleostean (6, 7) species, our results strongly suggest that both T<sub>3</sub> and 3,5-T<sub>2</sub> act directly on TH-dependent genes in the liver by binding and activating TRs and interacting with TREs in the promoter regions of these genes. In this context, Baur et al. (3) also suggested an activation of nuclear T<sub>3</sub>/retinoid X-receptor heterodimers in rat pituitary in the presence of 3,5-T<sub>2</sub>. These authors observed that 3,5-T<sub>2</sub> rapidly activates proteins that can specifically bind to the DR4 TRE that was identified in the promoter region of the human *Dio1* gene and that this DNA-protein interaction was as potent as when stimulated by T<sub>3</sub>. In the present study, we evaluated the possible participation of TR in 3,5-T<sub>2</sub> gene regulation. Indeed, as shown in Fig. 7, the fact that the upregulation of TRβ1 expression by hypothyroidism was reversed by T<sub>3</sub> and 3,5-T<sub>2</sub> indirectly suggests the participation of TRβ1 as part of the transcriptional machinery that mediates the action of both iodothyronines. This matter deserves further attention and is currently being studied in our laboratory.

Attempts to demonstrate 3,5-T<sub>2</sub> bioactivity have been made since the late 1980s, and now it is well accepted that 3,5-T<sub>2</sub> has clear effects on oxygen consumption that are distinct from those of T<sub>3</sub> and are not dependent on protein synthesis (12, 19). In support of these nongenomic effects, a very low affinity of 3,5-T<sub>2</sub> for TR α1, β1, and β2 (~100× lower than T<sub>3</sub>) has been described in mammals (17) and teleosts (6, 7). Nevertheless, studies using rat models or in vitro systems to examine the effects of 3,5-T<sub>2</sub> on malic enzyme, GH and TRβ2 (2), TSH (3), and IGF binding protein type 4 (8) have shown that 3,5-T<sub>2</sub> can indeed influence mRNA expression or concentration. However, in most of these studies, 3,5-T<sub>2</sub> at doses up to 100-fold greater than those of T<sub>3</sub> were used to generate comparable effects. Our laboratory's previous finding that fish hepatic D1 and D2 are downregulated transcriptionally by supra-physiological doses of both T<sub>3</sub> and 3,5-T<sub>2</sub> (10) also provided

evidence that 3,5-T<sub>2</sub> has effects within the nucleus. The present work extends these findings by showing that, at equivalent doses, both 3,5-T<sub>2</sub> and T<sub>3</sub> maintain transcription of TH-responsive genes at euthyroidal levels. Furthermore, 3,5-T<sub>2</sub> and T<sub>3</sub> induce formation of two distinct TRE-protein complexes. Although not all components of these complexes have yet been identified, both appear to contain TRβ1. Whether 3,5-T<sub>2</sub> has thyromimetic effects on all TH-target genes or an effect in all vertebrates is still an open question. Understanding TH metabolism and action across different vertebrates may require us to reconsider established schemes of thyroid physiology.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We gratefully acknowledge Patricia Villalobos and Anaid Antaramian for technical assistance. We would like to express our gratitude to Dr. Dorothy Pless for critically reviewing the manuscript.

#### GRANTS

This work was partially supported by Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) Grants PAPIIT IN222405 and PAPIIT IN202807.

#### REFERENCES

1. Almuly R, Cavari B, Ferstman H, Kolodny O, Funkenstein B. Genomic structure and sequence of the gilthead seabream (*Sparus aurata*) growth hormone-encoding gene: identification of minisatellite polymorphism in intron I. *Genome* 43: 836–845, 2000.
2. Ball SG, Sokolov J, Chin WW. 3,5-Diiodo-L-thyronine (T<sub>2</sub>) has selective thyromimetic effects in vivo and in vitro. *J Mol Endocrinol* 19: 137–147, 1997.
3. Baur A, Bauer K, Jarry H, Köhrle J. 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, 1997.
4. Bianco AC, Larsen PR. Cellular and structural biology of the deiodinases. *Thyroid* 15: 777–786, 2005.
5. Bianco AC, Salvatore D, Gereben B, Berry MJ, Larsen PR. Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases. *Endocr Rev* 23: 38–89, 2002.
6. Bres O, Eales JG. Thyroid hormone binding to isolated trout (*Salmo gairdneri*) liver nuclei in vitro: binding affinity, capacity and chemical specificity. *Gen Comp Endocrinol* 61: 29–39, 1986.
7. Darling DS, Dickhoff WW, Gorbman A. Comparison of thyroid hormone binding to hepatic nuclei of the rat and a teleost (*Oncorhynchus kisutch*). *Endocrinology* 111: 1936–1943, 1982.
8. Demori I, Gerdoni E, Fugassa E, Voci A. 3,5-Diiodothyronine mimics the effect of triiodothyronine on insulin-like growth factor binding protein-4 expression in cultured rat hepatocytes. *Horm Metab Res* 36: 679–685, 2004.
9. Etkin W. The mechanism of anuran metamorphosis pattern. *J Exp Zool* 71: 217–240, 1935.
10. Garcia GC, Jeziorski MC, Valverde RC, Orozco A. Effects of iodothyronines on the hepatic thyroid hormone activating pathway in killifish. *Gen Comp Endocrinol* 135: 201–209, 2004.
11. Glass CK, Franco R, Weinberger C, Albert VR, Evans RM, Rosenfeld MG. A c-erb-A binding site in rat growth hormone gene mediates trans-activation by thyroid hormone. *Nature* 329: 738–741, 1987.
12. Goglia F. Biological effects of 3,5-diiodothyronine (T<sub>2</sub>). *Biochemistry (Mosc)* 70: 164–172, 2005.
13. Horowitz B, Hensley CB, Quintero M, Azuma KK, Putnam D, McDonough AA. Differential regulation of Na,K-ATPase alpha 1, alpha 2, and beta subunit mRNA and protein levels by thyroid hormone. *J Biol Chem* 265: 14308–14314, 1990.
14. Hulbert AJ. Thyroid hormones and their effects: a new perspective. *Biol Rev Camb Philos Soc* 75: 519–631, 2000.
15. Koenig RJ, Brent GA, Warne RL, Larsen PR, Moore DD. Thyroid hormone receptor binds to a site in the rat growth hormone promoter required for induction by thyroid hormone. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 5670–5674, 1987.

