



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

**IDENTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE GENES REGULADOS DIFERENCIALMENTE
POR T3 Y POR 3,5-T2 EN EL HÍGADO Y CEREBRO DE TILAPIA.**

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

PRESENTA:
M.C. AURORA MARÍA OLVERA VIDAL

DIRECTORA DE TESIS
DRA. AUREA OROZCO RIVAS
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

COMITÉ TUTOR
DR. ALEJANDRO SÁNCHEZ FLORES
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA
DR. FRANCISCO G. VÁZQUEZ CUEVAS
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

QUERÉTARO, MÉXICO, ENERO 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Fisiología Evolutiva del instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México bajo la supervisión de la Dra. Aurea Orozco Rivas.

Este proyecto fue apoyado por:

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México (CONACyT), beca doctoral 245201 y donativo 219833.

Programa de Apoyos a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica, UNAM (PAPIIT) 204517.

Dedicatoria

A Dahel por ser la mayor inspiración, a mi familia por el apoyo constante y el amor incondicional.

Agradecimientos

A la Dra. Aurea por darme la oportunidad de integrarme en su grupo de trabajo, por la excelente dirección científica a lo largo de los años y por la gran calidez humana.

A Paty Villalobos por toda la ayuda, por su gran trabajo en el arte molecular, por todos los consejos y por su valiosa amistad.

Al Dr. Valverde por todo el apoyo, por las buenas discusiones y su estímulo en el pensamiento crítico.

A mi comité tutor por guiarme y aconsejarme tan amablemente todos estos años.

A mis compañeras del laboratorio Gaby, Pame, Yas e Iván, que mas que compañeras son amigas, por el trabajo constante y el mejor ambiente de laboratorio.

A Leonor Casanova, Carmelita y Lupita, por su gran labor en la coordinación de posgrado del INB, haciéndola una de las más eficientes en la UNAM.

Índice

Resumen.....	2
Abstract.....	3
1. Introducción.....	4
2. Antecedentes.....	5
2.1. Importancia de las THs.....	5
2.1.2. Efectos de las THs en peces.....	6
2.2. Síntesis y secreción de THs.....	7
2.3. Transporte de THs.....	8
2.4. Metabolismo de THs.....	10
2.5. Mecanismos de acción de THs.....	12
2.5.1. Receptores Nucleares de THs.....	12
2.5.2. Receptores nucleares de THs en teleósteos.....	14
2.6. La T2 como ligando alternativo de TRs.....	16
3. Planteamiento del problema.....	18
4. Hipótesis.....	18
5. Objetivo general y específicos.....	19
6. Material y Métodos.....	20
7. Resultados.....	25
8. Discusión.....	40
9. Conclusiones.....	44
10. Bibliografía.....	45
11. Material suplementario.....	49

Resumen

Aunque la 3,5,3'-triyodotironina (T3) es considerada como la principal hormona tiroidea (TH) bioactiva debido a su alta afinidad por los receptores nucleares a THs (TRs), datos novedosos sugieren que la 3,5-diyodotironina (T2) también es capaz de regular redes transcripcionales. Para determinar la relevancia funcional de estas THs bioactivas, realizamos un análisis del transcriptoma en el cerebelo, tálamo-hipófisis, e hígado de la tilapia tratados con dosis equimolares de T2 o T3. Identificamos un total de 169, 154 y 2863 genes que fueron responsivos a THs ($FDR < 0.05$) en el cerebelo, tálamo-hipófisis, e hígado de la tilapia, respectivamente. Dentro de estos genes, 130, 96 y 349 fueron regulados únicamente por T3, mientras que 22, 40 y 929 fueron regulados exclusivamente por T2 en nuestro paradigma experimental. Los perfiles de expresión en respuesta al tratamiento con TH fueron tejido-específicos, y la diversidad de genes regulados también resulta en una variedad de diferentes vías que son moduladas por el tratamiento con T2 y T3. T2 regula redes de genes asociados con la señalización celular y vías transcripcionales, mientras que T3 regula vías relacionadas a la señalización celular, sistema inmune y metabolismo de lípidos. En conjunto, el presente trabajo destaca la relevancia de la T2 como una importante hormona bioactiva, y revela algunas de las diferentes estrategias funcionales que subyacen la pleiotropía de las THs.

Summary

Although 3,5,3'-triiodothyronine (T3) is considered to be the primary bioactive thyroid hormone (TH) due to its high affinity for TH nuclear receptors (TRs), new data suggest that 3,5-diiiodothyronine (T2) can also regulate transcriptional networks. To determine the functional relevance of these bioactive THs, RNA-seq analysis was conducted in the cerebellum, thalamus-pituitary and liver of tilapia treated with equimolar doses of T2 or T3. We identified a total of 169, 154 and 2863 genes that were TH-responsive (FDR < 0.05) in the tilapia cerebellum, thalamus-pituitary and liver, respectively. Among these, 130, 96 and 349 genes were uniquely regulated by T3, whereas 22, 40 and 929 were exclusively regulated by T2 under our experimental paradigm. The expression profiles in response to TH treatment were tissue-specific, and the diversity of regulated genes also resulted in a variety of different pathways being affected by T2 and T3. T2 regulated gene networks associated with cell signalling and transcriptional pathways, while T3 regulated pathways related to cell signalling, the immune system, and lipid metabolism. Overall, the present work highlights the relevance of T2 as a key bioactive hormone, and reveals some of the different functional strategies that underpin TH pleiotropy.

1. Introducción

Las hormonas tiroideas (THs) constituyen un sistema de señalización primordial en todos los vertebrados, ya que participan en una gran variedad de procesos celulares y fisiológicos. Así, las THs son esenciales para el desarrollo normal del individuo ya que son reguladoras maestras de procesos como la neurogénesis, el crecimiento y el metabolismo. Para llevar a cabo sus acciones, las THs regulan la expresión de un gran número de genes en virtualmente todos los tejidos. Esto ocurre a través de su unión a factores de transcripción dependientes de ligando denominados receptores de THs o TRs (García et al., 2007; Bhumika et al., 2014; Cheng et al., 2010). Los TRs forman parte de la superfamilia de los receptores nucleares (NR, del inglés Nuclear Receptors). Además de compartir algunas características estructurales, todos los NR regulan la transcripción génica a través del reconocimiento y unión a una secuencia específica de DNA que se localiza en la región promotora de los genes blanco: en el caso de las THs este sitio de reconocimiento específico se denomina TRE por sus siglas en inglés *T3-response element*. Así, la formación de complejos T3-TR que a su vez están unidos al TRE, es el primer paso crítico para la regulación positiva o negativa de los genes blanco y la subsiguiente regulación de la síntesis de proteínas. Los TR modulan la expresión génica mediante su interacción con correpresores o coactivadores y finalmente con la maquinaria general de transcripción asociada (Zhang J & Lazar 2000; Tata 2002; Yen et al., 2006; Solís-Sainz et al., 2010). Debido a su alta afinidad por los TRs, la triyodotironina o T3 ha sido considerada como la principal TH bioactiva; esta tironina se produce a través de la desyodación secuencial de la pro-hormona tetrayodotironina o T4. La desyodación de la T4 genera tanto T3 como otras yodotironinas que han sido consideradas como metabolitos inactivos al no presentar efectos genómicos. Sin embargo, en estudios *in vivo* realizados en nuestro grupo de trabajo en especies de teleósteos se ha encontrado que la 3,5-diyodotironina (T2) al igual que la T3, regula la expresión de genes tironino-dependientes de manera equipotente. Asimismo, se encontró que la unión de T2 al TR promueve el reclutamiento de una población de factores de transcripción diferente a la que promueve T3, y que ambas tironinas presentan una capacidad diferencial de transactivar con 2 isoformas del TR β 1; mientras que los efectos de la T2 son principalmente mediados por la isoforma larga del receptor TR β 1 (L-TR β 1), la isoforma corta (C-TR β 1), la cual difiere únicamente en la ausencia de un inserto de 9 aminoácidos en el dominio de unión a ligando, es activada únicamente en presencia de T3

(Mendoza et al., 2013; Navarrete et al., 2014; García et al., 2007). Por todo lo anterior, en el presente trabajo se pretende explorar más detalladamente la vía de señalización de T2 y compararla con la que presenta la T3. Particularmente, se plantea que T3 y T2 regulan de manera diferencial poblaciones de genes y vías funcionales; además, que ésta regulación es tejido-específica.

2. Antecedentes

2.1. Importancia de las THs

Las THs ejercen múltiples acciones fisiológicas en todas las clases de vertebrados, desde peces hasta los humanos. Estas acciones pueden ser divididas en dos grandes categorías: aquella donde la hormona regula procesos relacionados a la diferenciación, el desarrollo y el crecimiento del individuo, y aquella que involucra acciones en el organismo adulto, principalmente en el mantenimiento del balance energético. De particular importancia es el papel esencial de las THs en el cerebro en desarrollo y adulto de mamíferos y no-mamíferos, así como en la regeneración del sistema nervioso después de una lesión (Ahmed et al., 2008; Bhumika & Darras., 2014). La falta de THs durante periodos críticos del desarrollo puede inducir consecuencias adversas. Varios estudios han mostrado que insuficiencias severas de THs pueden llevar a un retardo en el crecimiento somático y del sistema nervioso. En mamíferos, el hipotiroidismo subclínico durante el desarrollo fetal resulta en una función cognitiva reducida (Paquette et al., 2014).

