



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

REGULACIÓN DIFERENCIAL DE LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN DE T3 Y 3,5-T2  
EN EL CRECIMIENTO DE TELEÓSTEOS

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

PRESENTA:  
PAMELA NAVARRETE RAMÍREZ

TUTOR PRINCIPAL  
DRA. AUREA OROZCO RIVAS  
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR  
DRA. MARICELA LUNA MUÑOZ  
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA  
DR. ALEJANDRO CÓRDOBA AGUILAR  
INSTITUTO DE ECOLOGÍA

QUERÉTARO, QRO. MÉXICO 2014



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.

## ÍNDICE

|   |    |
|---|----|
| Resumen                                     | 3  |
| Abstract                                    | 4  |
| 1. Introducción                             | 5  |
| 2. Antecedentes                             | 6  |
| 2.1 Crecimiento en peces                    | 6  |
| 2.2 Las Hormonas Tiroideas                  | 7  |
| 2.2.1 Efectos                               | 7  |
| 2.2.2 Efectos sobre el crecimiento          | 9  |
| 2.3 Mecanismo de acción de las THs          | 10 |
| 2.3.1 Metabolismo de THs                    | 10 |
| 2.3.2. Los Receptores de Hormonas Tiroideas | 12 |
| 2.3.3. Mecanismo de Acción de los TR        | 14 |
| 2.3.4. Regulación de los TR                 | 16 |
| 3. Antecedentes Específicos                 | 17 |
| 3.1. Bioactividad de T2                     | 18 |
| 3.1.1. Efectos no genómicos                 | 18 |
| 3.1.2. Efectos genómicos                    | 19 |
| 3.1.3. Mecanismos de acción genómicos       | 20 |
| 4. Planteamiento del problema               | 23 |
| 4.1. Justificación                          | 23 |
| 4.2. Objetivo General                       | 23 |
| 4.2.1. Objetivos específicos                | 23 |
| 5. Materiales y Métodos                     | 24 |
| 5.1. Diseño experimental                    | 24 |
| 5.1.1. In vivo                              | 24 |
| 5.1.2. Ex vivo                              | 24 |

|   |    |
|---|----|
| 5.2 Extracción de TH                        | 25 |
| 5.3 RIA para T3                             | 25 |
| 5.4 Cuantificación de la expresión del mRNA | 26 |
| 5.5 Análisis estadístico                    | 27 |
| 6. Resultados                               | 27 |
| 7. Discusión                                | 28 |
| 8. Conclusiones                             | 31 |
| 9. Referencias                              | 32 |

## RESUMEN

Los estudios realizados en nuestro laboratorio han demostrado que en algunos teleósteos, la 3,5-diyodotironina (T2) es tan bioactiva como la triyodotironina (T3) en la regulación de la transcripción de genes T3-dependientes y que sus efectos son en parte mediados por una isoforma del receptor de hormonas tiroideas  $\beta 1$  (TR $\beta 1$ ) que contiene un inserto de 9 aminoácidos en su dominio de unión al ligando [TR $\beta 1$  largo (L-TR $\beta 1$ )], mientras que T3 se une preferentemente a la isoforma corta de TR $\beta 1$  (S-TR $\beta 1$ ) que carece de este inserto. Estos resultados sugieren que T2 es una hormona tiroidea que puede desempeñar un papel fisiológico importante en peces. Para entender mejor la relevancia funcional de la bioactividad de T2 y su mecanismo de acción, se utilizaron dos enfoques: *in vivo* y *ex vivo* (cultivos organotípicos de hígado) y analizamos si T3 y T2 regulan diferencialmente a S-TR $\beta 1$  y L-TR $\beta 1$  durante una demanda fisiológica como el crecimiento. *In vivo*, el tratamiento con T3 y T2 induce el aumento de peso corporal en tilapia. La expresión de los mRNAs de D2 e IGF-1 disminuyó y aumentó, respectivamente, por el tratamiento con T3 y T2. Interesantemente, las isoformas de TR $\beta 1$  fueron reguladas de manera diferente, L-TR $\beta 1$  fue regulada específicamente por T2 y S-TR $\beta 1$  por T3, tanto *in vivo* como *ex vivo*. Para profundizar en el mecanismo de acción de las respuestas observadas, se utilizó el antagonista de TRs 1-850, el cual bloqueó eficientemente la expresión de genes dependientes de T3. Sin embargo, tanto T3 como T2 invirtieron los efectos de 1-850, pero sólo en la expresión de S-TR $\beta 1$  y L-TR $\beta 1$ , respectivamente. El hecho de que las isoformas de TR $\beta 1$  de teleósteos sean diferencialmente reguladas por T3 y T2 sugiere que otro grupo de genes pudiera ser modulado de manera diferente por cada yodotironina en un contexto fisiológico específico. En conjunto, nuestros resultados apoyan la noción de que T3 y T2 participan en el proceso de crecimiento de tilapia a través de una vía de señalización diferente.

## ABSTRACT

Studies in our laboratory have shown that in some teleosts, 3,5-diiodothyronine (T2) is as bioactive as triiodothyronine (T3) in regulating the transcription of T3-dependent genes and that its effects are in part mediated by a thyroid hormone receptor  $\beta$ 1 (TR $\beta$ 1) isoform that contains a 9-amino acid insert in its ligand-binding domain [long TR $\beta$ 1 (L-TR $\beta$ 1)], whereas T3 binds preferentially to the short TR $\beta$ 1 (S-TR $\beta$ 1) isoform that lacks this insert. These results suggest that T2 is a bioactive thyroid hormone that could play an important physiological role in fish. To further understand the functional relevance of T2 bioactivity and its mechanism of action, we used *in vivo* and *ex vivo* (organotypic liver cultures) approaches and analyzed whether T3 and T2 differentially regulate S-TR $\beta$ 1 and L-TR $\beta$ 1 during a physiological demand such as growth. *In vivo*, T3 and T2 treatments induced body weight gain in tilapia. The expression of D2 and IGF-1 mRNAs were decreased and increased respectively by T3 and T2 treatment. Interestingly the TR $\beta$ 1 isoforms were regulated differently, L-TR $\beta$ 1 was specifically regulated by T2 and S-TR $\beta$ 1 by T3 *in vivo* as well as *ex vivo*. To further analyze the action mechanism in the observed responses, we used the TR antagonist 1-850, which effectively blocked thyroid hormone-dependent gene expression; however, T3 or T2 reversed 1-850 effects only on S-TR $\beta$ 1 or L-TR $\beta$ 1 expression, respectively. The fact that teleost TR $\beta$ 1 isoforms are differentially regulated by T3 and T2 suggests that other set of genes may be modulated differently by each iodothyronine in a specific physiological context. Together, our results support the notion T3 and T2 participate in tilapia growth through a different signaling pathway.

## 1. INTRODUCCIÓN

Las hormonas tiroideas (THs) son mensajeros endocrinos yodados que juegan un papel determinante en los procesos de crecimiento y desarrollo en prácticamente todos los vertebrados. La tiroxina es el principal producto de secreción de la glándula tiroides; sin embargo, la principal hormona tiroidea bioactiva es la triyodotironina, la cual se une con alta afinidad y especificidad a los receptores nucleares de hormonas tiroideas (TRs), y por lo tanto se ha considerado como la responsable de la mayoría de los efectos biológicos de las THs. Los TRs modulan positiva ó negativamente la expresión de los genes T3-responsivos, según el gen, el tejido y la etapa del desarrollo del organismo y son en gran parte responsables de la pleiotropía funcional de las hormonas tiroideas (Ferreira Azevedo et al. 2008; Orozco y Valverde-R 2005; Muñoz y Bernal 1997; Fondell 2013).

Recientemente se ha planteado que algunos ligandos alternativos pueden ejercer funciones específicas a través de receptores nucleares; en este contexto, en nuestro grupo de trabajo se ha propuesto que la 3,5-diyodotironina (3,5-T2 o T2) una yodotironina generada de la desyodación de la T3, es una hormona tiroidea bioactiva que podría actuar como un ligando de los TR, al menos en teleósteos. En efecto, estudios recientes realizados en nuestro laboratorio han demostrado que en algunas especies de peces, T2 es tan bioactiva como T3 y que sus efectos son en parte mediados por una isoforma de TR $\beta$ 1 que contiene un inserto de 9 aminoácidos en su dominio de unión a ligando [TR $\beta$ 1 largo (L-TR $\beta$ 1)], mientras que la T3 se une preferentemente a la isoforma corta de TR $\beta$ 1 (S-TR $\beta$ 1) que carece de este inserto (Mendoza et al. 2013). Estos hallazgos sugieren la presencia de dos vías de señalización de THs mediadas por el TR $\beta$ 1 corto ligado a T3 y el TR $\beta$ 1 largo ligado a T2.

En la presente tesis hemos extendido estos estudios analizando la regulación de estas dos vías de señalización; para ello utilizamos el paradigma del

crecimiento. Se trata de una demanda fisiológica en la cual se ha postulado que las THs forman parte de la red endócrina que la regula. Este proceso es muy complejo y está determinado por la interacción entre factores exógenos o epigenéticos y factores endógenos como las respuestas adaptativas del sistema neuroendocrino del organismo. Por lo tanto y con la finalidad de entender mejor la relevancia funcional de T2 y su mecanismo de acción hemos utilizado dos enfoques experimentales: *in vivo* y *ex vivo* (cultivos organotípicos de hígado de tilapia) y analizamos si T3 y T2 diferencialmente regulan al S-TR $\beta$ 1 y al L-TR $\beta$ 1 durante una demanda fisiológica como el crecimiento.

## **2. ANTECEDENTES**

### **2.1. Crecimiento en peces**

El crecimiento es un proceso biológico complejo y multifactorial que está determinado principalmente por factores internos (genéticos y endocrinos) y por factores externos o ambientales de naturaleza biótica y abiótica. En los peces y de manera general en vertebrados, el crecimiento del individuo refleja el balance entre dos procesos opuestos: catabolismo y anabolismo, y está influido por diferentes factores y señales externas que incluyen, entre otras, la disponibilidad de alimento, el fotoperiodo, el ciclo estacional y la temperatura. En el caso de los peces, se considera que la temperatura y el fotoperiodo son probablemente los factores extrínsecos más importantes que afectan su crecimiento y desarrollo.