16. **Kuiper GG, Kester MH, Peeters RP, Visser TJ.** Biochemical mechanisms of thyroid hormone deiodination. *Thyroid* 15: 787–798, 2005.
17. **Leeson PD, Ellis D, Emmett JC, Shah VP, Showell GA, Underwood AH.** Thyroid hormone analogues. Synthesis of 3'-substituted 3,5-diiodo-L-thyronines and quantitative structure-activity studies of in vitro and in vivo thromimetic activities in rat liver and heart. *J Med Chem* 31: 37–54, 1988.
18. **Liu Y, Xia X, Fondell JD, Yen PM.** Thyroid hormone-regulated target genes have distinct patterns of coactivator recruitment and histone acetylation. *Mol Endocrinol* 20: 483–490, 2006.
19. **Lombardi A, Lanni A, Silvestri E, de Lange P, Goglia F, Moreno M.** 3,5-Diiodothyronine: biological actions and therapeutic perspectives. *Immun Endoc Metab Agents Med Chem* 6: 255–265, 2006.
20. **Lopez-Bojorquez LN, Arechavaleta-Velasco F, Vadillo-Ortega F, Montes-Sanchez D, Ventura-Gallegos JL, Zentella-Dehesa A.** NF-κB translocation and endothelial cell activation is potentiated by macrophage-released signals co-secreted with TNF-α and IL-1β. *Inflamm Res* 53: 567–575, 2004.
21. **Maia AL, Kim BW, Huang SA, Harney JW, Larsen PR.** Type 2 iodothyronine deiodinase is the major source of plasma T3 in euthyroid humans. *J Clin Invest* 115: 2524–2533, 2005.
22. **Marchand O, Safi R, Escriva H, Van Rompaey E, Prunet P, Laudet V.** Molecular cloning and characterization of thyroid hormone receptors in teleost fish. *J Mol Endocrinol* 26: 51–65, 2001.
23. **Moreno M, Lombardi A, Beneduce L, Silvestri E, Pinna G, Goglia F, Lanni A.** Are the effects of T3 on resting metabolic rate in euthyroid rats entirely caused by T3 itself? *Endocrinology* 143: 504–510, 2002.
24. **Moreno M, Lombardi A, Lombardi P, Goglia F, Lanni A.** Effect of 3,5-diiodo-L-thyronine on thyroid stimulating hormone and growth hormone serum levels in hypothyroid rats. *Life Sci* 62: 2369–2377, 1998.
25. **Omeljaniuk RJ, Eales JG.** 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, 1985.
26. **Orozco A, Linser PJ, Valverde RC.** Kinetic characterization of outer-ring deiodinase activity (ORD) in the liver, gill and retina of (*Fundulus heteroclitus*). *Comp Biochem Physiol B* 126: 283–290, 2000.
27. **Orozco A, Ruiz-Juvera A, Valverde RC.** The importance of employing homologous serum free of thyronines in radioimmunoassays to assess circulating thyroid hormones in rainbow trout. *Bol Estud Med Biol* 40: 41–47, 1992.
28. **Orozco A, Valverde RC.** Thyroid hormone deiodination in fish. *Thyroid* 15: 779–813, 2005.
29. **Pazos-Moura CC, Moura EG, Dorris ML, Rehnmatk S, Melendez L, Silva JE, Taurog A.** Effect of iodine deficiency and cold exposure on thyroxine 5'-deiodinase activity in various rat tissues. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 260: E175–E182, 1991.
30. **Semple JW, Green HJ, Schulte PM.** Molecular cloning and characterization of two Na/K-ATPase isoforms in *Fundulus heteroclitus*. *Mar Biotechnol (NY)* 4: 512–519, 2002.
31. **Sweeting RM, Eales JG.** HPLC analysis of in vitro hepatic deiodination products of thyroid hormones in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Gen Comp Endocrinol* 85: 367–375, 1992.
32. **Yang BY, Chan KM, Lin CM, Chen TT.** Characterization of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) growth hormone 1 gene and the promoter region of growth hormone 2 gene. *Arch Biochem Biophys* 340: 359–368, 1997.
33. **Yang BY, Greene M, Chen TT.** Early embryonic expression of the growth hormone family protein genes in the developing rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Mol Reprod Dev* 53: 127–134, 1999.





## Functional identification of an osmotic response element (ORE) in the promoter region of the killifish deiodinase 2 gene (*FhDio2*)

L. López-Bojórquez\*, P. Villalobos, C. García-G., A. Orozco and C. Valverde-R.

*Departamento de Neurobiología Celular y Molecular, Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Querétaro, Qro. CP 76230, México*

\*Author for correspondence (e-mail: lucianikolaia@gmail.com)

Accepted 5 June 2007

### Summary

The physiological role played by thyroid hormones (TH) in hydro-osmotic homeostasis in fish remains a controversial issue. Previous studies have shown that in *Fundulus heteroclitus* (killifish) hypo-osmotic stress increases liver iodothyronine deiodinase type 2 (D2) mRNA and D2 activity. In this study we identified two conserved osmotic response element (ORE) motifs in the promoter region of the killifish D2 gene (*FhDio2*) and examined their possible role in the transcriptional regulation of *FhDio2* during hypo-osmotic stress. As assessed by the electrophoretic mobility shift assay, results from *in vivo* and *in vitro* experiments demonstrate that exposure to an abrupt hyposmotic challenge triggers in the liver of killifish a strong nuclear recruitment of a putative osmotic response element binding protein (OREBP). This protein–DNA binding is time-dependent, attains a maximum within 2–8 h

after the osmotic stress, and is followed by a significant increase in D2 activity. Furthermore, protein–DNA binding and the subsequent elevation in enzyme activity were blocked by the tyrosine kinase inhibitor genistein. Thus, during hypo-osmotic stress, a putative OREBP kinase-activated pathway stimulates *FhDio2* transcription and enzymatic activity. These data and the fact that D2 is the major enzyme providing local intracellular T<sub>3</sub> suggest that TH plays a direct role in osmoregulation in fish, possibly by participating in hepatic ammonia metabolism. This study provides important insight into the physiological role of TH in hydro-osmotic homeostasis in fish.

Key words: osmotic response element, osmotic stress, deiodinase type 2 gene, *Fundulus heteroclitus*, thyroid hormones.

### Introduction

The response to osmotic stress is among the most basic constitutive homeostatic functions in all living systems. It has been suggested that the network of genes and transduction signals involved in its operation, the stress proteome, belongs to a highly conserved core set of proteins (Kultz, 2003). The first osmotic response element (ORE) in a eukaryotic genome was originally described in the rabbit aldolase reductase gene (Ferraris et al., 1996), followed by the characterization of its corresponding transcription factor, the ORE binding protein (OREBP) (Ferraris et al., 1999). Tyrosine phosphorylation is required for OREBP to translocate into the nucleus and activate transcription. Although the pathway responsible for OREBP phosphorylation remains to be fully elucidated, tyrosine kinases p38 and protein kinase A (PKA) have been implicated (Ferraris et al., 2002). In marked contrast to terrestrial vertebrates, information regarding osmotic stress responses in aquatic species is scarce and fragmented. Up to now OREBPs have been amply assessed during hyperosmotic conditions, but these studies have been mainly restricted to *in vitro* experiments and to mammals. Recently the transcriptional regulation in response to changes in environmental salinity has begun to be explored in euryhaline fishes. Two osmotic stress transcription factors have been identified in tilapia gill, the osmotic transcription

factor 1 (Ostf1) and the tilapia homolog of transcription factor II B (TFIIB). Both show a specific and transient up-regulation during hyperosmotic stress (Fiol and Kultz, 2005). Ostf1 has strong homology to the mammalian glucocorticoid leucine zipper protein; however, no steroid is required for its induction during hyperosmotic, NaCl-mediated stress in fish (Fiol et al., 2006).