En humanos se han descrito cambios metabólicos asociados a variaciones en el estatus tiroideo; el hipertiroidismo se asocia con un metabolismo acelerado, incremento en lipólisis, pérdida de peso, incremento en la biosíntesis y excreción del colesterol hepático y niveles reducidos de colesterol en suero. En contraste, el hipotiroidismo está asociado con un metabolismo y lipólisis reducidos, ganancia de peso y niveles de colesterol elevados en suero (Brent 2012). En aves se sabe que las THs son esenciales en el desarrollo, así como en la regulación de la temperatura; también participan estimulando la proliferación celular del sistema inmune, regulando el metabolismo energético y son necesarias para una correcta transición de los estados reproductivos (Dardente et al., 2014; Durant et al., 2013). En reptiles se ha demostrado la importancia de las THs en el desarrollo, crecimiento, ecdisis, control del metabolismo, así como en el comportamiento (Kohel et al., 2001; Shepherdley et al., 2002). En anfibios, la metamorfosis es el ejemplo más dramático de los cambios

morfológicos, bioquímicos y celulares iniciados y mantenidos por las THs durante el desarrollo (Denver et al., 2002; Tata 2006; Hogan et al., 2007).

Debido a que en esta tesis se utilizó a una especie de pez como modelo biológico, a continuación se describen más a detalle los efectos de las THs en esta clase de vertebrados.

2.1.2 Efectos de las THs en peces

En los teleósteos y como sucede en otros vertebrados, las THs son mediadoras de muchos procesos fisiológicos, incluyendo el desarrollo, el crecimiento, la metamorfosis o transición de larva a juvenil y la reproducción (Orozco & Valverde, 2015; Nishiwaki-Ohkawa & Yoshimura, 2016; Shreiber & Specker, 1998; Shiao & Hwag, 2006; Blanton & Specker, 2007; Peter 2011).

Un ejemplo de cambios espectaculares orquestados por las THs es la metamorfosis de los peces planos, en donde la larva simétrica y pelágica se transforma en un juvenil asimétrico y bentónico (Power et al., 2008). Aún hoy en día siguen siendo un misterio los mecanismos precisos de cómo estas hormonas llevan a cabo los cambios celulares, morfológicos y funcionales asociados a la metamorfosis. Sin embargo, el análisis del transcriptoma del hipogloso del atlántico (*Hippoglossus hippoglossus*) durante la metamorfosis revela que la T3 funciona como promotor de la expresión de genes clave que a su vez encienden redes de genes, cascadas de señalización y factores de transcripción que promueven los cambios morfo-funcionales que ocurren durante la metamorfosis (Alves et al., 2016).

Otro ejemplo, aunque no tan espectacular como la metamorfosis, es la transición de larva a juvenil en teleósteos, coordinada también por THs. Los mecanismos precisos tampoco han sido del todo esclarecidos; sin embargo, habiéndose documentado en diferentes especies (i.e., zebrafish *Danio rerio*, Brown et al., 1997; carpa *Pimephales promelas*, Crane et al., 2004; tilapia *Oreochromis mossambicus*, Shiao et al., 2008; besugo plateado *Spams sarba*, Deane & Woo, 2003; pez gobio *Oxyeleotris marmoratus*, Abol-Munafi et al., 2005, entre otros) es claro que este proceso se desencadena con un aumento de T3, correlacionado con un aumento de la actividad de la enzima D2, la cual cataliza su producción a partir de la desyodación de la prohormona T4 (ver sección Metabolismo de THs) (Orozco & Valverde, 2015; Navarrete-Ramírez et al, 2014). La desyodación secuencial

de la T4 genera además de T3 otras tironinas, como la T2 que hasta hace poco se le reconocían únicamente efectos no genómicos en mamíferos (Goglia, 2005). En teleósteos en cambio, nuestro grupo de trabajo ha demostrado que al igual que la T3, el tratamiento con T2 promueve la aceleración del crecimiento en los alevines de tilapia al regular la expresión de genes como el de la hormona de crecimiento (GH) o el factor insulinoide de crecimiento 1 (IGF-1) (Navarrete et al, 2014). Las ventajas funcionales que han favorecido la evolución de dos principales vías de señalización de THs (T2 y T3) en los teleósteos aún no son claras (Orozco et al, 2014).

2.2. Síntesis y secreción de THs

La síntesis y secreción de las THs está finamente regulada por el eje hipotálamo-hipófisis-tiroides (HHT) (Richardson et al., 2007; Solís-Sainz et al., 2010; Orozco et al., 2012). Los elementos esenciales que componen al eje HHT están altamente conservados en todos los vertebrados y la producción y secreción de las hormonas tiroideas ocurre exclusivamente en la glándula tiroides. La glándula tiroides varía su morfología dentro del grupo de vertebrados. En la mayoría de los teleósteos el tejido tiroideo está presente en folículos dispersos o en grupos de folículos en la región faríngea. En peces elasmobranquios, reptiles y mamíferos la glándula tiroides es un órgano que se encuentra en la mayoría de los casos en la región ventral del cuello (en tortugas y serpientes se localiza cerca del corazón). Sin embargo, e independientemente de esta heterogeneidad anatómica, en todos los casos la unidad funcional y estructural de la glándula es el folículo tiroideo.

El folículo tiroideo es una estructura esférica que consiste de una monocapa de células epiteliales llamadas tirocitos la cual rodea al lumen. El lumen es un espacio extracelular cerrado que está lleno de un fluido proteínico rico en una glucoproteína específica de la glándula, llamada tiroglobulina o Tg y que contiene las TH almacenadas. Después de un periodo variable de almacenamiento en el folículo tiroideo, la Tg es internalizada al tirocito vía endocitosis. Una vez dentro es sujeta a proteólisis para liberar a las hormonas las cuales serán secretadas a circulación unidas a proteínas transportadoras que las acarrearán a los tejidos blanco (Geven *et al.*, 2007; McNabb, 1992).

La síntesis de las hormonas tiroideas es un proceso metabólico complejo y exclusivo de la glándula tiroides. La estructura básica de las THs consiste en dos anillos derivados del

aminoácido tirosina (**Figura 1**); el anillo interno conserva los grupos amino y carboxilo (cadena β -alanina) y el anillo externo se une al interno mediante un enlace tipo éter. La glándula tiroides produce y secreta esencialmente, dos diferentes THs: la 3,5,3',5'-tetrayodotironina también llamada tiroxina o T4, y la 3,5,3'-triyodotironina o T3. El resto de las yodotironinas tanto circulantes como intracelulares no se producen en la glándula tiroides, sino que se forman en el órgano blanco por la acción de un grupo de selenoenzimas llamadas desyodasas de yodotironinas (Ds) (Solís-Sainz et al., 2010).