Aún cuando en la regulación del crecimiento en peces participan diversos factores y/o estímulos externos, estos son procesados por el sistema nervioso central e integrados por el sistema endocrino. Así, el crecimiento está bajo el control endocrino que involucra la acción directa o indirecta de varias hormonas; entre las más importantes se encuentran la hormona de crecimiento (GH), la insulina, los factores de crecimiento insulinoideos (IGFs) y las hormonas tiroideas (THs) (MacKenzie et al. 1998; Pérez-Sánchez y Le Bail, 1999; Mommsen, 2001).

Cada una de estas hormonas son indispensables para el aumento en el tamaño y número celular.

## **2.2. Las Hormonas Tiroideas.**

Las THs son una familia de mensajeros endocrinos que se distinguen por contener átomos de yodo en su molécula. Las THs participan en distintos procesos biológicos para mantener un estado general de bienestar actuando -de manera directa o en cooperación con otras hormonas- en prácticamente todos los tejidos del organismo de los vertebrados.

### **2.2.1. Efectos.**

Las acciones de las THs abarcan una amplia gama de funciones 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 conducta migratoria en las aves y el balance metabólico, el consumo de oxígeno y la calorígenes en aves y mamíferos (revisado en: Orozco et al. 2012; Solis-S et al. 2011).

Las THs son sintetizadas y secretadas a la circulación por la glándula tiroides. La tiroxina o T4 es el principal producto de secreción de ésta glándula, sin embargo, la triyodotironina o T3 es la hormona a la que se le atribuyen la mayoría de los efectos biológicos de las THs debido a que es hasta 100 veces mas afín a los TRs que la T4. Los TRs modulan la expresión de los genes T3-responsivos en ambos sentidos, positiva ó negativamente, según el gen blanco, el tejido y la etapa del desarrollo del organismo, además de ser responsables de la pleiotropía funcional de las THs (Ferreira Azevedo et al. 2008; Orozco y Valverde-R, 2005; Muñoz y Bernal, 1997; Fondell, 2013).

Específicamente en peces, las THs participan en diferentes aspectos de su fisiología, como son la maduración sexual, la osmoregulación y la conducta migratoria. También se ha documentado su papel crucial en el desarrollo temprano, el metabolismo, el crecimiento somático, la pigmentación de la piel, entre otros (Dickhoff et al. 1978; Janz, 2000; Power et al. 2001; Orozco y Valverde, 2005; Raine, 2011; Yamano, 2005).

De los efectos de THs mejor documentados en peces son los asociados a procesos de metamorfosis. Durante su desarrollo, los peces planos sufren una transformación metamórfica durante el desarrollo que es regulada directamente por las THs. Estos peces se transforman de una simetría bilateral a una asimetría bentónica. Cambios importantes a nivel conductual, fisiológico y morfológico tienen lugar en estos peces durante la metamorfosis y este proceso puede ser estimulado con el tratamiento exógeno de TH, o inhibido con la adición de goitrógenos, fármacos que inhiben la producción endógena de estas hormonas (Miwa y Inui, 1987; Power et al. 2001).

Las THs también pueden desempeñar un papel en otras etapas del desarrollo de peces que no sufren una metamorfosis tan evidente, pero que implican cambios sustanciales en su morfología, comportamiento, y fisiología (Hoar, 1988; Lam, 1994; Leatherland, 1994; Power et al. 2001.; Campinho et al. 2007). Estos incluyen la transición de la etapa embrionaria a la etapa larval en donde dichas larvas se alimentan exclusivamente de las reservas del saco vitelino que contiene THs de origen materno; la transición a la etapa juvenil, así como la esmoltificación. Esta última ocurre primordialmente en salmónidos y comprende una serie compleja de cambios bioquímicos, morfológicos y conductuales que preadaptan al individuo para la fase marina de su ciclo de vida. Así, se ha descrito que las THs parecen facilitar la adaptación del pez al medio ambiente marino, y en especies migratorias favorecen la preferencia por este medio (Björnsson et al. 2012; Norris, 1985). En consecuencia, la alteración en la síntesis y/o la secreción de las THs en

cualquier etapa del desarrollo de larvas y juveniles tiene importantes consecuencias en su viabilidad (Power et al. 2001).

### **2.2.2. Efectos sobre el crecimiento.**

En todos los vertebrados, las hormonas tiroideas son esenciales para el crecimiento. El hipotiroidismo resulta en un importante retardo en dicho proceso tanto en especies endotérmicas como el humano (Snyder, 2000), la rata (Evans et al. 1966; Soukup et al. 2001), y la zarigüeya (Buaboocha y Gemmell, 1996), así como en especies ectotérmicas como la lagartija (Gerwien y John-Alder, 1992), la tortuga (Denver y Licht, 1991) y algunas especies de peces (Matty, 1985).

Para el caso específico de peces, se ha observado que el tratamiento por inmersión con THs acelera, en algunas especies, el crecimiento corporal así como la diferenciación de aletas presentando un efecto positivo en la supervivencia (Revisado en: Power et al. 2001). En contraste la disrupción del eje tiroideo en peces planos detiene la metamorfosis, así como reduce el desarrollo y la tasa de crecimiento en otras especies como el pez cebra (Brown, 1997; Gavlik et al. 2002; Inui y Miwa, 1985; Liu y Chan, 2002; Schreiber y Specker, 1998; Trijuno et al. 2002).

El retardo en el crecimiento tanto en peces como en mamíferos puede ser el resultado de la reducción en la expresión de la GH (Snyder, 2000), esto debido a la acción regulatoria a nivel genómico de las THs sobre la GH, ya que el gen que codifica para esta hormona presenta un elemento responsivo a THs (TRE) en su promotor (Koenig et al. 1987; Lavin et al. 1988; Norman et al. 1989; Sap et al. 1990). Además, las hormonas tiroideas tienen efectos sobre el factor de IGF-1, que es el mediador de algunos de los efectos anabólicos y mitogénicos de la GH. De este modo, el estado tiroideo modula la concentración tanto de GH como del IGF-1, así como su bioactividad y la concentración de las proteínas transportadoras (Biga y Meyer, 2009; Miell et al. 1993; Schmid et al. 2003).

## **2.3. Mecanismo de acción de las THs**

### **2.3.1. Metabolismo de THs**

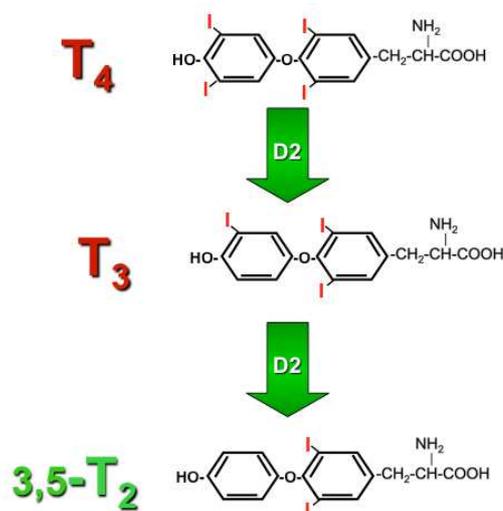
Como ya se mencionó, la glándula tiroides sintetiza y secreta principalmente T4, la cual se considera una prohormona ya que es activada o inactivada a través de un proceso enzimático finamente regulado y que ocurre en prácticamente todas las células del organismo, denominado desyodación. De esta manera, la desyodación del anillo externo de la T4 resulta en la formación de T3, la cual presenta mayor afinidad que la T4 a los receptores de hormonas tiroideas, y por lo tanto se ha considerado como responsable de la mayoría de los efectos biológicos de las THs.

La desyodación de las yodotironinas está catalizada por una familia de selenoproteínas denominadas genéricamente desyodasas (Ds). Estas enzimas contienen el aminoácido modificado selenio-cisteína en el sitio activo. Se conocen 3 isotipos enzimáticos que difieren en sus características bioquímicas y en su distribución tisular. Así, la D1 es una enzima que desyoda a la T4 en ambos anillos, externo e interno, formando, T3 o rT3, es decir, la D1 es capaz tanto de activar como de inactivar a la T4. Esta enzima se expresa principalmente en órganos que reciben un gasto cardíaco elevado como el hígado, el riñón y la propia glándula tiroides. La D2 únicamente desyoda el anillo externo de la yodotironina, es decir, es una enzima que exclusivamente activa a la T4. Su expresión basal es muy baja y ocurre principalmente en el sistema nervioso central y la hipófisis. La D3 es una enzima que únicamente desyoda el anillo interno de la yodotironina, es decir, a la T4 la convierte en rT3, y a la T3 en 3,3'-T2. La D3 se expresa principalmente en sistema nervioso central, piel y placenta (Bianco y Larsen, 2005; Gereben et al. 2008; Hulbert, 2000).

La desyodación juega un papel crucial pues a través de ella se regula el estado tiroideo intracelular. Es importante resaltar que de las tres enzimas, la D2 y la D3

tienen un mayor impacto funcional. La D3 inactiva a la T4 y a la T3, por lo que se le ha atribuido una función protectora ante un exceso de hormona activa, mientras que la D2 es una enzima de autoconsumo, ya que la T3 resultante de la reacción de desyodación ingresa al núcleo en donde se une a los TRs. Estas dos enzimas están finamente reguladas por el estado tiroideo, por lo tanto, discretos cambios en las concentraciones intracelulares de THs modifican tanto la actividad de las proteínas como la expresión de sus mRNAs (Revisado en: Gereben et al. 2008).

Por otro lado, la desyodación secuencial del anillo externo de la T3 da lugar a la 3,5-T2 (T2), TH a la que también se le ha descrito bioactividad y que es, como se describirá más adelante, la molécula central de estudio en la presente tesis (**Figura 1**), (Horst et al. 1989; Moreno et al. 1998, 2002; Goglia, 2005; García-G et al. 2004, 2007; Mendoza et al. 2013).



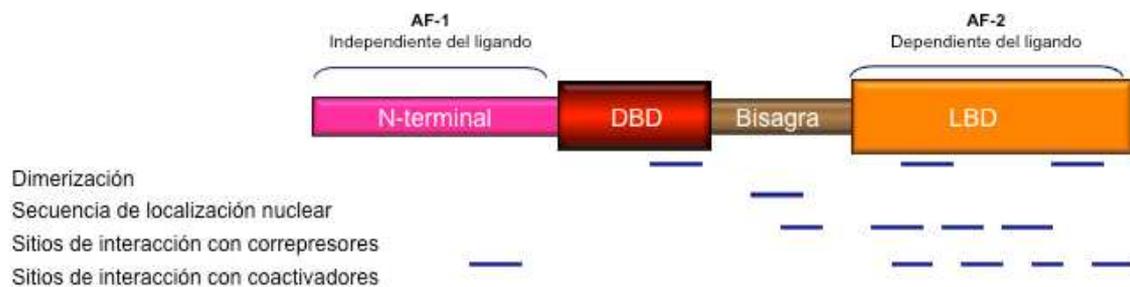
**Figura 1. Hormonas Tiroideas Bioactivas.** Se muestra la desyodación secuencial de la prohormona T4, catalizada por la desyodasa tipo 2 (D2) y la generación de las THs bioactivas: T3 y T2.