Because of their binding to nuclear receptors, thyroid hormones (TH) are well-known transcription mediators. TH play a central role in regulating diverse homeostatic functions, from the basal metabolic rate and protein synthesis, to development and cell differentiation (Anderson et al., 2000). Nevertheless, the function of TH in hydro-osmotic balance in fish has been a controversial issue (for reviews, see McCormick, 2001; Orozco and Valverde-R., 2005; Klaren et al., 2007). Previous data from our laboratory have shown that in the euryhaline teleost *Fundulus heteroclitus* (Fh), hypo-osmotic stress elicits an increase in liver iodothyronine deiodinase type 2 (D2) activity (Orozco et al., 1998). D2 is known to be the major provider of T<sub>3</sub> at the target cell level; thus, an up-regulation of this enzyme after an osmotic challenge suggested the participation of TH during this homeostatic response. In the present study we used a bioinformatic approach (Heinemeyer et al., 1998) to identify two conserved ORE motifs within the 5'

UTR of the *FhDio2* gene (Orozco et al., 2002a). We then carried out a series of *in vivo* and *in vitro* experiments to examine the possible participation of these ORE motifs in regulating *FhDio2* gene expression during hypo-osmotic stress in *Fundulus heteroclitus*. Our data demonstrate the participation of a putative OREBP-activated pathway in the liver of killifish challenged by abrupt low salinity.

## Materials and methods

### Bioinformatic search

Using 1.3 kb of the known 5' UTR of *FhDio2* (GenBank accession no. AY065834), we performed a computational search for transcription factor binding sites (TFBS). To this end we used the public version of TF Search (<http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>) (Heinemeyer et al., 1998) with the available vertebrate matrices and a threshold score up to 85.

### Animals

Seawater-adapted male *Fundulus heteroclitus* L. (killifish), body mass 4–6 g, were collected from the estuarine creeks of the Matanzas River (St Augustine, FL, USA). After capture, fish were deparasitized and kept in tanks with running seawater (SW) piped directly from the ocean at a temperature of around 28°C. Animals were fed *ad libitum* (Silver Cup, Nelson and Sons, Murray, UT, USA) and maintained on a light:dark cycle of 14 h:10 h. All experimental protocols used in this study were approved by the Institutional Animals Ethics Committee. Experiments were carried out 1 week after acclimatization.

### In vivo experiments

For each experiment, fish ( $N=10-12$ ) were placed into tanks with running SW and constant aeration. At the start of the experiment, the water supply was shut down, and the water volume of each tank was adjusted to 6 l with a 1:1 ratio of salt and freshwater (50%). Except for the change in water salinity, control and experimental groups were handled in the same manner. Based on previous experiments (Orozco et al., 1998), fish were sacrificed 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 12 and 16 h after the hypo-osmotic challenge. Animals were sacrificed by decapitation, and the liver was collected and divided to measure D2 mRNA concentrations, D2 activity and for nuclear extraction (see below). D2 mRNA was measured in pools.

### In vitro experiments

Seawater acclimated fishes ( $N=2-3$ ) were sacrificed, and their livers were dissected and cut into small pieces of about 2 mm (5 mg wet mass) in the presence of L-15 medium (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Liver explants were pooled, kept on ice for 30 min, and then randomly assigned to either control or experimental 24-well plates. The L-15 medium in the experimental plates was made hypotonic by simple dilution 1:1, restoring its nutrients with an amino acid stock solution (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) and galactose 10 g l<sup>-1</sup>. The explants were incubated for 6 h in a metabolic bath chamber at 28°C under continuous agitation and saturating humidity with 99% O<sub>2</sub> and 1% CO<sub>2</sub> (Janssens and Grigg, 1994). Explants and the corresponding culture media were separately collected after 2, 4 and 6 h of incubation. Liver fragments were divided into two pools: one to quantitate D2

activity and the other for nuclear extraction. D2 activity was measured in tissue homogenates, and to evaluate tissue viability lactate dehydrogenase (LDH) was measured in the culture media. For the tyrosine kinase inhibitor experiments, explants were pre-treated with genistein 2 h prior before exposure to L-15 hypo-osmotic medium.

### Nuclear and cytoplasmic extracts

Control or experimental livers were resuspended in hypotonic buffer (10 mmol l<sup>-1</sup> Hepes, pH 7.9, 10 mmol l<sup>-1</sup> KCl, 1 mmol l<sup>-1</sup> EDTA, 5 mmol l<sup>-1</sup> DTT) as previously described (López-Bojórquez et al., 2004). The tissue was broken mechanically with a plastic homogenizer at low velocity. To allow cell debris to settle the homogenates were incubated at 4°C for 30 min, and the supernatants were collected. The integrity of the nuclei was evaluated by Trypan-blue stain (1:1).

Nuclei were centrifuged at 800 g to separate them from the cytoplasmic fraction. The supernatants (cytoplasm) were diluted in an equal volume of dilution buffer (20 mmol l<sup>-1</sup> Hepes, pH 7.9, 50 mmol l<sup>-1</sup> KCl, 20% glycerol, 0.2 mmol l<sup>-1</sup> EDTA, 0.5 mmol l<sup>-1</sup> PMSF, 1 mmol l<sup>-1</sup> DTT) for protein quantification. The pellet (nuclei) was recovered, resuspended in hypertonic buffer (50 mmol l<sup>-1</sup> Tris-HCl, pH 7.9, 400 mmol l<sup>-1</sup> NaCl, 400 mmol l<sup>-1</sup> KCl, 10% glycerol, 1 mmol l<sup>-1</sup> EDTA, 5 mmol l<sup>-1</sup> DTT, 0.5 mmol l<sup>-1</sup> PMSF) and maintained with agitation at 4°C for 30 min. After centrifugation at 16 000 g for 25 min, the supernatant was resuspended in an equal volume of dilution buffer. Protein was quantified by the Bradford method (BioRad, Hercules, CA, USA). The same protocol was followed to isolate the nuclear and cytoplasmic fraction from the explants in the *in vitro* experiments.

### Analytical procedures

#### LDH assay

The viability of liver explants was assessed by the quantitative determination of LDH in the culture media using the reagents supplied in the SPINREACT kit (SpinReact, Girona, Spain). The activity was normalized to the protein content of the corresponding liver explants for each well. These data were used to normalize D2 activity of the corresponding explant by multiplying D2 specific activity and LDH activity. Normalized D2 results are expressed in arbitrary units.

#### Deiodination assay

Enzyme activity was measured in duplicate as previously described (Orozco et al., 2000). Briefly, the total volume of the reaction mixture was 100 µl and contained 1 nmol l<sup>-1</sup> <sup>125</sup>I-T<sub>4</sub> [specific activity 1200 µCi µg<sup>-1</sup> (1 µCi=3.7×10<sup>10</sup> Bq); NEN-Perkin Elmer, Wellesley, MA, USA], 25 mmol l<sup>-1</sup> DTT (Calbiochem, Darmstadt, Germany) and 100 µg/tube of liver homogenate protein, and the assays were incubated for 1 h at 37°C. The released acid-soluble <sup>125</sup>I was isolated by chromatography on Dowex 50W-X2 columns (BioRad). Enzyme specific activity (fmol <sup>125</sup>I mg<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) was calculated as previously described (Pazos-Moura et al., 1991). Protein content was measured by the Bradford method. Since the LDH activity in the culture medium is inversely proportional to cell viability, the final D2 activity is reported as product of both enzymes, in arbitrary units.