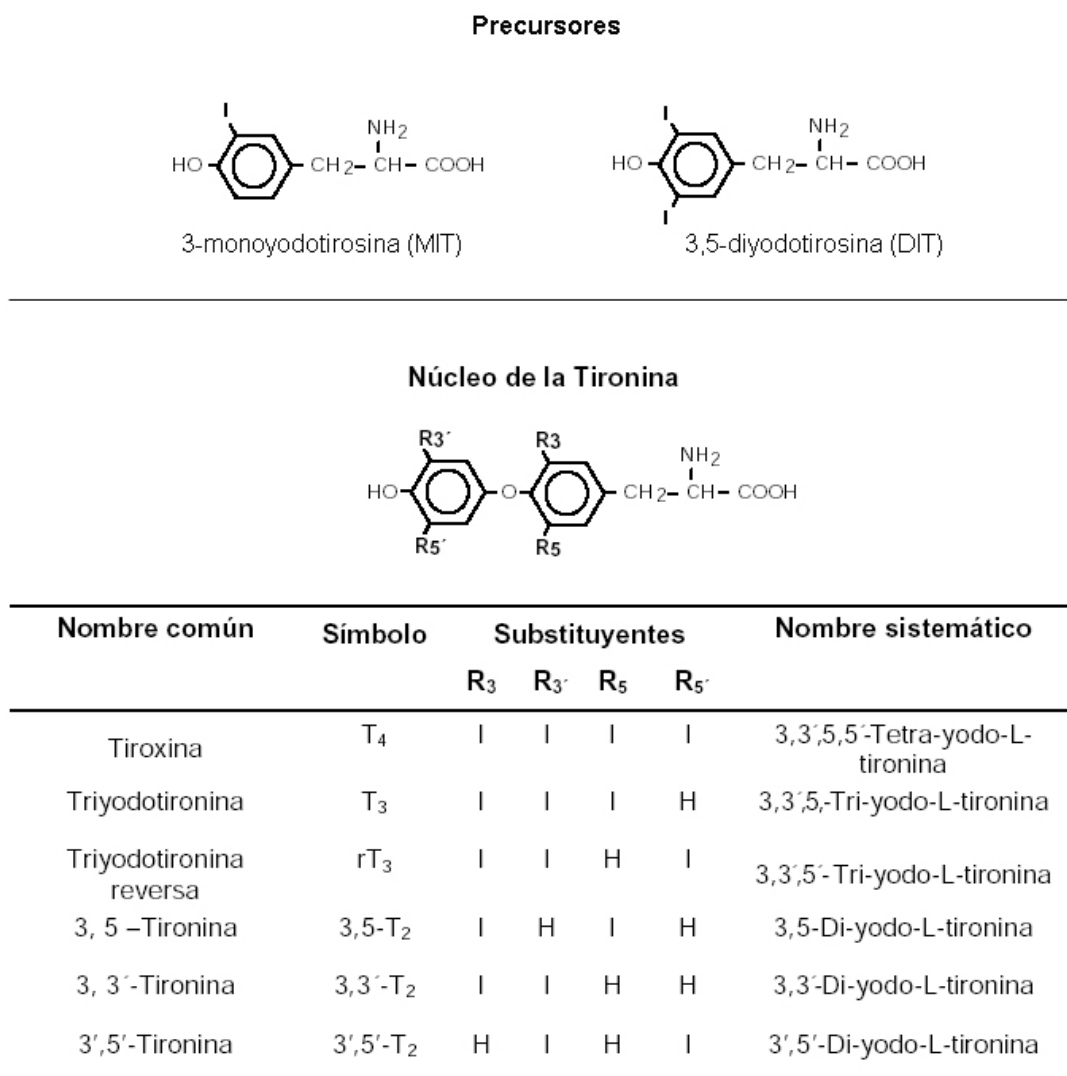


Figura 1. Estructura general de yodoaminoácidos precursores. MIT, DIT y principales miembros de la familia de las yodotironinas (Modificado de Valverde *et al.*, 2004).

2.3. Transporte de THs

Los efectos biológicos de las THs son mediados a través de su acción intracelular, principalmente genómica. Las acciones de las THs en la célula blanco son entonces

dependientes de dos procesos estrechamente relacionados, el transporte transmembranal bidireccional (ingreso/egreso) de la hormona, y su metabolismo por acción de las desyodasas.

Hasta la década de los 70s prevalecía la idea de que el paso de las THs por la membrana celular era un proceso de difusión pasiva, esto en gran medida por su naturaleza lipofílica (Bernal et al., 2015). Ahora está bien establecido que el transporte membranal de estas hormonas es un proceso activo (saturable, dependiente de energía, y estereoespecífico) mediado por proteínas transportadoras de membrana (Solís-Sainz et al., 2010).

Hay distintas proteínas que tienen la capacidad de transportar THs, las cuales se han caracterizado por su afinidad, y especificidad por la TH, así como por su correlato clínico. Las mejor estudiadas pertenecen a la familia de los transportadores de monocarboxilato (MCT, del inglés monocarboxylate transporter) y a la familia del polipéptido transportador de aniones orgánicos (OATP, del inglés organic anion-transporting polypeptide). La expresión y la selectividad transportadora de los miembros de una y otra familia difieren significativamente, siendo además tejido-específicas (Friesema et al., 2005).

La gran familia de transportadores OATP comprende al menos 40 miembros, de los cuales muchos de ellos aceptan una amplia variedad de ligandos y prácticamente todos operan a través de un mecanismo Na^+ independiente. Todos los OATP son proteínas de entre 72 a 93 kDa con 12 dominios transmembranales y la mayoría se expresan en la membrana basolateral de células polarizadas. Solamente cuatro miembros de la subfamilia OATP1 (OATP1A2; OATP1B1; OATP1B3 y OATP1C1) son capaces de transportar TH con diferente distribución tisular y selectividad por el sustrato. OATP1A2 se expresa en varios órganos (hígado, cerebro, riñón) y aunque transporta T4, T3, rT3 y las hormonas sulfatadas correspondientes (T4S, T3S y rT3S), la proteína tiene poca especificidad pues también transporta sales biliares y diferentes fármacos. Las proteínas OATP1B1 y OATP1B3 solo se expresan en el hígado; sin embargo, carecen de especificidad y su repertorio de transporte incluye un numeroso grupo de compuestos, xenobióticos y fármacos. OATP1C1 se expresa exclusivamente en el endotelio de los capilares cerebrales y en las células de Leydig del testículo. Dentro de los OATPs, esta proteína exhibe mayor especificidad para transportar T4, rT3, T4S y en mucha menor proporción T3 (Visser et al., 2008; Van Der Deure et al., 2008; Solís-Sainz et al., 2010).

La familia de proteínas transportadoras MCT incluye al menos 14 miembros, de los cuales a la mayoría se les denomina como transportadores “huérfanos”, al no tener información acerca de sus ligandos específicos (Visser et al., 2011). Esta familia de transportadores participan en general en el flujo de sustratos energéticos (lactato, piruvato, cuerpos cetónicos) en diferentes tejidos, principalmente en astrocitos y células gliales del cerebro. Exceptuando a MCT8 y MCT10, la función específica de las proteínas restantes aún no se conoce con certeza. Inicialmente MCT10 se identificó como un transportador de aminoácidos, facilitando el ingreso y egreso celular de aminoácidos aromáticos como triptófano, fenilalanina, tirosina y 3,4-dihidroxifenilalanina o DOPA. La distribución de MCT10 es amplia e incluye principalmente el intestino, el riñón, el hígado, el músculo esquelético, el corazón y la placenta. Estudios *in vitro* han mostrado que la selectividad de MCT10 es mayor para T3 que para T4. MCT8 tiene una selectividad mayor para T4 y T3 pero también transporta rT3 y 3,3'T2 en el intervalo de concentración micromolar, y no transporta tironinas sulfatadas. El MCT8 no transporta lactato ni otros sustratos energéticos, y a diferencia de MCT10, tampoco transporta aminoácidos. Igualmente, la expresión tisular de MCT8 es más amplia, incluyendo diversas regiones del CNS como corteza, hipotálamo, hipófisis, así como riñón, corazón, suprarrenal y tiroides (Solís-Sainz et al., 2010; Visser et al., 2011).

2.4. Metabolismo de THs

El papel de las Ds es crítico ya que regulan la concentración intracelular efectiva de las THs. El estudio de esta familia enzimática ha enriquecido el concepto de control pre-receptor; es decir, del conjunto de mecanismos que intervienen en el ajuste fino y selectivo, tanto local como sistémico, de la acción nuclear de los mensajeros endocrinos lipofílicos, como los esteroides, las yodotironinas, los retinoles y la vitamina D (Köhrle, 2007; Nobel et al., 2001; Solís-Sainz et al., 2010).

Las desyodasas comparten similitudes estructurales; todas ellas son homodímeros que conforman proteínas integrales de membrana de entre 29 y 33 kDa, y sus genes presentan una alta homología, especialmente en la secuencia que corresponde al sitio activo (Bianco et al., 2002; Gereben et al., 2008a; Orozco & Valverde, 2005). Por sus características catalíticas y operacionales se reconocen tres diferentes desyodasas: D1, D2 y D3. Los tres isotipos son proteínas integrales de membrana cuya ubicación subcelular (D1 y D3 en membrana plasmática, D2 en retículo endoplásmico), les permite regular de manera precisa

la biodisponibilidad intracelular de yodometabolitos activos e inactivos (Baqui et al., 2000; Bianco & Kim, 2006; Gereben et al., 2008b; Toyoda et al., 1995; Vivek-Sagar et al., 2008). Como se esquematiza en la **Figura 2**, las diferentes yodotironinas son producidas a partir de la T4 por la remoción secuencial y estéreo-específica de los átomos de yodo que ellas contienen. La desyodación del anillo externo (ORD, del inglés outer-ring deiodination) de la T4 y la T3, genera yodometabolitos activos (T3 y 3,5-T2, respectivamente) y por esta razón se conoce como la vía de activación. La vía ORD está catalizada por la D1 y la D2. Por el contrario, la desyodación del anillo interno (IRD, del inglés inner-ring deiodination), forma yodometabolitos inactivos (rT3, 3,5'-T2, 3,3'-T2) y por ello se conoce como la vía de inactivación. La vía IRD está catalizada por la D3 y D1 (Bianco & Kim, 2006; Solís-Sainz et al., 2010; St Germain et al., 2009). La expresión de estas enzimas es especie- y tejido-específica, así como variable durante las diferentes etapas del ciclo de vida de los organismos. Sin embargo, podemos resaltar los patrones de expresión conservados en diferentes especies de vertebrados: de la D1 en hígado y riñón, y la D2 y D3 en cerebro e hígado (Orozco et al 2012). Ahora bien, el papel fisiológico que cada una desempeña es específico; la D1 tiene un papel primordial en el reciclado de yodo al desyodar a la tironina inactiva rT3 y a las yodotironinas sulfatadas. En la mayoría de vertebrados la D2 es la fuente principal de T3 periférica, aunque en mamíferos la D1 también contribuye significativamente. Es importante mencionar que la homeostasis de los niveles circulantes de T3 no se mantiene únicamente con su producción en la glándula tiroidea y otros tejidos, si no también con la degradación de la misma. Este proceso de degradación catalizado por la D3 juega un papel crucial, especialmente durante el desarrollo, además de encontrarse altamente conservado en vertebrados (Darras and Van Herck, 2012).