### 2.3.2. Los Receptores de Hormonas Tiroideas.

Los efectos de las THs están mediados principalmente a través de receptores específicos que forman parte de la familia de receptores nucleares (NRs). En el genoma humano se han identificado 48 miembros de esta familia que incluye, entre otros, a los receptores de hormonas tiroideas (TRs), de esteroides (PR, AR, ER, etc.), de vitamina D (VDR), de retinoides (RXR, RAR) y los de proliferadores activados por peroxisomas (PPAR). Entre las características de los NRs está la de regular la transcripción génica a través de su reconocimiento y unión a una secuencia específica del DNA localizada en la región promotora de los genes blanco y que en el caso específico de las THs, se denomina TRE por sus siglas en inglés "T3-responsive element". La secuencia idealizada o consenso de un TRE es el hexámero (G/A)GGT(C/G)A, el cual representa un medio sitio al que se puede unir un TR, sin embargo, el arreglo más común de los TRE es de dos medios sitios los cuales pueden variar en su orientación y espaciamiento. Se han descrito al menos tres arreglos distintos de TRE: el palindrómico (PAL), el repetido directo 4 (DR4) y el palindrómico invertido (IP). Dichos medios sitios son ocupados por los receptores ya sea formando monómeros, homodímeros o incluso como heterodímeros preferentemente con el RXR. El heterodímero TR-RXR es más estable, confiere especificidad y selectividad de unión al TRE, además de favorecer el reclutamiento de una combinación distinta y/o específica de corre reguladores para inducir la transcripción dependiente de T3 (Takeshita et al. 1998; Li et al. 2002; Castillo et al. 2004; Cheng et al. 2010).

Como el resto de los NRs, los TRs presentan una estructura característica en la que se han identificado distintos dominios funcionales (**Figura 2**). Estos comprenden un dominio amino-terminal (**NT**) necesario para la unión de proteínas corre reguladoras y la inducción de transactivación independiente del ligando (**L**); un dominio de unión al DNA (**DBD**) que contiene dos dedos de zinc esenciales para su unión con TRE (Helsen et al. 2012); una región bisagra (**H**) que contiene la señal de localización nuclear del receptor y que participa en la dimerización del mismo, y un dominio carboxilo-terminal que une al ligando (**LBD**) y al cual también

se asocian proteínas correguladoras y que es necesario para la dimerización del receptor. Además, se han descrito dos regiones reguladoras denominadas “función de activación” 1 y 2 (AF1 y AF2, por sus siglas en inglés). La **AF1** se localiza en el dominio NT y participa en la regulación intrínseca del TR a través de modificaciones post-traduccionales, mientras que la **AF2** forma parte del LBD y regula la transactivación ligando-dependiente del TR (Revisado por Oetting y Yen, 2007; Solis-S et al. 2011).

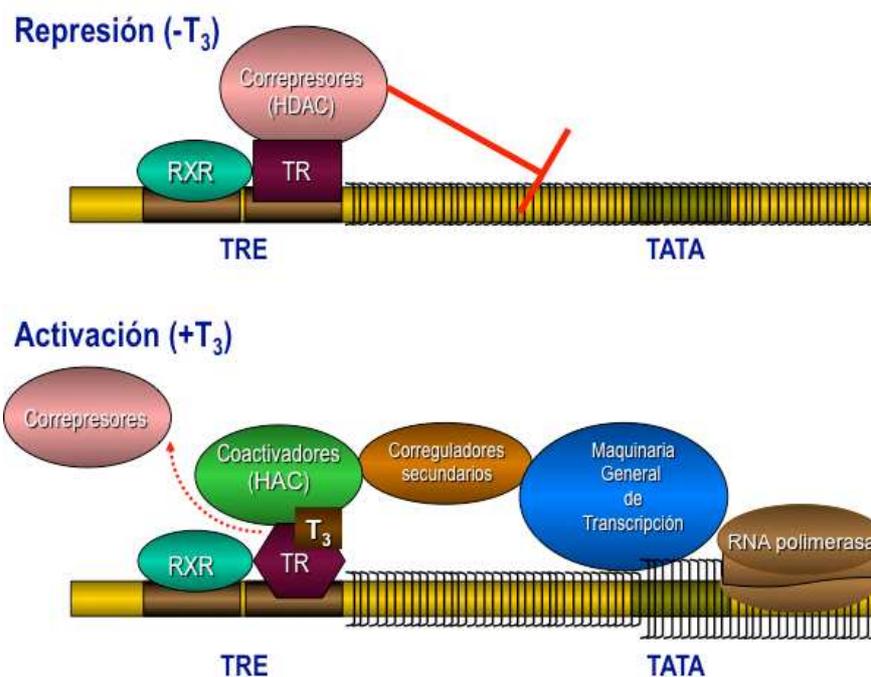


**Figura 2. Estructura General de los TR y la Función Principal de sus Dominios.** Se indican las regiones involucradas en las diferentes funciones del receptor. Abreviaturas, por sus siglas en inglés: AF: Activating Function; DBD, DNA-Binding Domain; LBD, Ligand-Binding Domain. (Modificado de: Solis-S et al. 2011).

Los TRs están codificados por dos genes distintos, el *THRA* y el *THRB*, cuya transcripción resulta en 4 diferentes mRNAs para cada gen. Sin embargo, la traducción de estos mensajeros resulta principalmente en 4 receptores funcionales: TR $\alpha$ 1, TR $\alpha$ 2, TR $\beta$ 1 y TR $\beta$ 2. Estos receptores presentan una distribución tejido-específica: la expresión de TR $\alpha$ 1 y TR $\beta$ 1 es ubicua, mientras que el TR $\beta$ 2 se expresa principalmente en la hipófisis, en las neuronas hipotalámicas productoras de TRH, en el oído interno en desarrollo y en la retina. Por último, el TR $\alpha$ 2 es un receptor que no une T3 por lo que se considera un aporeceptor que se expresa principalmente durante el desarrollo del sistema nervioso central (Yen, 2001; Oetting y Yen, 2007).

### 2.3.3. Mecanismo de Acción de los TR

Los TRs pueden regular la transcripción génica al estar unidos al TRE en presencia o no de T3. Así, uno de los mecanismos de acción de las THs involucra la regulación positiva de la transcripción basal activada por el complejo TR-T3, la cual es reprimida cuando el TR no está unido a la hormona. En otros casos, la unión de la T3 a su receptor puede reprimir la transcripción génica. A la fecha, los mecanismos de regulación transcripcional por THs mejor analizados son aquellos en los que estas hormonas regulan positivamente al gen blanco. Numerosos estudios han mostrado que en la ausencia de THs, los TRs se unen a los TRE y reprimen la transcripción basal de los genes regulados positivamente por las THs. Esta represión basal está mediada por proteínas correpressoras que interactúan con los TRs, como NCoR (del inglés: nuclear receptor corepressor) y SMRT (del inglés: silencing mediator for RAR and TR), las cuales interactúan preferencialmente con TRs no ligados. El NT de ambos NCoR y SMRT reclutan una variedad de complejos de desacetilasas de histonas (HDAC) lo que resulta en la hipoacetilación de las histonas locales y una cromatina con estructura represora de la transcripción (Fondell, 2013). Al unir a T3, el motivo helicoidal conservado ( $\alpha$ -hélice 12) localizado en el dominio AF2 C-terminal sufre un cambio conformacional significativo, lo cual desencadena una serie de procesos que incluyen la liberación de los correpresores y el reclutamiento de coactivadores y otras proteínas. De manera muy general, por lo menos dos complejos proteínicos principales están asociados a la transcripción dependiente de ligando en los TRs: los coactivadores primarios, los cuales interactúan directamente con el TR y remodelan la estructura de la cromatina a través de distintas modificaciones post-traduccionales *i.e.*, acetilación, metilación, ubiquitinación, etc.; los coactivadores secundarios que forman puentes funcionales entre el TR y el complejo estable de la RNA polimerasa II para así regular la transcripción del gen TH-dependiente. Los mecanismos precisos involucrados en la regulación de la expresión de los genes blanco de TH aún no han sido totalmente elucidados (**Figura 3**) (Revisado en: Cheng et al. 2010; Solís-S et al. 2011).



**Figura 3. Modelo de Represión y Activación Transcripcional de los Receptores a Hormonas Tiroideas en la Ausencia o Presencia de T<sub>3</sub>.** Detalles en el texto. Abreviaturas, por sus siglas en inglés: HDAC, histone deacetylase; HAC, histone acetylase; RXR, retinoid X receptor; TR, thyroid hormone receptor; TRE, thyroid hormone responsive element. (Modificado de: Solis-S et al. 2011).

Se ha postulado que la pluralidad o pleiotropía funcional de la T<sub>3</sub> podría estar regulada por isoformas específicas de los TR. Así, estudios de mutagénesis dirigida en ratones han mostrado que mientras el TR $\alpha$ 1 regula procesos asociados a la termogénesis y al metabolismo de grasas, el TR $\beta$ 1 es el mediador principal de las acciones relacionadas a la diferenciación celular, el desarrollo y la homeostasis metabólica. En el humano, mutaciones puntuales en la región codificante del LBD del gen *THRB* generan una enfermedad genética denominada “resistencia a hormonas tiroideas” (RTH); en la cual los pacientes presentan niveles circulantes elevados de T<sub>3</sub> y un fenotipo de estatura y peso bajos, entre otras características. Los TR $\beta$ 1 mutados de los pacientes con RTH no unen T<sub>3</sub> ni presentan actividad de transactivación (Cheng et al. 2010). Estos datos sugieren que cada isoforma de TR y/o la combinación en la que se expresan en los distintos tejidos, podrían desempeñar un papel importante en la diversidad de procesos finamente regulados por las THs. En este contexto, existe evidencia que indica que la

selectividad funcional de las isoformas de TR $\alpha$  y  $\beta$  podría ser dependiente de su asociación con correguladores específicos. Hasta la fecha se han identificado más de 350 correguladores, algunos de los cuales se sabe interaccionan con los TRs e incrementan la transcripción dependiente de T3, sin embargo, se desconoce su función dentro de los complejos transcripcionales (Cheng et al. 2010; Solís-S et al. 2011; NURSA).