### Measurement of D2 mRNA

For quantitation, RNA was isolated from livers (TRIzol, Invitrogen), and cDNA was reverse-transcribed (*Superscript*, Invitrogen) from 10 µg RNA using a gene-specific primer (TTCAGAGCTCATCTACTATCGT). The D2 mRNA concentration was measured in duplicate by a competitive PCR as previously described (García-G. et al., 2004). The standard curve ranged from  $10^4$  to  $10^9$  molecules  $\mu\text{l}^{-1}$ . The oligonucleotides used (sense: CAAACAGGTGAACTTG-GCT and antisense: TCGTCGATGTAGACCAGC) amplified a product of 270 bp (40 s at 94°, 40 s at 65°, 30 s at 72° for 35 cycles). Identical PCRs from the RNA samples prior to the reverse transcription reaction yielded no detectable products, which indicates that the RNA was not contaminated with genomic DNA. Results are expressed as molecules  $\mu\text{g}^{-1}$  total mRNA used in the reverse transcription.

### Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

Putative OREBP-binding activity was studied by the use of [ $^{32}\text{P}$ ]-labeled double-stranded oligonucleotides corresponding to ORE1 (5' TG TAGA GGGAAAAGCT GGGACCA 3') or ORE2 (5' TTCAGG CGGAAAAGTA ACATTTTC 3') (see below). The probes (200 ng in 1 µl) were labeled with 0.5 µl (5 U) of T4 phosphonucleotide kinase; 2.5 µl of buffer provided in the kit (Roche, Basel, Switzerland) and 3 µl of  $^{32}\text{P}$ -γATP (NEN-Perkin Elmer, specific activity 3000 Ci mmol $^{-1}$ ), and water to a final volume of 25 µl. The labeling reaction was mixed with 1 ml of hybridization solution and then passed through a nitrocellulose filter to eliminate excess  $^{32}\text{P}$ -γATP. The quality of the labeled products was assessed by electrophoresis in denaturing polyacrylamide gels exposed to photographic film. The binding reaction was performed by incubating 10 µg of either nuclear or cytoplasmic protein with the corresponding probes. The reaction mixture was incubated on ice for 40 min in a buffer containing 20 mmol l $^{-1}$  Hepes, 50 mmol l $^{-1}$  KCl, 20% glycerol, 0.2 mmol l $^{-1}$  EDTA, 0.5 mmol l $^{-1}$  PMSF, 1 mmol l $^{-1}$  DTT, 1 µg µl $^{-1}$  BSA, and polydI/dC (Pharmacia, NY, NY, USA). The reaction mixture was loaded onto a 5% non-denaturing polyacrylamide gel and resolved at 120 V for 4 h. The gel was dried, and the DNA-protein complexes were visualized by exposure in a Storage Phosphor Screen (Molecular Dynamics,

San Francisco CA, USA). The screens were read in a *Phosphorimager* (Storm Molecular Dynamics) and quantified with the ImageQuant software (Molecular Dynamics). The radioactivity of each band was corrected for the background and is presented in arbitrary units.

### Statistics

The EMSA figures are a representative experiment from 4–6 repetitions. The graph shows the average of three independent quantitative evaluations of the gel shown.

In the D2 activity experiments, differences among groups were analyzed by one-way ANOVA coupled with a Bonferroni's multiple comparison test (control vs treatment). Differences were considered significant when  $P < 0.05$ .

## Results

### The 5' UTR of *FhDio2* contains two osmotic responsive elements

As shown in Fig. 1A, the computational analysis revealed the presence of several putative TFBS in *FhDio2*. Among them we identified two ORE motifs at positions –322 (ORE1) and –1016 (ORE2). ORE1 was identical to the canonical mammalian ORE consensus motif (Ferraris et al., 1999), and ORE2 only differed in one nucleotide (Fig. 1B).

### Hypo-osmotic stress in vivo triggers the nuclear recruitment of a putative OREBP and up-regulates mRNA expression and D2 activity

To examine whether a putative OREBP is associated with *FhDio2* transcription via the ORE elements identified in the 5' promoter region of the gene, we performed EMSA with specific oligonucleotides containing the endogenous ORE1 and ORE2 motifs identified above (Fig. 1). Nuclear extracts from both control and hypo-osmotically stressed fish were obtained at 0.5, 1, 2, 3, 4, 8, 12 and 16 h after the stress. As shown in Fig. 2A, hypo-osmotic stress was accompanied by clear-cut recruitment of cytoplasmic protein into the nuclei. Indeed, this protein–DNA binding occurred in a biphasic mode: an initial protein translocation 2 h after stress, and a second, more intense wave of recruitment 6 h later. Furthermore, the nuclear protein–DNA binding correlated with the parallel disappearance of protein from the cytoplasmic compartment. The protein reappeared in the cytoplasm 12 h after initiation of the experiment. Fig. 3 shows the specificity of the putative OREBP complex. Formation of the complex was specifically blocked by

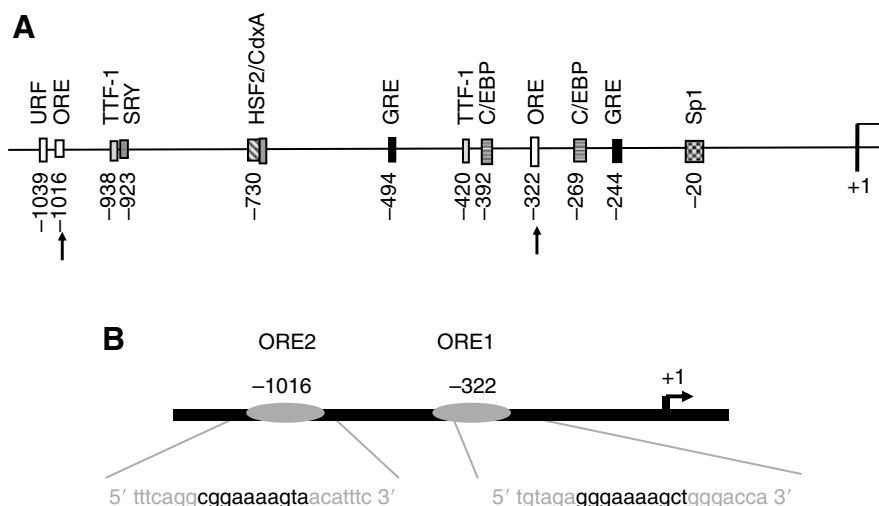


Fig. 1. Putative transcription factor binding sites (TFBS) in the *FhDio2*. (A) Schematic representation of the 1.3 kb promoter region of *FhDio2* showing the localization of putative TFBS. Numbers refer to the position of the starting nucleotide of the element upstream of the transcription start sequence. Black arrows indicate the position of the two putative ORE-binding sites. (B) The sites and the corresponding oligonucleotide sequences of ORE1 and ORE2 are indicated.

competition with a 100-fold excess of the identical but unlabeled oligonucleotide, as well as when nuclear extracts were omitted from the binding reaction or when a random

oligonucleotide was used. Closely coupled in time to this initial putative OREBP nuclear recruitment, both the D2 mRNA concentration and D2 activity (Fig. 4) increased significantly. D2 mRNA attained maximum values 8 h after stress, which coincides with the second and more intense wave of the putative OREBP recruitment. The increase in enzyme activity was slower and became significant 12 h after the osmotic challenge.