La desyodación selectiva de las tironinas es un nivel de regulación crítico, el cual permite ajustar la cantidad precisa de hormona activa que ingresa a la célula, es decir, la biodisponibilidad intracelular. Es así que las desyodasas representan un componente esencial de la acción tejido-específica de las hormonas tiroideas.

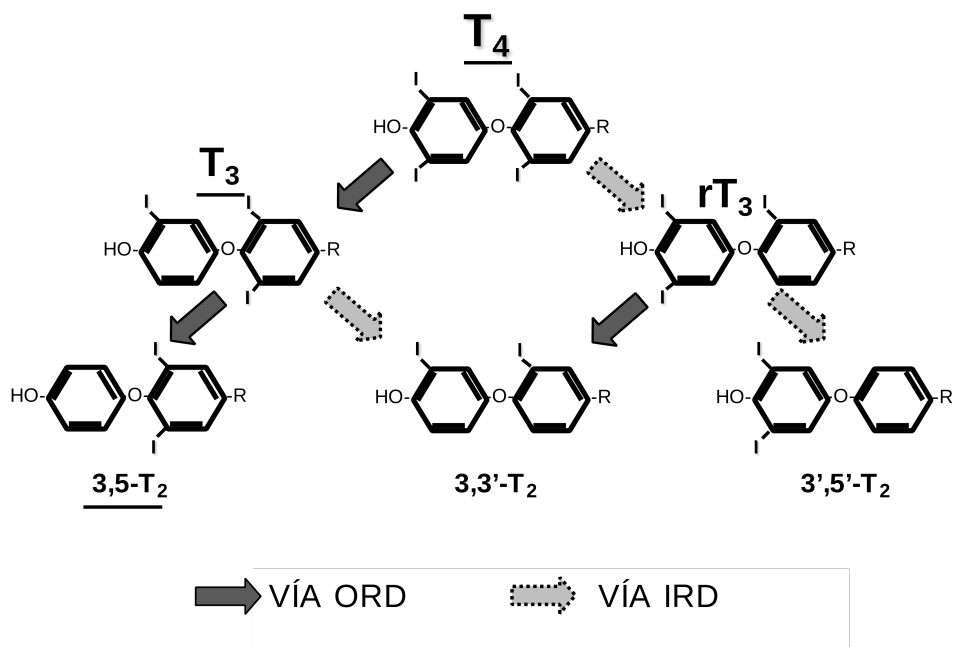


Figura 2. Vías de Desyodación de las Yodotironinas. A partir de la tetrayodotironina o T_4 , la desyodación secuencial del anillo externo (vía ORD) genera tironinas activas (T_3 y $3,5-T_2$). Por el contrario, la desyodación del anillo interno (vía IRD) da lugar a la formación de hormonas inactivas (rT_3 ; $3',5'-T_2$). Se muestran subrayadas las yodotironinas activas. (Modificada de Valverde *et al.*, 2004).

2.5. Mecanismos de acción de THs

El mecanismo de acción clásico de las THs comienza en el interior del núcleo celular y requiere de la participación de receptores en este compartimento. Estos receptores nucleares (NRs) son factores de transcripción dependientes de ligando, los cuales regulan la expresión de genes responsivos a THs. Aunado a este mecanismo clásico nuclear o genómico se encuentra el mecanismo extranuclear o no-genómico. Este mecanismo no-genómico depende de sistemas de transducción de señales y receptores de TH en la superficie celular (Goglia, 2005), aunque es importante señalar que estas acciones que comienzan como no-genómicas culminan en el complejo nuclear. En el presente trabajo se abordarán únicamente los mecanismos genómicos. Como se mencionó en la introducción, las THs regulan la expresión de genes en todos los vertebrados a través de la unión a sus NRs.

2.5.1. Receptores nucleares de THs

Los NRs son una superfamilia de proteínas que funcionan como factores de transcripción dependientes de ligando, las cuales se unen a secuencias específicas del DNA denominadas elementos de respuesta (REs) (Germain et al., 2006). El estudio filogenético de los NR ha situado su aparición muy temprano en la evolución de los metazoarios, antes de la divergencia de vertebrados e invertebrados. Siendo éstos los únicos factores de transcripción capaces de hacer un vínculo directo entre la regulación genética y el ambiente metabólico, se propone que tuvieron un papel importante en la diversificación de los metazoarios (Germain et al., 2006; Markov et al., 2011). A pesar de que su papel en la fisiología de todos los vertebrados es muy variado, presentando un amplio modo de acción y función, los NRs presentan una organización estructural altamente conservada evolutivamente, la cual consiste en seis dominios homólogos designados de la A a la F, partiendo del N-terminal al C-terminal de la proteína. El dominio N-terminal (NTD, dominio-A/B) presenta una estructura muy variada y contiene un dominio de transactivación constitutiva independiente de ligando, conocido como función de activación 1 (AF1); el dominio de unión al DNA (DBD, dominio-C), el cual es altamente conservado; la región bisagra (dominio-D) la cual confiere flexibilidad espacial a los receptores y une al DBD con la segunda región más conservada de los NRs que es el dominio de unión al ligando (LBD, dominio-E). Cabe resaltar que el LBD contiene la función de activación 2 (AF2) dependiente de ligando (Aagard et al., 2011). En la región C-terminal se encuentra el dominio F, éste presenta una gran variabilidad en su secuencia la cual es susceptible de modificaciones post-traduccionales como la fosforilación, dichas modificaciones modulan dinámicamente la actividad transcripcional cuando el receptor esta unido a su ligando (Pawlak et al., 2012).

En la mayoría de vertebrados, los receptores nucleares a hormonas tiroideas (TRs) son el producto de dos genes, THRA y THRB, los cuales codifican para diferentes isoformas α y β (Cheng et al, 2010). Algunas especies de teleósteos presentan una copia extra del gen TRHA; sin embargo, la estructura de los TRs se conserva en las diferentes especies de vertebrados (Holzer et al., 2017). El gen TRHA expresa dos isoformas principales: TR α 1 y TR α 2, las cuales difieren en su región carboxilo-terminal. Al contener un fragmento de aminoácidos adicional en el LBD, el TR α 2 es incapaz de unir T3, razón por la cual ejerce una función de dominante negativo al ocupar los elementos de respuesta en el promotor del gen blanco y así bloquear la transcripción. El gen TRHB también expresa dos isoformas principales, TR β 1 y TR β 2, las cuales difieren entre sí en la región amino-terminal pero ambas

isoformas son capaces de unir THs (Vella & Hollenberg, 2017). Estas isoformas presentan una distribución tejido-específica, siendo TR β 1 principalmente expresada en riñón, hígado, cerebro y corazón, TR β 2 en hipotálamo e hipófisis; mientras que la isoforma α 1 es mayormente expresada en cerebro de ratón, y la isoforma dominante negativa (α 2) en SNC en etapas tempranas del desarrollo para prevenir la transcripción prematura de genes. (Grøntved et al., 2015; Williams, 2000). En las diferentes clases de vertebrados, las diferentes isoformas de TRs descubiertas incluyen además algunas variantes del TR α en la región N-terminal, las cuales no tienen la capacidad de unir al DNA; una variante del TR β que no presenta región bisagra y tampoco se une al DNA. Se piensa que estas variantes son el resultado de “splicing” o edición alternativa, uso de promotores alternativos o diferentes codones de inicio (Nelson & Habibi, 2009).

Los TRs se unen al DNA formando heterodímeros con los receptores nucleares a retinoides tipo X (RXRs). Aunque en menor medida, también se han reportado heterodímeros con los receptores activados por proliferadores de peroxisomas. En el modelo clásico, en ausencia de ligando los TRs reprimen la transcripción de los genes blanco al reclutar proteínas correpresoras que compactan la hebra de cromatina, impidiendo la unión de la maquinaria de transcripción al DNA. Una vez que la TH se une a su receptor, este sufre un cambio de conformación causando el desplazamiento de los correpresores, lo que a su vez promueve la unión de coactivadores, promoviendo el remodelamiento de la cromatina hacia un estado laxo que permite la unión de la maquinaria de transcripción, culminando en la síntesis de proteína *de novo* (Grøntved et al., 2015).

2.5.2. Receptores nucleares de THs en teleósteos

En las diferentes clases de vertebrados los TRs se encuentran altamente conservados. En teleósteos las diferentes isoformas presentan una gran identidad en la secuencia de amino ácidos comparados con sus homólogos en mamíferos, siendo 86% para TR α y 85% para TR β . Únicamente en los peces, el gen de THRA presenta una copia extra en el genoma, sugiriendo su origen a partir de la duplicación del genoma entero que se presentó en la base de los teleósteos. El gen THRB no presenta esta duplicación, lo cual se podría explicar con dos hipótesis 1) la copia extra resultante de la duplicación del genoma se perdió muy temprano en la evolución, o 2) este gen no fue duplicado con el genoma (Marchand, 2001). A pesar de esta singularidad genómica del gen THRA, en la mayoría de peces

estudiados se ha demostrado la presencia de las isoformas canónicas del TR α y TR β . Sin embargo, una característica muy interesante en teleósteos es que todas las especies estudiadas presentan una isoforma de TR β 1 que contiene un inserto de 9 amino ácidos en el dominio de unión a ligando, razón por la cual se le denomina isoforma larga o L-TR β 1 en contraste con la isoforma corta o C-TR β 1 (**Figura 3**). Esta isoforma larga no se ha descrito en ninguna otra clase de vertebrado (Marchand, 2001; Habibi et al., 2012). Los ensayos iniciales para investigar la funcionalidad de estas dos isoformas demostraron que la isoforma larga tiene la misma afinidad hacia la T3 que la corta. En los teleósteos, la expresión de las diferentes isoformas de TRs también es tejido-específica y se modula a través del desarrollo, por lo que se ha planteado que este mecanismo permite regular la acción local de las THs (Darras et al., 2015). Otro mecanismo para regular la acción de las THs sobre el propio receptor es la capacidad de activarse a través de la unión de ligandos alternativos, lo cual se ilustrará con la siguiente sección.