#### **2.3.4. Regulación de los TR**

La regulación de los genes que codifican para los TRs está dada por múltiples factores que modulan la expresión de cada isoforma. Sin embargo, el principal modulador de su expresión es el propio ligando. Durante la ontogenia de distintos vertebrados se ha observado un incremento de T4 y/o T3 circulante acompañado paralelamente con un aumento en la expresión de los TRs. Como se mencionó antes, el desarrollo de los vertebrados está estrechamente relacionado con la presencia de las THs y su depleción farmacológica [metimazol (MMI)] impacta la expresión de los TRs, afectando el funcionamiento normal del organismo tanto en la ontogenia como en la vida adulta.

Estudios en peces muestran que el tratamiento con dosis suprafisiológicas de THs reprimen la expresión de los TR mientras que el hipotiroidismo farmacológico (MMI) aumenta su expresión y el co-tratamiento con MMI+THs previene el efecto del hipotiroidismo farmacológico inducido por el goitrógeno. (Galay-Burgos et al. 2008; Das et al. 2010; Williams, 2008; García-G et al. 2007; Kawakami et al. 2008). En humanos se han caracterizado elementos de respuesta a hormonas tiroideas en el gen *THRB* lo cual explica el efecto del ligando sobre la expresión del receptor (Sakurai et al. 1992).

En procesos fisiológicos más complicados como la metamorfosis en anfibios y peces planos, la expresión de TR $\beta$  aumenta cuando los niveles de hormonas

tiroideas aumentan, siendo auto-regulado a través de un asa positiva que asegura la coordinación entre el aumento de las hormonas tiroideas y la sensibilidad de los tejidos blanco. El aumento en la expresión de TR $\beta$  es, por lo tanto, el marcador más obvio del inicio de la metamorfosis (Baker y Tata, 1990; Machuca et al. 1995; Shi et al. 1992)

En ese sentido, se ha observado que el tratamiento con THs exógenas puede inducir un aumento precoz en la expresión del TR $\beta$  y, por lo tanto, el inicio de la metamorfosis en la mayoría de los tejidos de especies en etapas pre-metamórficas (Tata, 1997; Shi, 1996).

### **3. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS**

Es bien sabido que las THs ejercen efectos pleiotrópicos, y con la finalidad de explicar sus diversos efectos, el interés en la identificación de otras posibles yodotironinas bioactivas ha crecido. En consecuencia, estudios de varios laboratorios han sugerido que entre las diyodotironinas, solo la 3,5-diyodotironina (3,5-T<sub>2</sub> o T<sub>2</sub>), un metabolito endógeno y de origen natural de la desyodación del anillo externo de T<sub>3</sub>, es una molécula bioactiva (Revisado en: Goglia, 2005).

Aunque la conversión de T<sub>3</sub> a T<sub>2</sub> no ha sido experimentalmente demostrada en vertebrados, la vía más plausible para la formación de T<sub>2</sub> es la desyodación del anillo externo de la T<sub>3</sub>. Todavía no se conoce que enzima cataliza esta conversión, sin embargo, un candidato probable es la (D<sub>2</sub>). Como se mencionó anteriormente, ésta desyodasa cataliza la remoción de un átomo de yodo del anillo externo de la T<sub>4</sub> para generar la T<sub>3</sub> bioactiva y por lo tanto, determina la disponibilidad de esta a nivel celular (revisado por Arrojo et al. 2013).

Interesantemente, tanto T3 como T2 regulan la actividad y la expresión del mRNA de la D2 en el killifish (García-G et al. 2004) y la tilapia (Mendoza et al. 2013). El hecho de que la D2, enzima que cataliza su formación esté estrechamente regulada por el producto de la reacción (T2) apoya la idea de que la producción de T2 es regulada específicamente y por lo tanto, fisiológicamente relevante.

### **3.1. Bioactividad de T2**

#### **3.1.1. Efectos no genómicos**

En cuanto a la bioactividad de T2, han surgido dos corrientes diferentes de conocimiento. El más estudiado es respecto a sus efectos no-genómicos. En la mayoría de estos estudios, los modelos son mamíferos (revisado en: Goglia, 2005; Moreno et al. 2008) y unos pocos en las aves (Incerpi et al. 2002.; Scapin et al. 2009.; Sechman et al. 2011), y han proporcionado evidencia sólida de que los efectos de T2 sobre la tasa de respiración mitocondrial y el metabolismo de los lípidos son independientes de la síntesis de proteínas y está mediada a través de mecanismos que no involucran receptores nucleares.

En este sentido, existen resultados en donde se mostró que la T2, al igual que T3 estimulaba el consumo de oxígeno en el hígado hipotiroideo (Horst et al. 1989). La potencia entre las dos yodotironinas era similar (1 pM), sin embargo, el efecto observado con T2 ocurría más temprano que el producido por la T3. Otros estudios complementarios mostraron que: *i)* la T3 y la T2, tienen un efecto sobre el metabolismo energético; *ii)* que el efecto observado con T2 es más temprano; y *iii)* que el efecto de T2 no requiere de transcripción *de novo*. Estos dos últimos puntos fueron interpretados como que el mecanismo de acción de la T2 era extra-nuclear (Moreno et al. 1998; 2002; Goglia, 2005).

### 3.1.2. Efectos genómicos

Además de sus acciones sobre el metabolismo energético, existe evidencia experimental que ha demostrado de manera inequívoca que T2 regula la expresión del mRNA de diversos genes TH-dependientes en modelos de rata o sistemas *in vitro* de mamíferos, que incluyen: la enzima málica (Lombardi et al. 2000), la GH y TSH (Moreno et al. 1998), la proteína que une IGF tipo 4 (Demori et al. 2004), y el TR $\beta$ 2 (Ball et al. 1997). Sin embargo, en la mayoría de estos estudios, la T2 se utilizó en dosis hasta 100 veces mayores que las utilizadas para T3. Otros estudios muestran que la T2 tuvo efecto en la transcripción de HSD3B, PPAR $\gamma$ , PPAR $\delta$  y la subunidad  $\beta$  de la ATP-sintasa FoF1 (Sechman et al. 2011; Mangiullo et al. 2010), resultados que sugieren que T2 tiene un mecanismo de acción genómico.

Estudios en teleósteos también demostraron que, al igual que la T3, la T2 regula la expresión de genes T3-dependientes. Así, el tratamiento con dosis suprafisiológicas y equimolares de T3 o T2 aumenta o disminuye la expresión de genes regulados positiva (*i.e.*, GH e IGF1), o negativamente (*i.e.*, D2 y TR $\beta$ 1) por THs, respectivamente (García-G et al. 2004; Mendoza et al. 2013). Subsecuentemente se observó el efecto de estas hormonas bloqueando su síntesis (metimazol: MMI) y reemplazando a los organismos con dosis fisiológicas de T3 o T2. En todos los casos, ambas THs rescatan la expresión eutiroides de los genes T3-dependientes estudiados (García-G et al. 2007; Mendoza et al. 2013).

Las acciones genómicas de la T2, sin embargo, siempre fueron cuestionadas ya que se había observado que esta TH se une con baja afinidad a los TR, tanto en mamíferos (Leeson et al. 1988) como en teleósteos (Darling et al. 1982). Es importante considerar que estos estudios se realizaron hace alrededor de tres décadas y usando principalmente extractos de proteínas nucleares hepáticas. Interesantemente, estudios recientes en nuestro grupo de trabajo, han revelado

que tanto T2 como T3 tienen igual afinidad por una isoforma del receptor TR $\beta$ 1 específica de teleósteos (Mendoza et al. 2013).

### 3.1.3. Mecanismos de acción genómicos

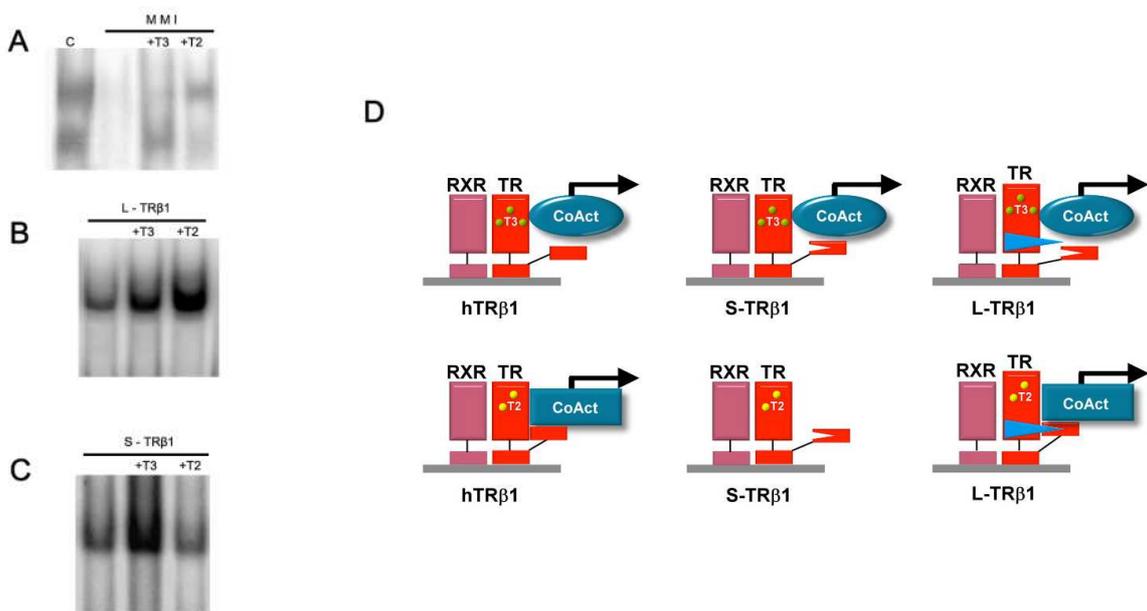
La noción de que una isoforma diferente de TR $\beta$ 1 media los efectos de T2 se ha desarrollado a partir de estudios, en nuestro grupo de trabajo, en los que tratamientos con T3 o T2 favorecen la formación de diferentes complejos transcripcionales *in vivo* (García-G et al. 2007). Empleando extractos de las proteínas nucleares hepáticas en ensayos de retardo de la movilidad electroforética (EMSAs), encontramos que las proteínas nucleares de peces eutiroides (no tratados) forman dos complejos específicos de proteínas cuando se incuban con TREs (**Figura 4A**). Estos complejos prácticamente desaparecen en el grupo hipotiroideo (tratados con MMI), sugiriendo que las THs son necesarias para que el TR forme complejos transcripcionales con el TRE. De manera interesante, en los animales hipotiroideos reemplazados con T3 predomina el complejo de menor peso, mientras que en aquellos reemplazados con T2 el complejo de mayor peso es el predominante (García-G et al. 2007).