*Liver cells in vitro* directly detect extracellular osmotic changes

Consistent with results from the *in vivo* experiments, when liver explants were confronted directly with the hypo-osmotic challenge, there was a significant protein translocation into the nuclei (Fig. 5A). This protein–DNA recruitment is first observed at 2 h and reaches a peak 4 h post-stress. Furthermore, this conspicuous, putative OREBP-translocation response is followed by a significant increase in hepatic D2 activity 2 h later (Fig. 5B).

*Tyrosine kinase inhibition blocks putative OREBP binding and D2 activation*

To test for the possible participation of tyrosine kinases in the putative OREBP activation, hepatic explants were incubated with 10  $\mu\text{mol l}^{-1}$  genistein 2 h prior to the hypo-osmotic challenge. Subsequently, the explants were challenged with hyposmotic medium for

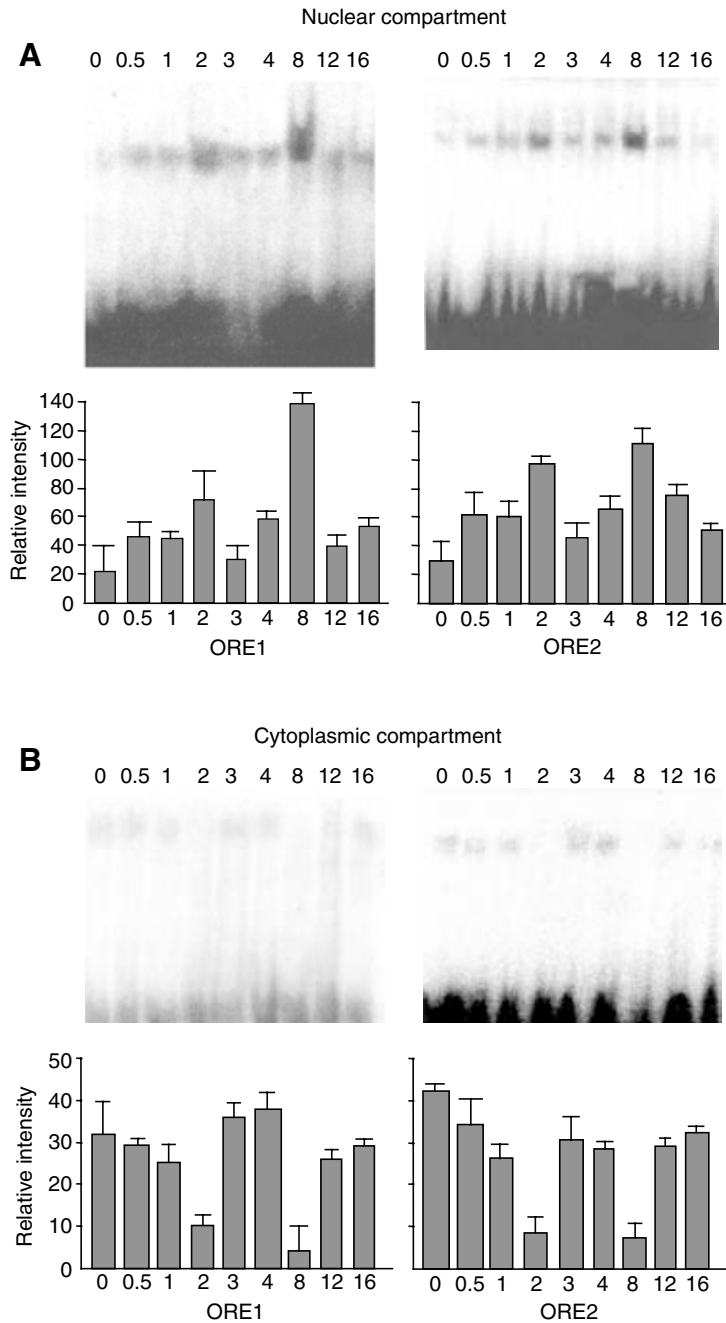


Fig. 2. *In vivo* time course of nuclear recruitment of a putative osmotic response element binding protein (OREBP) after hypo-osmotic stress. (A) Translocation (EMSA, using ORE1 and ORE2 oligonucleotides) of putative OREBPs into the nuclei, and (B) their corresponding disappearance from the cytoplasmic compartment. Protein–DNA binding occurred in a biphasic mode: an initial protein translocation 2 h after hypo-osmotic stress, and a second and more intense wave of recruitment 8 h post-challenge. Panels show representative gels from 4–6 replicates. Below each gel is the corresponding quantification (relative intensity; arbitrary units) of the complexes. Notice the difference in the scales for nuclei (A) and cytoplasmic (B) graphs. Values are means  $\pm$  s.e.m. of three separate quantifications. \* $P < 0.05$ .

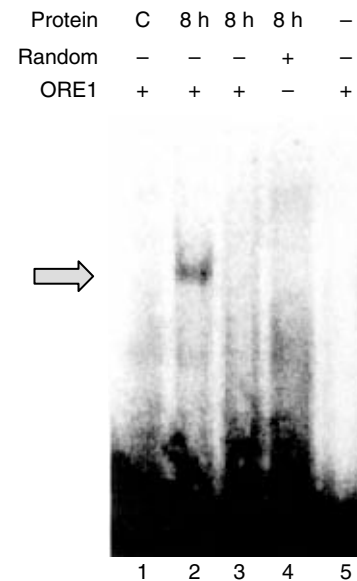


Fig. 3. Specific binding of nuclear proteins to ORE. The specificity of nuclear extracts to radiolabeled ORE1 binding under different experimental conditions is shown. Control (not challenged; column 1) and 8 h post *in vivo* hypo-osmotic stress (column 2); competitive displacement in the presence of a 100-fold excess of unlabeled ORE-1 oligonucleotide (column 3); formation of a nonspecific complex using a random oligonucleotide (column 4), and control without nuclear extract (column 5). The arrow shows the putative OREBP–ORE complex.