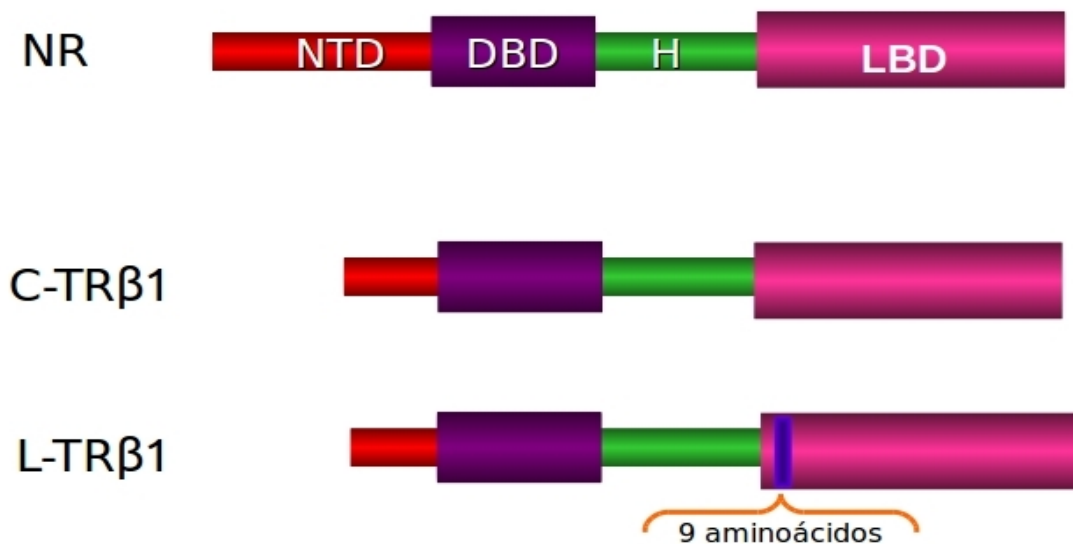


Figura 3. Esquema del TR β 1 en teleósteos. En la parte superior se ilustra la organización estructural de los receptores nucleares: en rojo la región N-terminal, en morado el dominio de unión al DNA, en verde la región bisagra, y en rosa el dominio de unión al ligando. En la parte inferior se representan las dos isoformas del receptor TR β 1 encontradas en peces, las cuales difieren únicamente por la presencia de un inserto de 9 aminoácidos en el LBD para la isoforma larga.

2.6. La T2 como ligando alternativo de TRs

Hasta hace poco a la T2 se le consideraba una hormona inactiva a nivel nuclear, esto debido a su baja afinidad por los TRs en mamíferos. A pesar de que se habían observado efectos de la T2 sobre la expresión de algunos genes regulados clásicamente por T3 en ratas, la idea de que era inactiva prevalecía debido a que tales efectos eran observados bajo dosis supra-farmacológicas hasta 100 veces mayores a T3. Como primer acercamiento para analizar la actividad nuclear de la T2 en otros vertebrados, en nuestro grupo de trabajo se utilizó un modelo de hipotiroidismo en el killifish (*Fundulus heteroclitus*). A los peces se les generó un hipotiroidismo farmacológico, y se mostró por primera vez que T2 en concentraciones equimolares a T3 (30 nM) restablece la expresión de varios genes regulados clásicamente por THs (García et al., 2007). También, en la tilapia se demostró que el tratamiento con T2 al igual que T3 estimula el crecimiento, y que además en experimentos *in vivo* y *ex vivo*, ambas tironinas regulan diferencialmente la expresión de las isoformas L-TR β 1 y C-TR β 1, respectivamente, sugiriendo que los efectos de ambas tironinas podrían estar mediados por éstas diferentes isoformas del receptor TR β 1 (Navarrete-Ramirez et al., 2014). Efectivamente, se demostró que T2 se une y transactiva únicamente al L-TR β 1, mientras que T3 se une preferencialmente al C-TR β ; a pesar de que estas dos isoformas difieren únicamente en el inserto de 9 amino ácidos en el LBD, la consecuencia funcional de este cambio genera plasticidad al permitir la unión de un ligando alternativo, la T2 en este caso.

La habilidad de T2 de transactivar en presencia de la isoforma larga se determinó con ensayos de unión y transactivación con diferentes mutantes del receptor. Se encontró que en la unión de T2 con el L-TR β el inserto de 9 aminoácidos interactúa con la región N-terminal del receptor (**Figura 4**), este mecanismo estabiliza la interacción ligando-receptor. En el caso de la T3, se encontró que esta hormona es capaz de unirse a ambas isoformas, teniendo una mayor afinidad por la isoforma corta y donde no se requiere una interacción de la región N-terminal con el LBD (**Figura 4**) (Mendoza et al., 2013). Además, se encontró también que la unión de T2 y T3 con sus respectivos receptores crea un cambio conformacional específico en el receptor, permitiendo la interacción con poblaciones de co-reguladores diferentes. Tal es el caso de la proteína co-reguladora Jab1 la cual ejerce una función ligando- e isoforma-específica, donde la interacción de L-TR β + T2 + Jab1 promueve la transactivación, no así en el caso de T3 unido al L-TR β (Hernández-Puga et al., 2017). Estos estudios sugieren que la

unión de un ligando alternativo genera un complejo funcional específico con el receptor, lo cual a su vez crea un cambio conformacional en este último exponiendo una superficie diferente en cada caso para interactuar con diferentes poblaciones de co-reguladores, teniendo al final un impacto plástico en la regulación de la expresión genética y en los diversos efectos tejido-específicos de las THs.

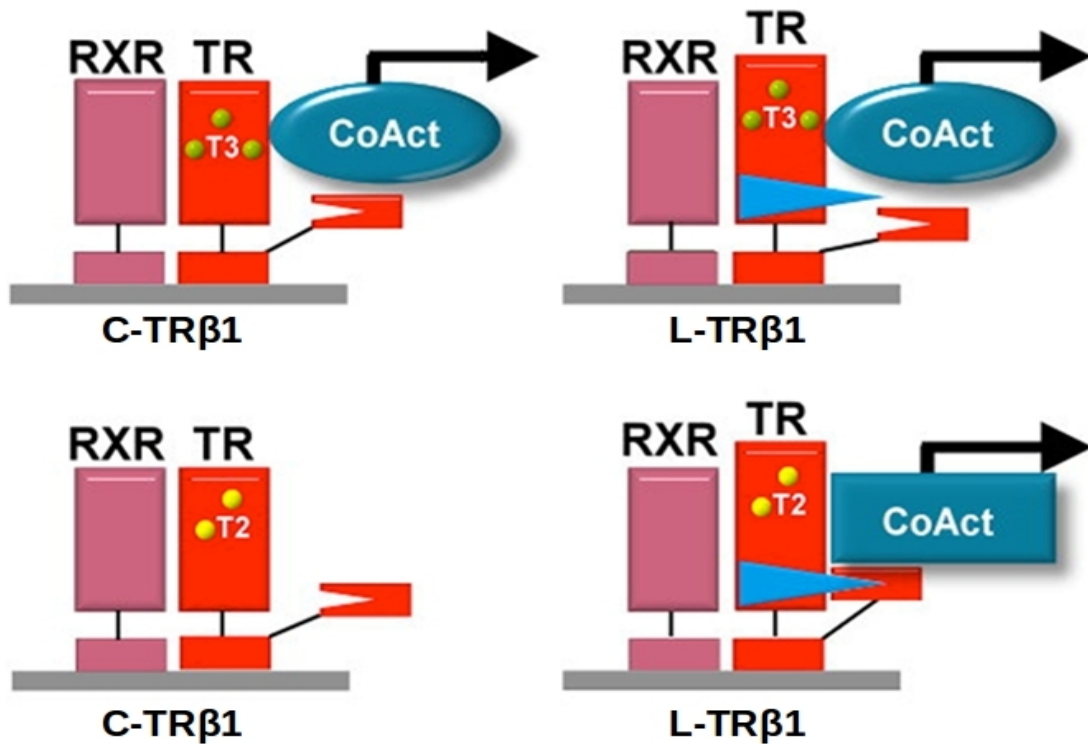


Figura 4. Esquema representativo de la acción de T2 y T3. En la figura se ilustra que T2 se une y transactiva únicamente a la isoforma L-TRβ1, mecanismo dependiente de la interacción de la región N-terminal con el inserto de 9 aminoácidos. También se ilustra la capacidad de unión y transactivación de la T3 con ambas isoformas, mecanismo independiente de la interacción con la región N-terminal (modificado de Mendoza et al., 2013).