La formación de complejos TRE-TR-T3/T2 de diferente peso podía sugerir que cada TH se podría estar uniendo de manera específica ya sea a un receptor distinto; o bien, a una isoforma del mismo receptor, lo que a su vez promovería el reclutamiento de un complejo distinto de correguladores. Así, en un primer acercamiento, decidimos clonar y caracterizar a los receptores clásicos de THs en el killifish y la tilapia para posteriormente comparar su capacidad de transactivación en presencia de T2 o T3. La caracterización reveló dos isoformas de mRNA que codifican para el TR $\beta$ 1 en el hígado. Estas isoformas presentan diferencias singulares al compararlas con el TR $\beta$ 1 humano: *i*) la región N-terminal de ambas isoformas es más corta (75 aminoácidos menos); y *ii*) una de ellas contiene nueve aminoácidos insertados justo al inicio del dominio de unión al ligando, a la cual llamamos “isoforma larga”.

Es importante mencionar que la presencia de la isoforma larga de TR $\beta$ 1 ya se había descrito en algunas especies de teleósteos (Yamano & Inui, 1995; Marchard et al. 2001). La caracterización inicial de la isoforma TR $\beta$ 1 larga de salmón mostró que se unía a los TREs canónicos y presentaba actividad de transactivación en presencia de T3 (Marchard et al. 2001). Sin embargo, su actividad no se ensayó con ninguna otra TH. En este contexto, se sabe que la inserción de 9 amino ácidos se encuentra localizada entre las hélices 2 y 3 del LDB, lo que corresponde a la región que contiene los aminoácidos que interactúan con el ligando en el TR $\beta$ 1 humano (Marchard et al. 2001). Esto nos llevó a plantear que dicha inserción de nueve aminoácidos podría conferir al TR $\beta$ 1 largo la capacidad de unir y activarse con un ligando distinto, la T2. Así, inicialmente analizamos si la T2 interactuaba específicamente con una isoforma del TR $\beta$ 1. Para esto, realizamos una serie de experimentos *in vitro* que consistieron en la expresión de ambas isoformas del TR $\beta$ 1 en células CV1 tratadas con T3 o T2 y evaluamos la formación de complejos TR $\beta$ 1-TRE mediante EMSAs. En la **Figura 4B y C** se muestra que la presencia de T2 o T3 estabiliza a los complejos TR $\beta$ 1 largo-TRE o TR $\beta$ 1 corto-TRE, respectivamente. En conjunto, estos resultados apoyan la noción de que la T2 se une preferentemente a una isoforma del TR $\beta$ 1 distinta (forma larga) a la que une T3 (forma corta).

Por lo tanto, un posible escenario sería que, *in vivo*, T3 entrara al núcleo de la célula, y se uniera a una de las isoformas de TR $\beta$ 1, y así reclutar a una familia específica de correguladores; alternativamente, T3 puede ser desyodada a 3,5-T2, la cual podría unirse a otra isoforma de TR $\beta$ 1 y por lo tanto, asociarse con un conjunto diferente de proteínas correguladoras (**Fig. 4D**). El apoyo inicial a esta hipótesis proviene de estudios que utilizan T3 o T2 como ligandos y los TR $\beta$ 1s largo, corto y humano recombinantes, ya sea en ensayos de unión competitiva o co-transfectadas con un sistema reportero en ensayos de transactivación. Consistentemente, el TR $\beta$ 1 corto sólo se une a y se activa por T3. Sin embargo, el TR $\beta$ 1 largo se une preferentemente a y es más sensible a la activación por T2, lo que sugiere que, al menos en teleósteos, T2 es una TH fisiológicamente relevante.

El TR $\beta$ 1 de humano también une T2, pero lo hace con una menor afinidad, sugiriendo que la T2 es un agonista parcial de este receptor. Esto ayuda a explicar los efectos genómicos de T2 observados en algunos mamíferos y coloca a esta hormona como una posible molécula con potencial en la aplicación clínica. Cabe destacar que estudios de estructura-función indican que tanto el NT como el LBD son dominios importantes para la activación del TR $\beta$ 1 largo y el de humano por T2 (Mendoza et al. 2013). Por lo tanto, cuando se une T2, los TR $\beta$ 1s largo y humano adoptan una conformación activa debido a la interacción de su NT y LBD, lo que permite la asociación con un conjunto de co-activadores diferentes de los que interactúan con TR $\beta$ 1 unido a T3. Este mecanismo es una reminiscencia de la situación encontrada por otros receptores nucleares (Claessens et al. 2008), pero, hasta donde sabemos, no se había observado para TRs.



**Figura 4.** (A) Ensayo de retraso de movilidad electroforética representativo de extractos nucleares de hígados de *Fundulus heteroclitus* tratados con MMI (4.5 mM) y reemplazados con T3 ó T2 (30 nM). La sonda utilizada fue un oligonucleótido de la secuencia del TRE marcada con  $^{32}\text{P}$ . (García-G et al. 2007). B y C: Interacción de las isoformas “larga” y “corta” del TR $\beta$ 1 con el TRE. EMSA representativo de TR $\beta$ 1 largo (B) ó corto (C) expresados en células CV1 e incubado con T3 o T2 y el TRE. D: Representación esquemática del mecanismo de acción propuesto para la interacción

de T3 o T2 con los TR $\beta$ 1 largo (L), corto (S) y humano (h). T3 activa a las tres isoformas de TR $\beta$ 1 sin la participación del dominio NT, mientras que la T2 activa al TR $\beta$ 1 humano y largo en una forma NT-dependiente que incluye la posible interacción de este dominio con el inserto de 9 aminoácidos (Mendoza et al. 2013).

## **4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

### **4.1. Justificación**

Estudios recientes realizados en nuestro laboratorio han demostrado que en algunos teleósteos, la 3,5-T2 es tan bioactiva como la T3 y que sus efectos son en parte mediados por una isoforma TR $\beta$ 1 que contiene un inserto de 9 aminoácidos en su dominio de unión al ligando (TR $\beta$ 1 largo (L-TR $\beta$ 1)), mientras que la T3 se une preferentemente a la isoforma corta de TR $\beta$ 1 (S-TR $\beta$ 1) isoforma que carece de este inserto. Con el objetivo de tener una mayor comprensión de la relevancia funcional de T2 y su mecanismo de acción, en la presente tesis se han utilizado dos enfoques: *in vivo*, analizamos si T3 y T2 regulan diferencialmente las isoformas corta y larga de TR $\beta$ 1 durante una demanda fisiológica como lo es el crecimiento; y *ex vivo* (cultivos organotípicos de hígado) se analizaron de cerca los mecanismos de acción de los efectos observados por T3 y T2 y si dichos efectos fueron mediados por una isoforma distinta de TR $\beta$ 1.

### **4.2. Objetivo General**

Analizar el efecto y la regulación diferencial de las vías de señalización de la T3 y la 3,5-T2 durante el crecimiento en la tilapia (*Oreochromis niloticus*).

#### **4.2.1. Objetivos específicos**

- Analizar si T3 y T2 regulan diferencialmente las isoformas corta y larga de TR $\beta$ 1 durante una demanda fisiológica como lo es el crecimiento.

- Estudiar de cerca si los efectos de T3 y T2 observados fueron mediados por una isoforma distinta de TR $\beta$ 1, utilizando cultivos organotípicos de hígado de tilapia.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. Diseño experimental

#### 5.1.1. *In vivo*

En la presente tesis se utilizaron juveniles de tilapia de aproximadamente  $0.8 \pm 0.1$  g de peso corporal. Los grupos experimentales se conformaron de la siguiente manera: un grupo control (sin tratamiento), tres grupos tratados con 1 nM de T3, o de T2 o del isómero inactivo rT3 (previamente solubilizadas en 0.05 N de NaOH), así mismo se contó con un grupo control negativo, el cual fue tratado con 4.5 mM de metimazol (MMI), un inhibidor de la síntesis de THs. Los tratamientos con las diferentes THs y el MMI fueron incluidos en el agua de cultivo por ocho horas (09:00-17:00h), tres veces por semana durante un mes. Las variables de respuesta fueron: *i*) el crecimiento en términos de peso corporal; *ii*) la concentración de T3 intrahepática; y *iii*) la expresión del mRNA de algunos genes TH-dependientes: IGF-1, D2, TR $\beta$ 1 largo y corto.

#### 5.1.2. *Ex vivo*

La estandarización de los cultivos organotípicos de hígado de juveniles de tilapia se llevó a cabo extrayendo el hígado de un organismo e inmediatamente después fue colocado en un medio de estabilización frío que contenía 50% de HBSS [Hank's Balanced Salt Solution (Gibco)], 50% de MEM [Minimum Eagle's Medium (Gibco)], 10 mM HEPES y 8 mM de glucosa (pH 7.2). Posteriormente el tejido se cortó a la mitad y se colocó longitudinalmente en un chopper (McIlwain) para hacer cortes de 400 micras de grosor y así obtener aproximadamente 18 rebanadas por hígado. Las rebanadas fueron colocadas en un inserto de

membrana semiporosa (Millipore, Herts, UK) y mantenidas en una incubadora a 18° C y 5% de CO<sub>2</sub>. El medio de cultivo consistió en 50% de MEM, 10 mM HEPES, y 35% HBSS suplementado con 10% de suero de caballo, 8 mM de glucosa, y 5% penicilina-estreptomina (Gibco).

Para cada experimento, y después de 48 horas de estabilización, el medio de cultivo fue removido y reemplazado por nuevo medio que contenía los diferentes tratamientos: T3 o T2 a diferentes concentraciones (0.1-100 nM) o diferentes concentraciones (0.1-20 µM) del antagonista de TR 1-850 solo o co-administrado con 100 nM de T3 o T2. Después de 24 horas de tratamiento se extrajo el RNA de las rebanadas y se midió la expresión del mRNA de los genes IGF-1, D2, TRβ1 largo y corto. Todos los experimentos se realizaron por duplicado, utilizando aproximadamente 5 hígados por tratamiento dando lugar a 6 rebanadas por replica.