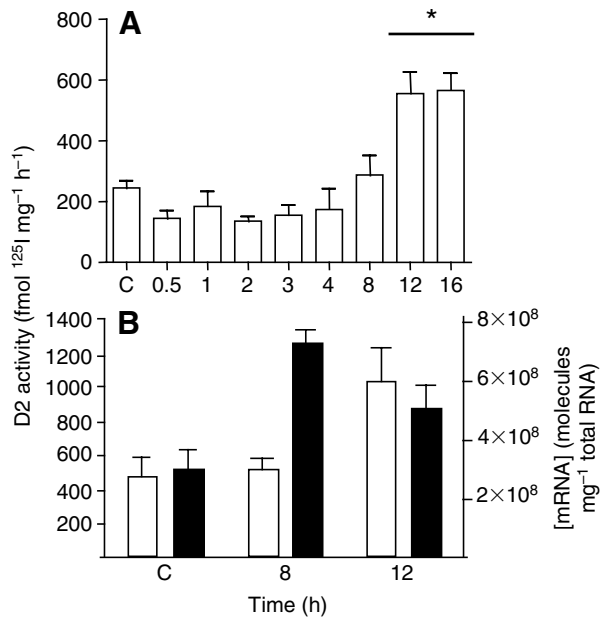


Fig. 4. Up-regulation of D2 mRNA and enzyme activity after hypo-osmotic stress. (A) D2 enzymatic activity from the *in vivo* time-course experiment. The increase in D2 activity became significant only 12 h after the osmotic challenge. (B) A separate set of experiments showing mRNA concentrations (filled bars) and D2 activity (open bars). The increase in mRNA precedes the corresponding rise in D2 activity, and attained maximum values 8 h after osmotic stress. For each panel, values are means  $\pm$  s.e.m. ( $N=10$ ) of two separate experiments, each in triplicate. \* $P<0.05$  vs control (C).

4 h. Fig. 6 shows that genistein blocked both OREBP-DNA binding and D2 activation. These data suggest the direct participation of a tyrosine kinase pathway in the putative OREBP activation and in the subsequent increase in D2 activity.

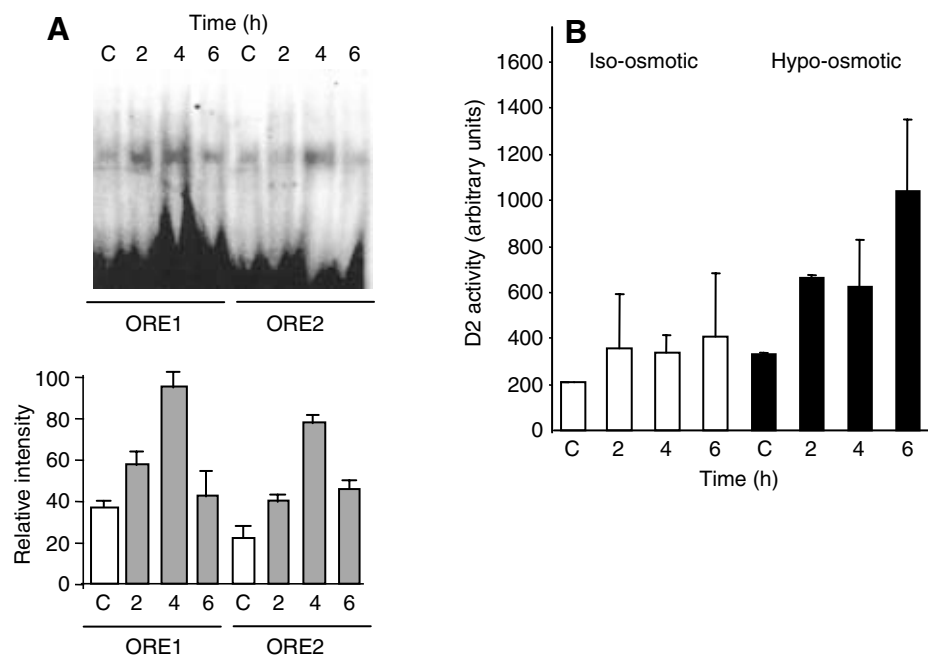


Fig. 5. *In vitro* temporal course of putative OREBP nuclear binding and D2 activity after hypo-osmotic challenge. To assess whether liver cells could detect and respond directly to osmotic changes, liver explants from seawater-adapted killifish were pooled and randomly distributed into iso-osmotic (control, C) or hypo-osmotic L-15 medium. (A) Temporal course of recruitment of putative OREBP into the nuclear compartment. Significant recruitment can be observed as early as 2 h after challenge and peaks at 4 h post-stress. The lower portion of A shows the quantification (relative intensity) of this response. (B) The associated increment in hepatic D2 activity (filled bars). Values are means  $\pm$  s.e.m. of four separate experiments, each in triplicate. \* $P<0.05$  vs control (open bars). Normalized D2 activity is expressed in arbitrary units (see Materials and methods).

## Discussion

This work confirms and extends previous preliminary results (Orozco et al., 1998) showing that killifish hepatic D2 increases during hypo-osmotic stress. Indeed, the present studies demonstrate that to cope with a sudden drop in salinity, the liver of killifish triggers a homeostatic response in which a putative OREBP kinase-activated pathway stimulates D2 transcription and enzymatic activity. Furthermore, the participation of this putative signaling pathway is strongly supported by the complete blockade of the response by a tyrosine kinase inhibitor.

In mammals it is well known that hyperosmotic stress activates diverse transcription factors, which in turn regulate key genes that maintain hydrosmotic homeostasis (Ferraris et al., 1999; Gatsios et al., 1998). However, in teleosts, less is known about this transcriptional regulation (Fiess et al., 2007). Moreover, despite the fact that euryhaline fish are constantly coping with osmoregulatory demands, available information about hypo-osmotic stress is even scarcer. Our results clearly demonstrate that in response to hypo-osmotic stress, at least one nuclear protein is recruited into the ORE sequence present in *FhDio2*. Accordingly, we call this protein a 'putative OREBP'. Studies regarding OREBP activation under hypotonicity have been scanty. Recently, *in vitro* studies have shown that the nucleocytoplasmic traffic of human OREBP is a dynamic, bi-directionally functional process. Whereas under isotonic conditions, OREBP is detected in nuclear and cytoplasmic compartments, it accumulates exclusively in the nucleus or cytoplasm when cells are subjected to hypertonic or hypotonic challenges, respectively (Tong et al., 2006). Previous results from our group agree with these findings, since they suggest the opposite pattern in the recruitment of putative OREBPs when rainbow trout (Orozco et al., 2002b) and tilapia (L.-B., unpublished observations) are transferred to seawater. These results, together with new findings (Tong et al., 2006), and the present results, support the proposal that the functional motifs

contained within the OREBP allow its bi-directional shuttling in response to extracellular osmolarity. It should be noted that at this stage, in contrast to mammals, our studies indicate that putative OREBP translocates into the nucleus during hypo-osmolarity. Clearly, further studies are necessary to fully elucidate the intimate mechanisms that regulate osmotic homeostasis in the different species, especially in those continuously exposed to environmental osmotic demands.