3. Planteamiento del problema

Como se mencionó, la T2 es un derivado de la desyodación de la T3 y comparte la característica estructural de contener dos átomos de yodo en el anillo interno de su molécula. Durante muchos años la T2 se consideró un metabolito sin efectos genómicos debido a su baja afinidad por los TRs en humano. En nuestro laboratorio hemos observado en teleósteos que, al igual que la T3, la T2 regula la expresión de genes y promueve el reclutamiento de diferentes poblaciones de correguladores (García-G. et al., 2007). Además, encontramos la expresión de dos isoformas del TR β 1 que difieren en la presencia (largo: L-TR β 1) o ausencia (corto: C-TR β 1) de un inserto de 9 aminoácidos en el dominio de unión al ligando, que presentan distinta capacidad de transactivación en presencia de una u otra TH activa. Así, el L-TR β 1 es significativamente más activo en presencia de T2, mientras que la actividad del C-TR β 1 ocurre únicamente en presencia de T3 (Mendoza et al., 2013). En la tilapia, la evaluación independiente de la expresión de una u otra isoforma mostró que los niveles de mRNA de L-TR β 1 son más altos que los de C-TR β 1, sugiriendo que L-TR β 1 modula la mayoría de los efectos de las TH al menos en esta especie. Además, encontramos que T2 regula la expresión de L-TR β 1, mientras que T3 regula la de C-TR β 1, sugiriendo que cada TH tiene una vía de señalización independiente. Así, en el presente estudio planteamos la siguiente hipótesis de trabajo:

4. Hipótesis

La 3,5-T2 presenta una vía de señalización diferente de la T3, regulando la transcripción de una población de genes distinta.

Al plantear esta hipótesis nos surgieron las siguientes preguntas:

¿Regula la 3,5-T2 un conjunto de genes distintos a los de la T3?

1. ¿Hay genes que se regulan por ambas, T2 y T3 o únicamente por una u otra TH?
2. ¿Los niveles de expresión de los genes regulados por TH son similares en diferentes tejidos?
3. ¿Los patrones de respuesta a T2 y/o T3 son similares? ¿La respuesta a una u otra tironina es tejido-específica?

4. ¿Hay procesos biológicos o vías de señalización que se regulen específicamente por T2 o T3 o por ambas THs? Y de ser el caso ¿Es esta regulación tejido-específica?

Para contestar estas preguntas se plantearon los siguientes objetivos:

5. Objetivo General:

Identificar la expresión diferencial de genes regulados por la 3,5-T2 y la T3 en hígado, cerebelo y tálamo-hipófisis, en animales juveniles de tilapia.

Objetivos específicos:

1. Establecer la cantidad de genes que responden a T2 y/o a T3.
2. Determinar las similitudes y diferencias de la expresión de genes en los diferentes tejidos.
3. Identificar en cada tejido los patrones de expresión en respuesta a T2 y T3.
4. Identificar las vías de señalización y procesos biológicos afectados por los genes regulados por T2 y/o T3.

6. Material y Métodos

Animales.

Se utilizaron tilapias (*Oreochromis niloticus*) juveniles aproximadamente 4 meses de edad (4 a 6 gr), sexualmente indiferenciadas para evitar el dimorfismo. Los animales fueron donados por la Unidad de Cuarentena de Tilapia y Bagre de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, México. Los peces se mantuvieron en el bioterio del INB en estanques con agua corriente dulce y se alimentaron con hojuelas comerciales (Sera Marin, Sera, Alemania). Los peces se mantuvieron durante un mes antes del inicio del experimento en condiciones de temperatura de 25°C bajo ciclos de luz-oscuridad de 12:12 h. En todos los casos, después del tratamiento experimental, los animales se eutanizaron por decapitación y se extrajeron hígado, cerebelo y tálamo/hipófisis, los cuales fueron colocados inmediatamente en TRIZOL y almacenados a -80°C hasta su posterior análisis. El manejo de animales se realizó conforme a los estándares humanitarios establecidos de cuidado animal y los protocolos y procedimientos experimentales fueron revisados y aprobados por el Comité de Bioética del Instituto de Neurobiología, UNAM.

Diseño experimental.

Con la finalidad de analizar la expresión de genes en respuesta a T2 o T3, inicialmente se realizaron curvas de dosis- y tiempo-respuesta para determinar las condiciones experimentales óptimas de tratamiento, los cuales fueron realizados siguiendo un protocolo de inmersión usado rutinariamente en nuestro laboratorio. En este caso particular, la concentración final de la hormona se colocó en un volumen de 10 litros.

Inicialmente se determinaron las condiciones experimentales óptimas que permitieran detectar cambios en la expresión de algunos genes clásicamente responsivos a T3. Se resolvió utilizar una concentración de 25 nM de una u otra hormona por 12 h. Para obtener las muestras para la secuenciación del transcriptoma, así como las que se utilizaron en los experimentos de verificación, se trataron 8 (transcriptoma) o 12 (verificación) animales por grupo experimental usando las condiciones determinadas en los ensayos iniciales. De estos animales se obtuvieron dos muestras biológicas de cada tejido y para cada grupo.

Disecciones del cerebro. Debido a que el cerebro completo es un tejido muy heterogéneo, se decidió elegir regiones específicas, con el criterio de su capacidad de respuesta a THs. Se realizaron disecciones y se analizó la respuesta en la expresión de las isoformas L-TR β 1 y C-TR β 1 en grupos de tilapias (n=4/grupo experimental) expuestas a 25 nM T3 o T2 por 24h. Tomando en cuenta la abundancia de la expresión de los TRs se eligió la región tálamo/hipófisis para los experimentos subsecuentes (datos no mostrados).

Extracción del RNA.

Se extrajo el RNA total de los hígados individuales (n=2 por grupo en el caso de la secuenciación, n=3 en el caso de la cuantificación del mRNA), y de las regiones del cerebro, para las cuales se realizó un “pool” de 4 individuos (n=2 replicas por grupo de un total de 8 individuos en el caso de la secuenciación; n=3 replicas por grupo de un total de 12 individuos en el caso de la cuantificación del mRNA), utilizando el reactivo de TRIZOL (Invitrogen), según las indicaciones del fabricante. La pureza del RNA fue valorada en geles de agarosa al 1% y la concentración fue medida través del espectrofotómetro Nano-Drop ND-1000 UV-Vis a 260 nm (Nano Drop Technologies). En el caso de la secuenciación, la integridad se evaluó a través del Bioanalyzer Agilent 2100 con un valor numérico integrado de RNA (RIN) mínimo de 7 (media 8.03, DE \pm 0.39).

Cuantificación absoluta de mRNAs.

Obtención de cDNAs. Se realizó la obtención del DNA complementario a partir de una misma concentración de RNA total (2 μ g), para todas las muestras experimentales. Se utilizó la enzima transcriptasa reversa (Gibco, BRL), y un oligo dT para la obtención del cDNA. En el caso del mRNA de la D2 y debido a que este transcrito contiene más de 3 Kb de extensión en su UTR, se utilizó un oligonucleótido anti-sentido específico complementario a una región del extremo 3' cercana al codón de término del mRNA de la secuencia de esta desyodasa (TTCAGAGCTCATCTACTATCGT).

PCR en tiempo real. Para analizar el efecto de T2 ó T3 sobre la transcripción génica, en los experimentos previos se eligieron los siguientes genes: D2 (Desyodasa tipo 2, regulado negativamente por THs), GH (regulado positivamente por THs); y C- TR β 1 y L-TR β 1

(regulados diferencialmente por T3 y T2). La cuantificación de los mRNAs se realizó por duplicado utilizando la modalidad de PCR en tiempo real, utilizando una curva de concentración previamente estandarizada para cada gen. En todos los casos la reacción incluyó 1 μ L de cDNA, 6 μ L del reactivo SYBR Green Real-Time PCR Master Mix y 500 nM de los oligonucleótidos específicos sentido y antisentido (**Tabla suplementaria 1**), en un volumen final de 12 μ L. La detección y el análisis de datos se realizó con un aparato Step One Real-Time PCR System (Applied Biosystems®) 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 del mRNA de β -actina de cada muestra y se expresan como número de moléculas por μ g de RNA total.

Secuenciación masiva del mRNA

Preparación de bibliotecas de cDNA y secuenciación. Las bibliotecas fueron generadas usando el kit de preparación de muestras Illumina TruSeq RNA (Illumina) siguiendo las instrucciones del fabricante. La secuenciación de las muestras se realizó en la Unidad de Secuenciación Masiva del Instituto de Biotecnología de la UNAM, mediante el Genome Analyzer GAIIx (Illumina) sobre fragmentos de 400pb con una configuración de extremos pareados de 72 pb de longitud.