## **5.2 Extracción de TH**

La extracción de T3 en el hígado de los organismos experimentales se realizó como previamente reportado (García-G et al. 2004). Brevemente: se homogenizó el tejido en 1:10 (w/v) de una solución metanol:amonio (99:1). Los homogenados se centrifugaron (12, 000 g por 10 minutos) y los sobrenadantes se colectaron y desecaron en un concentrador al vacío. La muestra fue reconstituida en 50 µl de buffer Tris-HCl (0.05M, pH 8.6).

## **5.3 RIA para T3**

El radioinmunoensayo se realizó como descrito anteriormente (Orozco et al., 1992). Brevemente: el buffer utilizado fue Tris-HCl (0.05M, pH 8.6) y la mezcla de incubación incluyó: el anticuerpo (anti-T3 en una dilución 1:8000) y la solución radioactiva (10 pg/100 µl de triyodotironina marcada con <sup>125</sup>I); la curva estándar (T3: de 7.8 a 1000 pg/dl) además incluyó suero libre de hormonas. La separación de la fracción unida al anticuerpo y la fracción libre se realizó con una solución de carbón/dextrán 0.5% centrifugando a 2500 rpm por 15 min a 4°C.

#### 5.4 Cuantificación de la expresión del mRNA

Se realizó la extracción del RNA total del hígado de tilapia (TRIzol, Invitrogen) y se obtuvo el DNA complementario (cDNA) a partir de 2 µg de RNA para todos los grupos experimentales. Para este fin, se utilizó la enzima transcriptasa reversa (M-MLV, Promega) y un oligo dT para todos los mRNAs excepto para el de la D2. Para evitar la amplificación de fragmentos inespecíficos, y debido a que el mRNA de la D2 contiene más de 4 Kb y numerosas regiones poli(A), en la reacción de RT se utilizó un oligonucleotido anti-sentido específico para esta desyodasa (CTCGTCGATGTAGACCAG).

La cuantificación de los mRNAs se llevó a cabo mediante la técnica de PCR en tiempo real, dichos PCRs se realizaron por duplicado usando β-actina como gen endógeno de referencia en reacciones que contenían 1 µl de cDNA, 6 µl de Maxima TM SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Fermentas) y 500 nM de los oligonucleótidos específicos para cada gen en un volumen final de 12 µl.

Un fragmento de 234 pb de β-actina de tilapia fue clonado con los oligonucleótidos 5´ GTGACATCAAGGAGAAGCT 3´ (sentido) y 5´ CGACGTCACACTTCATGAT 3´ (antisentido) y usado para construir una curva estándar ( $10^1$ – $10^9$  moléculas/µl). Los oligonucleótidos utilizados en el PCR en tiempo real (sentido: 5´ ACTTCGAGCAGGAGATGG 3´ y antisentido: 5´ GGTGGTTTCGTGGATTCC 3´) amplificaron un producto de 170 pb (3 s a 95°C, 7 s a 52°C, 8 s a 72°C por 45 ciclos). La detección y análisis de datos se realizó con un aparato Light Cycler (Roche) según las instrucciones del fabricante. La concentración de mRNA (moléculas/µl) obtenida mediante la comparación con la curva estándar fue normalizada con la concentración de β-actina para cada muestra experimental. Los resultados se expresaron como moléculas/µg de RNA total.

Se diseñaron un par de oligonucleotidos para cada cDNA cuantificado en el presente trabajo (Tabla 1), los cuales generaron fragmentos de entre 130 y 250 pb, y se utilizaron en las reacciones de PCR en tiempo real.

**Tabla 1.** Secuencias de oligonucleótidos y protocolos para el PCR en tiempo real.

| <b>Gen</b>     | <b>Fragmento (pb)</b> | <b>Oligonucleótido sentido</b>      | <b>Oligonucleótido antisentido</b> | <b>Protocolo para el PCR tiempo real</b>           |
|----------------|-----------------------|-------------------------------------|------------------------------------|--|
| IGF-1          | 217                   | AAC CTT GGG<br>TGC TCT TGG<br>CAT G | GTC TGT GGA<br>GAG CGA GGC<br>TTT  | 3 s @ 95°C; 8 s @ 56°C; 9 s @ 72°C por 45 ciclos   |
| L-TR $\beta$ 1 | 232                   | GTG AAG GAA<br>GCT AAG CCT<br>GA    | CAC AAG GCA<br>GCT CAC AGA<br>AC   | 3 s @ 95°C; 10 s @ 52°C; 10 s @ 72°C por 55 ciclos |
| S-TR $\beta$ 1 | 135                   | GCG GAA ATT<br>CCT GCC TGA<br>G     | GCA GCT CAC<br>AGA ACA TGG<br>GC   | 2 s @ 95°C; 8 s @ 52°C; 7 s @ 72°C por 45 ciclos   |
| D2             | 249                   | GAA ACT TGG<br>CTG TGA GGC          | CTC GTC GAT<br>GTA GAC CAG         | 2 s @ 95°C; 7 s @ 58°C; 10 s @ 72°C por 55 ciclos  |

## 5.5 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos en los diferentes experimentos fueron analizados mediante un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, acoplada a una prueba múltiple de medias de Tukey (control vs tratamientos) con un nivel de significancia del 95 % utilizando el programa GraphPad 5.

## 6. RESULTADOS

Los resultados de la presente tesis se publicaron en la siguiente referencia:

**Navarrete-Ramírez P, Luna M, Valverde-R C, Orozco A (2014). 3,5-T2 participates in tilapia growth through a different isoform of thyroid hormone receptor  $\beta$ 1. *J Mol Endocrinol*, 52: 1-9**

## 7. DISCUSIÓN

Estudios recientes en nuestro grupo de trabajo han demostrado que, en teleósteos, la T2 modula la expresión de algunos genes tironino-dependientes con la misma potencia que T3 (García-G et al. 2004; 2007; Mendoza et al. 2013), asimismo observamos que la bioactividad de T2 en peces está mediada por la isoforma larga de TR $\beta$ 1 (Mendoza et al. 2013). En conjunto, estos hallazgos sugieren que la T2 podría jugar un rol importante en el funcionamiento y desarrollo normal de teleósteos. En este contexto y con la finalidad de evaluar la importancia fisiológica de T2, en la presente tesis se analizó el efecto de esta hormona en el proceso de crecimiento el cual es regulado por THs. Observamos que tanto T3 como T2 estimulan el crecimiento; sin embargo, dicho efecto es mediado por dos vías de señalización diferentes y a través de las dos isoformas de TR $\beta$ 1 en teleósteos. Estos resultados son muy novedosos ya que los efectos de las THs en el crecimiento se habían atribuido únicamente a la T3 (Power et al. 2001) y ahora sabemos que, al menos en teleósteos, la T2 también es bioactiva en dicho proceso.

Algunos efectos biológicos de la T2 sobre el metabolismo energético en peces ya se habían descrito por otros grupos de trabajo. Así, en el pez dorado *Carassius auratus*, 0.3 nM de T2 es suficiente para estimular la respiración mitocondrial después de 5 minutos de exposición (Leary et al. 1996). Asimismo, T2 regula la aclimatación térmica en el pez cebra con una eficiencia similar a la de T3 (Little et al. 2013). Sin embargo, estos efectos metabólicos de la T2 no se limitan a teleósteos. Estudios en los que se evalúan los efectos de la T2 sobre el metabolismo de lípidos han mostrado que dicha hormona es capaz de prevenir la ganancia de peso cuando se administra a ratas (25 mg/100 g peso por 4 semanas) alimentadas con una dieta hipercalórica. Interesantemente, en este estudio no se observaron los efectos secundarios que se observan con T3 como taquicardia o hiperplasia cardíaca (Lanni et al. 2005; De Lange et al. 2011; Moreno et al. 2011), lo cual promueve a la T2 como un análogo de TH que pudiera

presentar efectos tiromiméticos selectivos sin los efectos secundarios nocivos observados con el tratamiento con T3.

Además de las acciones en el metabolismo energético, se sabe que la T2 modula la expresión de diversos genes que son regulados por THs (revisado en: Goglia 2005; Mendoza et al. 2013). En este sentido, en la presente tesis se obtuvieron resultados en donde, tanto *in vivo* como *ex vivo*, T3 y T2 regulan en el mismo sentido y con la misma potencia la expresión tanto de un gen regulado a la alta (IGF-1) como uno regulado a la baja (D2). Interesantemente, los resultados en cuanto a la regulación de las isoformas del gen THRB por T3 y T2 fueron diferentes ya que cada isoforma fue regulada de manera independiente y específica por cada una de estas THs y según la manipulación experimental. En este contexto, el gen THRB se regula a la baja por el estado tiroideo, de tal suerte que el tratamiento con THs provoca una disminución en la expresión su mRNA y un aumento cuando los niveles de THs son bajos (Samuels et al. 1977; Hayashi et al. 1996; Sadow et al. 2003). Sin embargo, y en contraste con lo anterior, en el experimento *in vivo* que tuvo la característica de ser de largo plazo, y en donde se trataron los grupos de tilapias juveniles con T3 o T2 (1 nM) durante 1 mes, la expresión de las dos isoformas de TR aumentó después de la exposición a su respectivo ligando: TR $\beta$ 1 corto por T3 y TR $\beta$ 1 largo por T2. Estos resultados difieren con otros reportados por nuestro laboratorio en los que un protocolo de administración aguda (100 nM de T3 o T2 por 1 día) provoca la respuesta clásica de disminución en la expresión de las isoformas corta y larga de TR $\beta$ 1 por T3 y T2, respectivamente (Mendoza et al. 2013). Estas diferencias en la expresión de los TR $\beta$ 1 pueden deberse a los diferentes protocolos de administración utilizados en cada caso. Sin embargo, nuestra hipótesis es que el aumento en la expresión de los receptores observado en el experimento a largo plazo, está asociado a procesos de desarrollo, ya que el patrón de respuesta se asemeja al observado en la metamorfosis de anfibios (Sachs et al. 2000; Tata, 2000) y peces planos (Yamano y Miwa, 1998; Marchand et al. 2004; Galay-Burgos et al. 2008), en donde, justo antes del inicio de la metamorfosis se presenta un aumento en las

THs circulantes dando lugar a el incremento en la expresión del TR $\beta$ 1 lo que desencadena el clímax de dicho proceso.