In contrast to the rapid osmolyte movement and the immediate gene transcription that characterize the acute response to osmotic stress (Pasantes-Morales et al., 2006), in the present study the course of events extends for 12 h after

challenge. Thus, the time frame of this response is relatively slow, but it coincides with the critical period for adaptation to a salinity change in the killifish (Marshall et al., 1999). Furthermore, within this time period, the present results document a series of events that culminate in providing hepatocytes with active TH. Indeed, both *in vivo* and *in vitro* experiments showed a sequential correlation between the peak in translocation of putative OREBP to the nucleus, the increase D2 transcription, and the subsequent rise in enzymatic activity.

Recently, the mammalian liver has been recognized as an important osmosensing and osmosignaling organ. Mammalian hepatocyte swelling or shrinkage triggers an array of intracellular transduction signals that are integrated with those that are hormone- and metabolic-dependant (for a review, see Schliess and Haussinger, 2006). In elasmobranch osmoregulation, the liver is the main provider of organic osmolytes including urea (Hazon et al., 2003). The osmoregulatory role of the teleostean liver has been less documented (Fiess et al., 2007). Osmoregulation is a highly expensive physiological process in terms of metabolic energy. In fish it has been suggested to require from 20% to 50% of the total energy expenditure, and is greater in freshwater than in seawater (Boef and Payan, 2001; Fiess et al., 2007). In addition to supplying glucose and organic osmolytes (Fiess et al., 2007), fish liver contains the largest pool of glutamine, which is the major source of ammonia as well as an important blood carrier for this nitrogenous waste product (for reviews, see Wood, 1993; Haberle et al., 2006). Two key enzymes involved in glutamine and ammonia metabolism are glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase, which interestingly, at least in mammals, are both TH-dependent (Doulabi et al., 2002). In this context it is paradoxical that the current dogma considers the role of TH in osmoregulation to be indirect. Indeed TH have been thought to support long-term adaptive responses mediated by growth hormone, prolactin and cortisol, among other classical osmoregulatory messengers (Sakamoto and McCormick, 2006). However, previous studies from our laboratory (Orozco et al., 1998; Orozco et al., 2002b) and recent studies in the seabream gill (Klaren et al., 2007), strongly suggest a more direct involvement of TH in the hydro-osmotic balance in fish. Furthermore, our present results support the suggestion that a putative hypo-osmotic, OREBP-mediated increase in hepatic D2 activity could be an important endocrine component for the maintenance of hydro-osmotic homeostasis in fish. Thus, we hypothesize that the local intra-hepatic  $T_3$  increase that follows D2 activation during hypo-osmotic stress may be instrumental for promote the hepatic synthesis of ammonia, providing ammonium as a counter-ion for sodium absorption in the gill (Salama et al., 1999).

In summary, this study examined the possible transcriptional regulatory role played by the ORE motifs in the 5' promoter region of *FhDio2* during hypo-osmotic stress. Together, the present results provide strong evidence for the involvement of a putative OREBP kinase-dependant pathway as an important regulatory signal for *FhDio2* transcription. To our knowledge, this is the first report that associates a response to hypo-osmotic stress with an ORE-regulated gene. The fact that this gene corresponds to the enzyme responsible for the local supply of intracellular  $T_3$  strongly suggests that, in addition to their

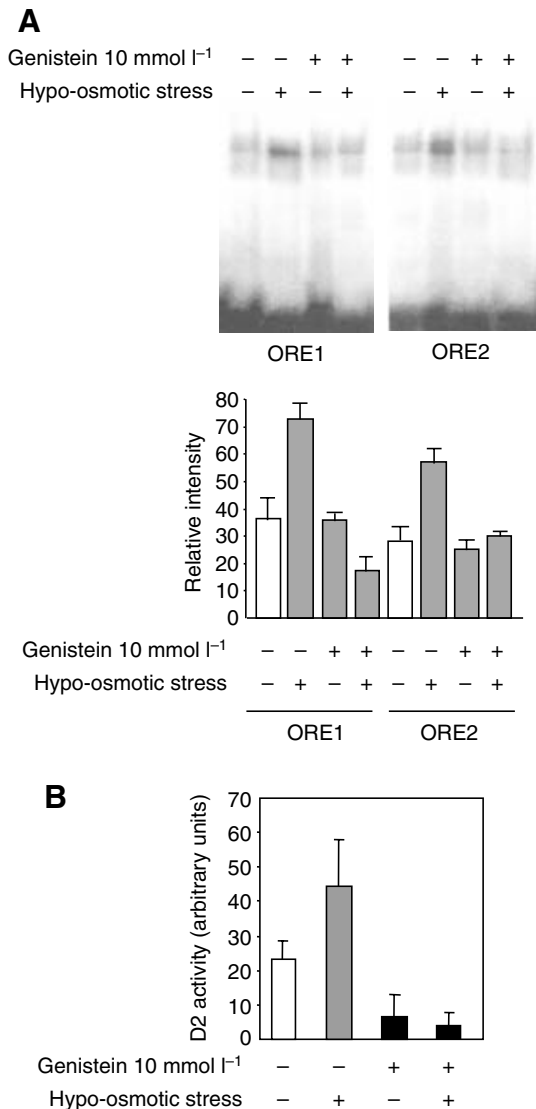


Fig. 6. (A) Genistein *in vitro* blocks nuclear translocation of putative OREBP. The drug prevents both the translocation of OREBP and the associated increase in D2 activity. Notice that even in those explants that were not challenged, genistein reduced both protein–DNA binding and enzyme activity. Lower portion of A shows the corresponding quantification (relative intensity) of the complexes. (B) The associated D2 activity (means  $\pm$  s.e.m. of three separate experiments, each in triplicate). Normalized D2 results are expressed in arbitrary units.

permissive action, TH may play a more direct role in osmoregulatory homeostasis in fish, possibly by participating in hepatic ammonia metabolism. These findings may provide a clue to understanding the physiological function of TH in hydro-osmotic homeostasis in fish.

This work was partially supported by grants CONACyT 37866N and PAPIIT- UNAM IN201202. We acknowledge Dr Anaïd Antaramián from the Proteogenomic Unit at INB. Thanks to Dr Carmen Aceves and Elvira Nuñez for kindly providing random oligonucleotides. The authors would like to express special thanks to Dr Dorothy Pless and Dr Humberto Gutierrez for critically reviewing the manuscript.