Análisis del transcriptoma. Se realizó un control de calidad (QC, por sus siglas en inglés) de las "lecturas" crudas usando el software FASTQ (Andrews, 2010); las secuencias del adaptador, así como la contaminación fueron removidas utilizando 'scripts' de Perl fabricados manualmente. Las lecturas limpias fueron mapeadas al genoma de referencia, que en este caso fueron las secuencias codificantes de *Oreochromis niloticus* (Orenil1.0.cds.all) obtenidas de la base de datos de Ensembl a través de BioMart, usando Bowtie aligner 1.1.2 (Langmead et al., 2009). A través de las paqueterías del software eXpress 1.5 (Roberts & Pachter, 2013) se cuantificó la abundancia de los genes expresados. Una vez cuantificados, se utilizaron las cuentas totales efectivas con las cuales se generó una matriz usando un 'script' de Perl incluido en la paquetería de Trinity (Grabherr et al., 2011) para analizar la expresión diferencial mediante el bioconductor EdgeR (Robinson et al, 2010) corriendo el script "run_DE_analysis.pl". Se realizaron comparaciones pareadas para cada muestra (Control vs T2 o Control vs T3, cada uno con su respectiva replica biológica). Como criterio de selección

de genes regulados diferencialmente, utilizamos aquellos que tuviesen un “false discovery rate” (FDR) y valor de p ajustado (p_{adj}) respectivamente, menor a 0.05.

Ontología genética. Para analizar aquellas vías/interacciones afectadas por el tratamiento con T2 y T3 se utilizó el software Pathway Studio V9 (Elsevier, Inc., Rockville, MD, USA) operando con la base de datos ResNet 9.0 “Ariadne”. Para evitar la pérdida de información valiosa, como criterio de selección no se aplicó la FDR; se utilizaron aquellos genes diferencialmente expresados con $p \leq 0.05$. El análisis de enriquecimiento en Pathway Studio V9 fue realizado con los algoritmos “*gene set enrichment analysis*” (GSEA) y “*sub-network enrichment analysis*” (SNEA) usando el Mann-Whitney test con $p \leq 0.05$. Estos conjuntos de genes son definidos basado en un conocimiento biológico previo de ontología genética y vías ya estudiadas. La colección de vías de referencia analizadas “Ariadne” incluye procesos celulares, vías metabólicas y categorías de ontología genética para procesos biológicos y funciones moleculares. Esta base de datos está construida principalmente con datos de mamíferos, conteniendo también información específica de teleósteos. Aunque hay diferencias claras entre peces y mamíferos, y también que hay algunos genes que tienen ya sea papeles diferentes o únicos en las especies, se considera que la mayoría de las funciones de los genes es conservada en los vertebrados.

Análisis de grupos de genes. El agrupamiento fue llevado a cabo con un clasificador simple, donde los valores de expresión normalizados son escalados de tal manera que la suma de los valores de expresión entre los tratamientos (media entre replicas biológicas) es 0 y la desviación estándar es igual a 1.

$$E = \frac{x - \bar{x}}{SD}$$

Los perfiles de expresión resultantes describen eficientemente el tipo de respuesta de los genes independientemente de los valores de expresión absoluta.

PCR de verificación. Como método de validación del RNA-seq se realizó una cuantificación absoluta como se describió anteriormente. Se seleccionaron 6 genes (uno por tratamiento y tejido) todos regulados a la alta, en cerebelo LUC7-I por T2 y USP40 (ubiquitin specific peptidase 40) por T3; en tálamo/hipófisis APC11 (anaphase promoting complex subunit 11)

por T2 y Anserinase por T3; en hígado Sequestosome 1 por T2 y ATPase H+/K+ por T3. Además, con la finalidad de monitorear el estatus tiroideo en los tejidos, se cuantificaron también 6 genes relacionados a la fisiología tiroidea: L-TR β 1, C-TR β 1, TR α , MCT8, D2 y D3. Los oligonucleótidos utilizados se listan en la **tabla 1**.

gen	oligonucleotido 5'--> 3'	Protocolo de PCR	producto
Luc7-like	fw GGAAGCTTCACCTCGGCTT	10s a 95°, 10s a 60°C, 10s a 72°C por 40 ciclos	107 bp
	rv TCGTCTCTTTAAGCGCTCCT		
USP40	fw CGTCTGCAAGGAGTGTGGAA	10s a 95°, 10s a 60°C, 10s a 72°C por 40 ciclos	154 bp
	rv TGCACAGCGGTACAGGTTAT		
APC11	fw GGTCAGTGCTCCCCTGTTT	10s a 95°, 10s a 60°C, 10s a 72°C por 40 ciclos	118 bp
	rv AGTCATCTCCCGCCTTGAAC		
Anserinase	fw CCTTCCATCCTGCTGCTCAT	10s a 95°, 10s a 60°C, 10s a 72°C por 40 ciclos	134 bp
	rv TTGCTGGAGTCGCTTTTCGAT		
Sequestosome 1	fw GAGCATACGAGCAGTGAGGG	10s a 95°, 10s a 60°C, 10s a 72°C por 40 ciclos	108 bp
	rv CTGTCCCGTCAGGATCAGC		
ATPase H+/K+ ex.	fw GCCTCCAGTGTCTCATGTGG	10s a 95°, 10s a 60°C, 10s a 72°C por 40 ciclos	141 bp
	rv AACAAACCGGTTACCACGACA		
THRB (isoforma larga)	fw GTGAAGGAAGCTAAGCCTGA	10s a 95°, 10s a 61°C, 10s a 72°C por 40 ciclos	232 bp
	rv CACAAGGCAGCTCACAGAAC		
THRB (isoforma corta)	fw GCGGAAATTCCTGCCTGAG	10s a 95°, 10s a 61°C, 10s a 72°C por 40 ciclos	135 bp
	rv GCAGCTCACAGAACATGGGC		
THRA	fw GCAGGACTCTAACCCATCA	10s a 95°, 10s a 61°C, 10s a 72°C por 40 ciclos	96 bp
	rv GTCATGCTCTTACCGAACA		
MCT8	fw GCTAACGTTCAAGCCTCTGC	10s a 95°, 10s a 61°C, 10s a 72°C por 40 ciclos	134 bp
	rv ACTCGGTATGTGACGATGTGA		
D2	fw GAAACTTGGCTGTGAGGC	10s a 95°, 10s a 61°C, 10s a 72°C por 40 ciclos	249 bp
	rv CTCGTCGATGTAGACCAG		
D3	fw GCATCGCTGTTTGAAGACAG	10s a 95°, 10s a 61°C, 10s a 72°C por 40 ciclos	125 bp
	rv TCTCAAAGTAGGCTCCGTACG		
β -ACTIN	fw ACTTCCGAGCAGGAGATGG	10s a 95°, 10s a 61°C, 10s a 72°C por 40 ciclos	170 bp
	rv GGTGGTTTCGTGGATTCC		

Tabla 1. Secuencias y características de oligonucleótidos usados en el protocolo de PCR en tiempo real.

7. Resultados

Los resultados se publicaron en un artículo de acceso abierto en la siguiente liga, donde también se puede acceder a todo el material suplementario.

<https://www.nature.com/articles/s41598-017-14913-9>

Curva dosis- y tiempo-respuesta. Con el objetivo de encontrar el protocolo de exposición adecuado donde observáramos efectos claros sobre la transcripción de genes, en experimentos previos se realizaron ensayos variando las dosis (10, 25, 50 y 100 nM) y tiempo (6, 12 y 24 h) de exposición. Como se ilustra en la **figura 5**, se determinó que la dosis óptima es de 25 nM para ambas tironinas, ya que pudimos observar un efecto diferencial en la expresión de la D2 en hígado comparado contra el control. El tiempo mínimo de exposición donde se observaron efectos claros en la expresión de genes con ambas tironinas fue de 12 h (no mostrado), por lo que se eligió este tiempo de exposición.

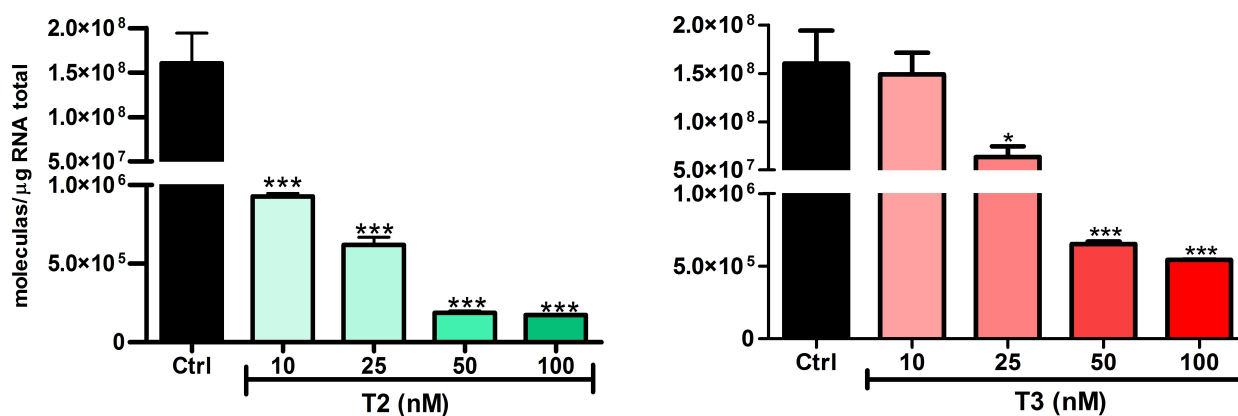


Figura 5. Curva dosis-respuesta. Concentración (moléculas/μg RNA total) del mRNA de la D2 en hígado de animales tratados con distintas concentraciones de T2 ó T3.