Con la finalidad de corroborar que el mecanismo de acción de T2 es a través de su unión a la isoforma larga de TR $\beta$ 1, se estandarizó un sistema *ex vivo* de cultivos organotípicos de tilapia. Dichos cultivos fueron tratados con un antagonista de los TRs llamado 1-850. Este antagonista se une con una alta afinidad tanto a TR $\alpha$  como al TR $\beta$  en sistemas *in vitro* de mamíferos bloqueando también la acción de las THs en la expresión de genes tironino-dependientes en líneas celulares (Schapira et al. 2003; Lee et al. 2012).

En general, un antagonista afecta la conformación del NR blanco pudiendo desestabilizar el reclutamiento de los correguladores y así perturbar la transcripción de dicho gen (Schapira et al. 2003; Shah et al. 2008). El uso de antagonistas de TRs ha sido estudiado en diversos modelos biológicos como el de la metamorfosis de anfibios, en donde el tratamiento exógeno con NH<sub>3</sub>, un potente antagonista de TRs, interrumpe dicho proceso debido a su efecto sobre la expresión de TR $\alpha$  y otros genes que son indispensables para que se lleve acabo la metamorfosis (Shah et al. 2008; Terrien et al. 2011). Sin embargo, y en contraste con lo anterior, este mismo antagonista no modificó la expresión del TR $\beta$ A en *Xenopus* (Opitz et al. 2006). Este último resultado es similar al que se encontró en la presente tesis, ya que el tratamiento con las diferentes concentraciones de 1-850, no tuvo efecto en la expresión de las dos isoformas de TR $\beta$ 1; sin embargo si se observó un patrón de respuesta interesante con los co-tratamientos con T3 y T2. Así, el efecto sobre cada isoforma fue ligando-específico, en donde T2 presentó efectos solo sobre la expresión del TR $\beta$ 1 largo, lo cual apoya la noción de que dicha isoforma media las acciones biológicas de esta TH. En contraste, la isoforma corta de TR $\beta$ 1 solo fue regulada por T3. Juntos, estos resultados demuestran que las vías de señalización de T3 y T2 en teleósteos son reguladas diferencialmente.

El hecho de que las isoformas de TR $\beta$ 1 de teleósteos se regulen de manera diferencial por T3 y T2 sugiere que existen otros genes que pudieran ser modulados de manera diferente por cada yodotironina en una situación fisiológica específica. La identificación de estos genes será determinante para profundizar en la comprensión de las vías de señalización por T3 y/o T2.

## **8. CONCLUSIONES**

Con los resultados del presente trabajo se puede concluir:

- I) En teleósteos, la T2 es fisiológicamente bioactiva en el crecimiento.
- II) En dicho proceso, la T2 regula la expresión de algunos genes tironino-dependientes con la misma potencia que T3.
- III) La expresión de la isoforma larga de TR $\beta$ 1 de teleósteos se regula de manera específica por su ligando, la T2.
- IV) Las vías de señalización de T3 y T2 se regulan de manera diferencial.

## 9. REFERENCIAS

- Arrojo E, Drigo R, Fonseca TL, Werneck-de-Castro JP, Bianco AC. 2013. Role of the type 2 iodothyronine deiodinase (D2) in the control of thyroid hormone signaling. *Biochim Biophys Acta* 1830, 3956-3964.
- Baker BS, Tata JR. 1990. Accumulation of proto-oncogene c-erb-A related transcripts during *Xenopus* development: Association with early acquisition of response to thyroid hormone and estrogen. *EMBO J* 9, 879-885.
- Ball SG, Sokolov J, Chin WW. 1997. 3,5-Diiodo-L-thyronine (T2) has selective thyromimetic effects in vivo and in vitro. *J Mol Endocrinol* 19, 137-147.
- Bianco AC, Larsen PR. 2005. Cellular and structural biology of the deiodinases. *Thyroid* 15, 777-786.
- Biga PR, Meyer J. 2009. Growth hormone differentially regulates growth and growth-related gene expression in closely related fish species. *Comp Biochem Physiol A* 154, 465-473.
- Björnsson BT, Einarsdóttir IE, Power D. 2012. Is salmon smoltification an example of vertebrate metamorphosis? Lessons learnt from work on flatfish larval development. *Aquaculture* 28, 264-272.
- Brown DD. 1997. The Role of Thyroid Hormone in Zebrafish and Axolotl Development. *Proc Natl Acad Sci Usa* 94,13011-13016.
- Buaboocha W, Gemmell RT. 1996. The effect of methimazole on the growth of the developing brushtail possum, *Trichosurus vulpecula*. *Growth Dev Aging* 60, 163-169.
- Campinho MA, Silva N, Sweeney GE, Power DM. 2007. Molecular, cellular, and histological changes in skin from a larval to an adult phenotype during bony fish metamorphosis. *Cell Tissue Res* 327, 267-284.
- Castillo AI, Sanchez-Martinez R, Moreno JL, Martinez-Iglesias OA, Palacios D, Aranda A. 2004. A permissive retinoid X receptor/thyroid hormone receptor heterodimer allows stimulation of prolactin gene transcription by thyroid hormone and 9-cis-retinoic acid. *Mol Cell Biol* 24,502-513.

- Chen Y, Young MA. 2010. Structure of a Thyroid Hormone Receptor DNA-Binding Domain Homodimer Bound to an Inverted Palindrome DNA Response Element. *Mol Endocrinol* 24, 1650-1664.
- Claessens F, Denayer S, Van Tilborgh N, Kerkhofs S, Helsen C, Haelens A. 2008. Diverse roles of androgen receptor (AR) domains in AR-mediated signaling. *Nucl Recept Signaling* 6, e008.
- Das B, Matsuda H, Fujimoto K, Sun G, Matsuura K, Shi Y-B. 2010. Molecular and genetic studies suggest that thyroid hormone receptor is both necessary and sufficient to mediate the developmental effects of thyroid hormone. *Gen Comp Endocrinol* 168, 174-180.
- De Lange P, Cioffi F, Senese R, Moreno M, Lombardi A, Silvestri E, De Matteis R, Lionetti L, Mollica MP, Goglia F, et al. 2011. Nonthyrototoxic prevention of diet-induced insulin resistance by 3,5-diiodo-L-thyronine in rats. *Diabetes* 60, 2730-2739.
- Denver RJ, Licht P. 1991. Dependence of body growth on thyroid activity in turtles. *J Exp Zool* 258, 48-59.
- Dickhoff WW, Folmar LC, Gorbman A. 1978. Changes in Plasma Thyroxine During Smoltification of Coho Salmon, *Oncorhynchus Kisutch*. *Gen Comp Endocrinol* 36, 229-232.
- Evans DH. 1998. *The Physiology of Fishes*. Crc Press Llc. Second Edition. 519 pp. U.S.A.
- Ferreira Azevedo M, Barra GB, Medeiros LD, De Simeoni LA, Naves LA, Neves F de AR. 2008. A novel mutation of thyroid hormone receptor beta (I431V) impairs corepressor release, and induces thyroid hormone resistance syndrome. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 52, 1304-1312.
- Fondell JD. 2013. The Mediator complex in thyroid hormone receptor action. *BBA-General Subjects* 1830, 3867-3875.
- Galay-Burgos M, Power DM, Llewellyn L, Sweeney GE. 2008. Thyroid hormone receptor expression during metamorphosis of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *Mol Cell Endocrinol* 281, 56-63.

- García-G C, Jeziorski MC, Valverde-R C, 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 L, Nuñez J, Valverde-R C, Orozco A. 2007. 3,5 diiodothyronine (3,5-T<sub>2</sub>) in vivo maintains euthyroidal hepatic expression of type 2 iodothyronine deiodinase and growth hormone in the killifish. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 293, 877-883.
- Gavlik S, Albino A, Specker JL. 2002. Metamorphosis in summer flounder: Manipulation of thyroid status to synchronize settling behaviour, growth and development. *Aquaculture* 203, 359-373.
- Gereben B, Zavacki AM, Ribich S, Kim BW, Huang SA, Simonides WS, Zeöld A, Bianco AC. 2008. Cellular and molecular basis of deiodinase-regulated thyroid hormone signaling. *Endocr Rev* 29, 898-938.
- Gerwien RW, John-Alder HB. 1992. Growth and behaviour of thyroid deficient lizards (*Sceloporus undulatus*). *Gen Comp Endocrinol* 87, 312-324.
- Goglia F. 2005. Biological Effects of 3,5-Diiodothyronine (T<sub>2</sub>). *Biochemistry (Moscow)* 70, 164-172.
- Hayashi Y, Mangoura D, Refetoff S. 1996. A mouse model of resistance to thyroid hormone produced by somatic gene transfer of a mutant thyroid hormone receptor. *Mol Endocrinol* 10, 100-106.
- Helsen C, Kerkhofs S, Clinckemalie L, Spans L, Laurent M, Boonen S, Vanderschueren D, Claessens F. 2012. Structural basis for nuclear hormone receptor DNA binding. *Mol Cell Endocrinol* 348, 411-417.
- Hoar WS. 1988. The physiology of smolting salmonids. In: Hoar WS, Randall DJ, (Eds.) *Fish Physiology* Vol. XIB. Academic Press New York, 275-343.
- Horst C, Rokos H, Seitz HJ. 1989. Rapid stimulation of hepatic oxygen consumption by 3,5-di-iodo-L-thyronine. *Biochem J* 261, 945-950.
- Hulbert AJ. 2000. Thyroid hormones and their effects: a new perspective. *Biol Rev Camb Philos Soc* 75, 519-631.