### References

- Anderson, G. W., Mariash, C. N. and Oppenheimer, J. H. (2000). Molecular actions of thyroid hormones. In *Werner and Ingbar's The Thyroid. A Fundamental and Clinical Text* (ed. L. E. Braverman and R. D. Utiger), pp. 174-195. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Boef, G. and Payan, P. (2001). How should salinity influence fish growth? *Comp. Biochem. Physiol.* **130C**, 411-423.
- Doulabi, B. Z., Platvoet-ter Schiphorst, M., van Beeren, H. C., Labruyere, W. T., Lamers, W. H., Fliers, E., Bakker, O. and Wiersinga, W. M. (2002). TRβ1 protein is preferentially expressed in the pericentral zone of rat liver and exhibits marked diurnal variation. *Endocrinology* **143**, 979-984.
- Ferraris, J. D., Williams, C. K. and Chung, K. Y. (1996). ORE, a eukaryotic minimal essential osmotic response element: The aldose reductase gene in hyperosmotic stress. *J. Biol. Chem.* **271**, 18318-18321.
- Ferraris, J. D., Williams, C. K., Ohtaka, A. and Garcia-Perez, A. (1999). Functional consensus for mammalian osmotic response elements. *Am. J. Physiol.* **276**, C667-C673.
- Ferraris, J. D., Persaud, P., Williams, C. K., Chen, Y. and Burg, M. B. (2002). cAMP-independent role of PKA in tonicity-induced transactivation of tonicity-responsive enhancer/osmotic response element-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 16800-16805.
- Fiess, J. C., Kunkel-Patterson, A., Mathias, L., Riley, L. G., Yancey, P. H., Hirano, T. and Grau, E. G. (2007). Effects of environmental salinity and temperature on osmoregulatory ability, organic osmolytes, and plasma hormone profiles in the Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Comp. Biochem. Physiol.* **146A**, 252-264.
- Fiol, D. F. and Kultz, D. (2005). Rapid hyperosmotic coinduction of two tilapia (*Oreochromis mossambicus*) transcription factors in gill cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 927-932.
- Fiol, D. F., Chan, S. Y. and Kultz, D. (2006). Regulation of osmotic stress transcription factor 1 (Ostf1) in tilapia (*Oreochromis mossambicus*) gill epithelium during salinity stress. *J. Exp. Biol.* **209**, 3257-3265.
- García-G., C., Jeziorski, M. C., Valverde-R., C. and Orozco, A. (2004). Effects of iodothyronines on the hepatic thyroid hormone activating pathway in killifish. *Gen. Comp. Endocrinol.* **135**, 201-209.
- Gatsios, P., Terstegen, L., Schliess, F., Haussinger, D., Kerr, I. M., Heinrich, P. C. and Graeve, L. (1998). Activation of the Janus kinase/signal transducer and activator of transcription pathway by osmotic shock. *J. Biol. Chem.* **273**, 22962-22968.
- Haberle, J., Gorg, B., Toutain, A., Rutsch, F., Benoist, J. F., Gelot, A., Suc, A., Koch, H. G., Schliess, F. and Haussinger, D. (2006). Inborn error of amino acid synthesis: human glutamine synthetase deficiency. *J. Inher. Metab. Dis.* **29**, 352-358.
- Hazon, N., Wells, A., Pillans, R. D., Good, J. P., Anderson, W. and Franklin, C. E. (2003). Urea based osmoregulation and endocrine control in elasmobranch fish with special reference to euryhalinity. *Comp. Biochem. Physiol.* **136B**, 685-700.
- Heinemeyer, T., Wingender, E., Reuter, I., Hermjakob, H., Kel, A. E., Kel, O. V., Ignatieva, E. V., Ananko, E. A., Podkolodnaya, O. A., Kolpakov, F. A. et al. (1998). Databases on transcriptional regulation: TRANSFAC, TRRD, and COMPEL. *Nucleic Acids Res.* **26**, 364-370.
- Janssens, P. and Grigg, J. A. (1994). Organ culture of fish tissues. In *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes: Analytical Techniques*, Vol. 3 (ed. P. W. Hochachka and T. P. Mommsen), pp. 375-386. Netherlands: Elsevier.
- Klaren, P. H., Guzmán, J. M., Reutelingsperger, S. J., Mancera, J. M. and Flik, G. (2007). Low salinity acclimation and thyroid hormone metabolizing enzymes in gilthead seabream (*Sparus auratus*). *Gen. Comp. Endocrinol.* **152**, 215-222.
- Kultz, D. (2003). Evolution of the cellular stress proteome: from monophyletic origin to ubiquitous function. *J. Exp. Biol.* **206**, 3119-3124.
- López-Bojórquez, L. N., Arechavaleta-Velasco, F., Vadillo-Ortega, F., Montes-Sánchez, D., Ventura-Gallegos, J. L. and Zentella-Dehesa, A. (2004). NF-κB translocation and endothelial cell activation is potentiated by macrophage-released signals co-secreted with TNF-α and IL-1β. *Inflamm. Res.* **53**, 567-575.
- Marshall, W. S., Emberley, T. R., Singer, T. D., Bryson, S. E. and McCormick, S. D. (1999). Time course of salinity adaptation in a strongly euryhaline estuarine teleost, *Fundulus heteroclitus*: a multivariable approach. *J. Exp. Biol.* **202**, 1535-1544.
- McCormick, S. D. (2001). Endocrine control of osmoregulation in teleost fish. *Integr. Comp. Biol.* **41**, 781-794.
- Orozco, A. and Valverde-R., C. (2005). Thyroid hormone deiodination in fish. *Thyroid* **15**, 799-813.
- Orozco, A., Linser, P. J. and Valverde-R., C. (1998). Salinity modifies hepatic outer ring deiodinating (ORD) activity in *Fundulus heteroclitus*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **839**, 409-411.
- Orozco, A., Linser, P. J. and Valverde-R., C. (2000). Kinetic characterization of outer-ring deiodinase activity (ORD) in the liver, gill and retina of *Fundulus heteroclitus*. *Comp. Biochem. Physiol.* **126B**, 283-290.
- Orozco, A., Jeziorski, M., Linser, P. J., Greenberg, R. M. and 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. and Valverde-R., C. (2002b). Environmental salinity selectively modifies the outer-ring deiodinating activity of liver and kidney in the rainbow trout. *Comp. Biochem. Physiol.* **131A**, 387-395.
- Pasantes-Morales, H., Lezama, R. A., Ramos-Mandujano, G. and Tuz, K. L. (2006). Mechanisms of cell volume regulation in hypo-osmolality. *Am. J. Med.* **119**, S4-S11.
- Pazos-Moura, C. C., Moura, E. G., Dorris, M. L., Rehnmark, S., Melendez, L., Silva, J. E. and Taurog, A. (1991). Effect of iodine deficiency and cold exposure on thyroxine 5'-deiodinase activity in various rat tissues. *Am. J. Physiol.* **260**, E175-E182.
- Sakamoto, T. and McCormick, S. D. (2006). Prolactin and growth hormone in fish osmoregulation. *Gen. Comp. Endocrinol.* **147**, 24-30.
- Salama, A., Morgan, I. J. and Wood, C. M. (1999). The linkage between Na<sup>+</sup> uptake and ammonia excretion in rainbow trout: kinetic, analysis, the effect of (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> infusion and the influence of gill boundary layer pH. *J. Exp. Biol.* **202**, 697-709.
- Schliess, F. and Haussinger, D. (2006). Osmosensing and signaling in the regulation of liver function. *Contrib. Nephrol.* **152**, 198-209.
- Tong, E. H., Guo, J., Huang, A., Liu, H., Hu, C. D., Chung, S. S. and Ko, B. (2006). Regulation of nucleocytoplasmic trafficking of transcription factor OREBP/TonEBP/NFAT5. *J. Biol. Chem.* **281**, 23870-23879.
- Wood, C. M. (1993). Ammonia and urea metabolism and excretion. In *The Physiology of Fishes* (ed. D. H. Evans), pp. 379-425. Florida: CRC Press.