- Incerpi S, De Vito P, Luly P, Spagnuolo S, Leoni S. 2002. Short-term effects of thyroid hormones and 3,5-diiodothyronine on membrane transport systems in chick embryo hepatocytes. *Endocrinology* 143, 1660-1668.
- Inui Y, Miwa S. 1985. Thyroid Hormone Induces Metamorphosis of Flounder Larvae. *Gen Comp Endocrinol* 60, 450-454.
- Janz DM. 2000. Endocrine System. In: *The Laboratory Fish*, Ostrand GK, Eds. Chap 25. Academic Press, San Diego.
- Kawakami Y, Yokoi K, Kumai H, Ohta H. 2008. The role of thyroid hormones during the development of eye pigmentation in the Pacific bluefin tuna (*Thunnus orientalis*). *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 150, 112-116.
- Lanni A, Moreno M, Lombardi A, de Lange P, Silvestri E, Ragni M, Farina P, Chieffi Baccari G, Fallahi P, Antonelli A, et al. 2005. 3,5-Diiodo-L-thyronine powerfully reduces adiposity in rats by increasing the burning of fats. *FASEB J* 19, 1552-1554.
- Lam TJ. 1994. Hormones and egg/larval quality in fish. *J World Aquac Soc* 25, 2-12.
- Leary SC, Barton KN, Ballantyne JS. 1996. Direct effects of 3,5,3'-triiodothyronine and 3,5-diiodothyronine on mitochondrial metabolism in the goldfish *Carassius auratus*. *Gen Comp Endocrinol* 104, 61-66.
- Leatherland JF. 1994. Reflections on the thyroidology of fishes: From molecules to human kind. *Guelph Ichthyol Rev* 2, 1-67.
- Leeson PD, Ellis D, Emmett JC, Shah VP, Showell GA, Underwood AH. 1988. Thyroid hormone analogues. Synthesis of 30-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.
- Li J, Kinoshita T, Pandey S, Ng CKY, Gygi SP, Shimazaki K-I, Assmann SM. 2002. Modulation of an RNA-binding protein by abscisic-acid-activated protein kinase. *Nature* 418, 793-797.

- Little AG, Kunisue T, Kannan K, Seebacher F. 2013. Thyroid hormone actions are temperature-specific and regulate thermal acclimation in zebrafish (*Danio rerio*). *BMC Biology* 26, 11-26.
- Liu YW, Chan WK. 2002. Thyroid hormones are important for embryonic to larval transitory phase in zebrafish. *Differentiation* 70, 36-45.
- Lombardi A, Beneduce L, Moreno M, Diano S, Colantuoni V, Ursini MV, Lanni A, Goglia F. 2000. 3,5-diiodo-L-thyronine regulates glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in the rat. *Endocrinology* 141, 1729-1734.
- Machuca I, Esslemont G, Fairclough L, Tata JR. 1995. Analysis of structure and expression of the *Xenopus* thyroid hormone receptor  $\beta$  gene to explain its autoregulation. *Mol Endocrinol* 9, 96-107.
- Mangiullo R, Gnoni A, Damiano F, Siculella L, Zanotti F, Papa S, Gnoni GV. 2010. 3,5-diiodo-L-thyronine upregulates rat-liver mitochondrial FoF1-ATP synthase by GA-binding protein/nuclear respiratory factor-2. *Biochem Biophys Acta* 1797, 233-240.
- Marchand O, Safi R, Escriva H, Van Rompaey E, Prunet P, Laudet V. 2001. Molecular cloning and characterization of thyroid hormone receptors in teleost fish. *J Mol Endocrinol* 26, 51-65.
- Marchand O, Duffraisse M, Triqueneaux G, Safi R, Laudet V. 2004. Molecular cloning and developmental expression patterns of thyroid hormone receptors and T3 target genes in the turbot (*Scophthalmus maximus*) during post-embryonic development. *Gen Comp Endocrinol* 135, 345-357.
- Matty AJ. 1985. The thyroid gland. In: *Fish Endocrinology* Croom Helm, Australia 267, 54-83.
- Mendoza CA, Navarrete-Ramírez P, Hernández-Puga G, Villalobos P, Holzer G, Laudet V, Renaud JP, Orozco A. 2013. 3,5-T2 is an alternative ligand for the thyroid hormone receptor  $\beta$ 1. *Endocrinology* 158, 2948-2958.
- Miell JP, Taylor AM, Zini M, Maheshwari HG, Ross RJM, 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.

- Miwa S, Inui Y. 1987. Effects of various doses of thyroxine and triiodothyronine on the metamorphosis of flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Gen Comp Endocrinol* 67, 356-363.
- Mommsen TP. 2001. Paradigms of Growth in Fish. *Comp Biochem Physiol B* 129, 207-219.
- 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 T3 on resting metabolic rate in euthyroid rats entirely caused by T3 itself? *Endocrinology* 143, 504-510.
- Moreno M, Silvestri E, De Matteis R, de Lange P, Lombardi A, Glinni D, Senese R, Cioffi F, Salzano AM, Scaloni A et al. 2011. 3,5-Diiodo-L-thyronine prevents high-fat-diet-induced insulin resistance in rat skeletal muscle through metabolic and structural adaptations. *FASEB J* 25, 3312-3324.
- Muñoz A, Bernal J. 1997. Biological activities of thyroid hormone receptors. *Eur J Endocrinol* 137, 433-445.
- Navarrete-Ramirez P, Luna M, Valverde-R C, Orozco A. 2014. 3,5-diiodothyronine stimulates tilapia growth through an alternate isoform of thyroid hormone receptor 1. *J Mol Endocrinol* 52, 1-9.
- Norris DO. 1985. Vertebrate Endocrinology. Chap 8. Lea & Febiger. USA 161-202.
- Oetting A, Yen PM. 2007. New insights into thyroid hormone action. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 21, 193-208.
- Opitz R, Lutz I, Nguyen NH, Scanlan TS, Kloas W. 2006. Analysis of thyroid hormone receptor  $\beta$ A mRNA expression in *Xenopus laevis* tadpoles as a means to detect agonism and antagonism of thyroid hormone action. *Toxicol Appl Pharmacol* 212, 1-13.
- Orozco A, Ruiz JA, Valverde-R C. 1992. The importance of employing serum free of thyronines in radioimmunoassays to asses circulating thyroid hormones in rainbow trout. *Boletín del Instituto de Estudios Médicos y Biológicos* 40, 41-47.

- Orozco A, Valverde-R C. 2005. Thyroid hormone deiodination in fish. *Thyroid* 15, 799-813.
- Orozco A, Valverde-R C, Olvera A, García-G C. 2012. Iodothyronine deiodinases: a functional and evolutionary perspective. *J Endocrinol* 215, 207-219.
- Power DM, Llewellyn L, Faustino M, Nowell MA, Björnsson BTh, Einarsdottir IE, Canario AVM, Sweeney GE. 2001. Thyroid hormones in growth and development in fish. *Comp Biochem Physiol C* 130, 447-459.
- Sachs LM, Damjanovski S, Jones PL, Li Q, Amano T, Ueda S, Shi YB, Ishizuya-Oka A. 2000. Dual function of thyroid hormone receptors during *Xenopus* development. *Comp Biochem Physiol B* 126, 199-211.
- Sadow PM, Chassande O, Koo EK, Gauthier K, Samarut J, Xu J, O'Malley BW, Weiss RE. 2003. Regulation of expression of thyroid hormone receptor isoforms and coactivators in liver and heart by thyroid hormone. *Mol Cell Endocrinol* 203, 65-75.
- Sakurai A, Miyamoto T, DeGroot LJ. 1992. Cloning and characterization of the human thyroid hormone receptor beta 1 gene promoter. *Biochem Biophys Res Commun* 29, 78-84.
- Samuels HH, Horwitz ZD, Stanley F, Casanova J, Shapiro LE. 1977. *Nature* (London) 28, 254-257.
- Scapin S, Leoni S, Spagnuolo S, Fiore AM, Incerpi S. 2009. Short-term effects of thyroid hormones on Na-K-ATPase activity of chick embryo hepatocytes during development: focus on signal transduction. *Am J Physiol Cell Physiol* 296, C4-C12.
- Schapira M, Raaka BM, Das S, Fan L, Totrov M, Zhou Z, Wilson SR, Abagyan R, Samuels HH. 2003. Discovery of diverse thyroid hormone receptor antagonists by high-throughput docking. *PNAS* 100, 7354-7359.
- Schmid AC, Lutz I, Kloas W, Reinecke M. 2003. Thyroid hormone stimulates hepatic IGF-I mRNA expression in a bony fish, the tilapia *Oreochromis mossambicus*, in vitro and in vivo. *Gen Comp Endocrinol* 130, 129-134.

- Schreiber AA, Specker JL. 1998. Metamorphosis in the Summer Flounder (Paralichthys Dentatus): Stage-Specific Developmental Response to Altered Thyroid Status. *Gen Comp Endocrinol* 111, 156-166.
- Sechman A, Pawlowska K, Hrabia A. 2011. Effect of 3,3',5-triiodothyronine and 3,5-diiodothyronine on progesterone production, cAMP synthesis, and mRNA expression of STAR, CYP11A1, and HSD3B genes in granulosa layer of chicken preovulatory follicles. *Domest Anim Endocrinol* 41, 137-149.
- Shah V, Nguyen P, Nguyen NH, Togashi M, Scanlan TS, Baxter JD, Webb P. 2008. Complex actions of thyroid hormone receptor antagonist NH-3 on gene promoters in different cell lines. *Mol Cell Endocrinol* 296, 69-77.
- Shi Y-B, Yaoita Y, Brown DD. 1992. The earliest changes in gene expression in tadpole intestine induced by thyroid hormone. *J Biol Chem* 268, 20312-20317.
- Shi Y-B, Ishizuya-Oka A. 1996. Biphasic intestinal development in amphibians: embryogenesis and remodeling during metamorphosis. *Curr Top Dev Biol* 32, 205-235.
- Solis SJ, Villalobos P, Orozco A, Delgado G, Quintanar-Stephano A, Garcia-Solis P, Hernandez-Montiel HL, Robles-Osorio L, Valverde RC. 2011. Inhibition of intrathyroidal dehalogenation by iodide. *J Endocrinol* 208, 89-96.
- Takehita A, Yen PM, Ikeda M, Cardona GR, Liu Y, Koibuchi N, Norwitz ER, Chin WW. 1998. Thyroid hormone response elements differentially modulate the interactions of thyroid hormone receptors with two receptor binding domains in the steroid receptor coactivator-1. *J Biol Chem* 273, 21554-62.
- Tata JR, Wassarman PM. 1997. Hormonal signaling and amphibian metamorphosis. *Advances in Developmental Biology*, vol. 5 Academic Press 237-274.
- Tata JR. 2000. Autoinduction of nuclear hormone receptors during metamorphosis and its significance. *Insect Biochem Mol Biol* 30, 645-651.
- Terrien X, Fini J-B, Demeneix B, Schramm K-W, Prunet P. 2011. Generation of fluorescent zebrafish to study endocrine disruption and potential cross-talk between thyroid hormone and corticosteroids. *Aquat Toxicol* 105, 13-20.

Yamano K, Miwa S. 1998. Differential gene expression of thyroid hormone receptor  $\alpha$  and  $\beta$  in fish development. *Gen Comp Endocrinol* 109, 75-85.

Yamano K. 2005. The role of thyroid hormone in fish development with reference to aquaculture. *JARQ* 39, 161-168.