Disecciones del cerebro. Con el fin de seleccionar 2 regiones del cerebro para realizar la secuenciación masiva, en experimentos previos se analizó la respuesta en la expresión génica tratando a grupos de tilapias con 25 nM T3 o T2 por 24 h. Se cuantificó la expresión de los genes L-TRβ1 y C-TRβ1 en diferentes regiones del cerebro. Encontramos que la

expresión de los receptores es diferente para cada región, que la expresión de la isoforma larga es mucho más abundante que la corta, sugiriendo un papel relevante en el SNC. Elegimos cerebelo y tálamo-hipófisis como las regiones a analizar por las siguientes razones: 1) La expresión de la isoforma larga (mediadora de los efectos de la T2) y corta es abundante en ambos tejidos, y 2) La disección anatómica de ambas regiones resulta sencilla en relación a que se extrae limpiamente, es decir sin contaminación de otras regiones. Tomando en cuenta la abundancia de tipos celulares presentes en el SNC, y como estos varían de región a región, delimitar el área de estudio resulta conveniente al reducir la variabilidad de la respuesta.

Se procedió a preparar las muestras para la secuenciación masiva del mRNA. Se trataron grupos de tilapias (n=8/grupo experimental) con una concentración de 25 nM de una u otra tironina durante 12 h. Las muestras de hígado seleccionadas se prepararon individualmente (n=2/grupo experimental); mientras que, como se mencionó, para obtener el RNA necesario en el cerebro se requirió la preparación de un pool con 4 individuos. En la **tabla 2** se resumen las características del RNA enviado a secuenciación.

Tx	Tejido	A260:280	µg/µL	µg RNA/tubo	RIN
T2-1	Hígado	1.96	825	82.5	7.6
T2-2	Hígado	1.88	1294	129.4	7.5
T3-1	Hígado	1.81	981	196.2	8
T3-2	Hígado	1.93	810	81	7.5
C-1	Hígado	1.97	775	77.5	7.2
C-2	Hígado	1.94	1016	101.6	7.9
T2-1	Tálamo	1.97	577	23.08	7.8
T2-2	Tálamo	1.93	559	22.36	8.2
T3-1	Tálamo	1.9	389	15.56	8.5
T3-2	Tálamo	1.89	383	15.32	8.6
C-1	Tálamo	1.9	666	26.64	8.3
C-2	Tálamo	1.88	647	25.88	8.5
T2-1	Cerebelo	1.9	256	10.24	8.1
T2-2	Cerebelo	1.85	459	18.36	8.4
T3-1	Cerebelo	1.91	259	10.36	8.1
T3-2	Cerebelo	1.86	240	9.6	8
C-1	Cerebelo	1.91	268	10.72	8.3
C-2	Cerebelo	1.98	272	10.88	8.2

Tabla 2. Características del RNA. Se muestra el tratamiento que se administró a los organismos, el tejido de donde se extrajo el RNA así como su pureza y concentración.

Análisis del Transcriptoma. A las secuencias obtenidas se les realizó un análisis de calidad, y con la finalidad de identificar los transcritos las lecturas resultantes fueron mapeadas al

genoma de referencia (secuencias codificantes de tilapia). La estadística de secuenciación y mapeo se muestran en la **tabla suplementaria 1**. De los transcritos resultantes utilizamos las cuentas efectivas (abundancia) obtenidas a través del programa eXpress, esto para realizar el análisis de expresión. Los datos de la expresión diferencial fueron obtenidos a través del conductor edgeR, donde se compararon los niveles de expresión del grupo de tratamiento hormonal (T2 ó T3) contra su control (grupo no tratado) (**Figura 6**). En los tres tejidos se encontraron genes que están siendo regulados por T2 y por T3, un total de 169 en cerebelo, 154 en tálamo/hipófisis y en el caso del hígado se observa claramente que la respuesta a ambos tratamientos es mucho mayor, con 2863 genes regulados.

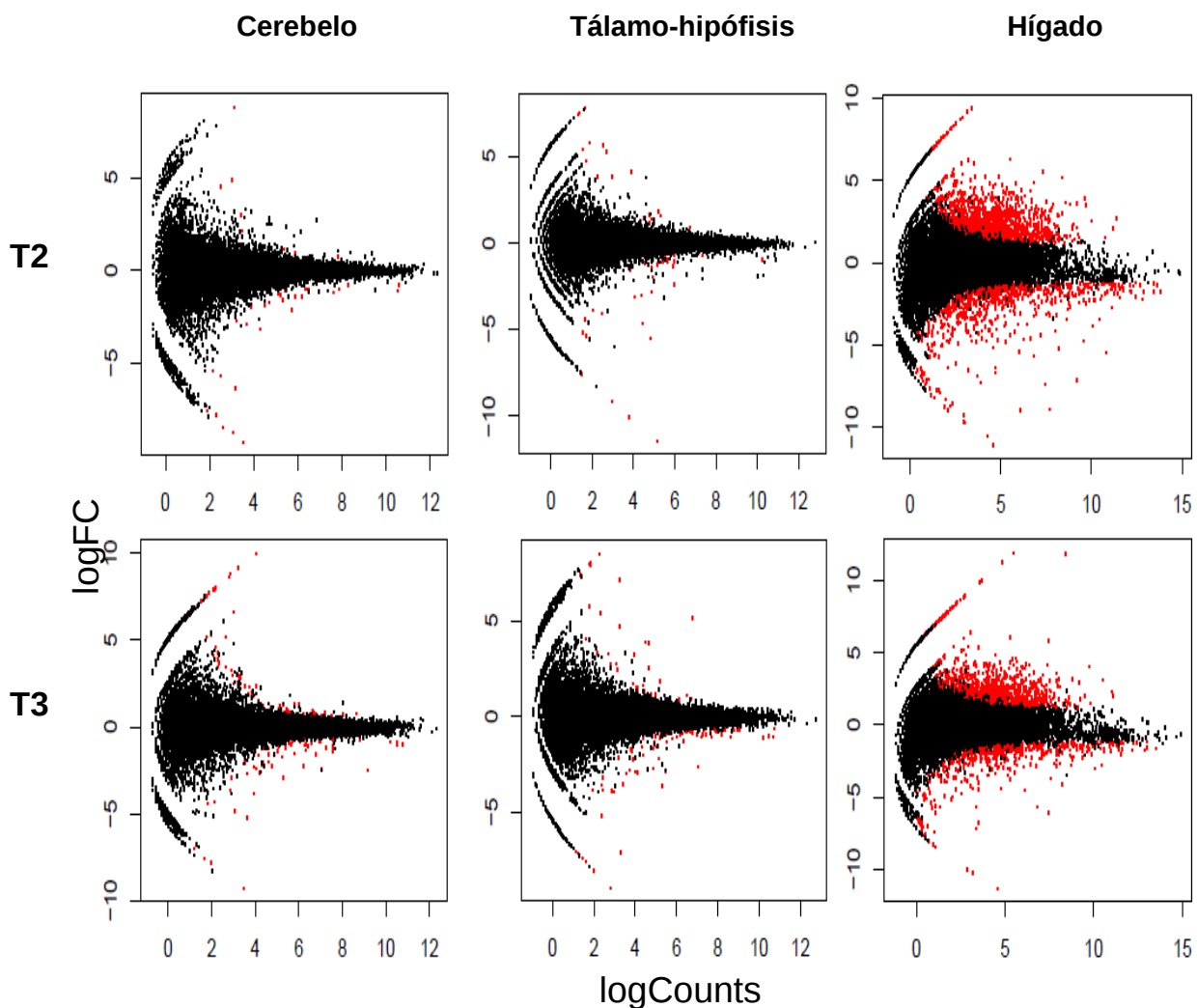


Figura 6. MA plot de genes diferencialmente regulados por T2 y T3. Los datos representan la respuesta individual del gen (puntos) graficada como la tasa de cambio ($logFC$, **M**) contra la media de las cuentas totales para cada gen ($logCounts$, **A**), $FDR < 0.05$ o diferencias significativas son resaltados con rojo. Un cambio negativo representa los genes regulados a la baja y un cambio positivo los genes regulados a la alta.

Para realizar un análisis más detallado se clasificaron los genes que se regulan a la alta y a la baja, así como también los genes que responden a ambos tratamientos o son regulados específicamente por una de las dos tironinas. Como se muestra en la **figura 7**, en cada tejido se encontraron genes que responden específicamente a un solo tratamiento, así como genes que muestran una redundancia al ser reguladas por ambas tironinas. Ésta especificidad se encontró en mayor proporción en SNC, ya que en hígado se observa que hay una mayor proporción de genes de regulación redundante. Como se mencionó, en hígado se encontró un mayor número de genes responsivos a THs que en SNC, y en el mismo sentido en hígado la mayoría de estos fueron regulados a la alta, mientras que en SNC la mayoría fueron regulados a la baja. Más aún, de estos genes responsivos a THs hay un mayor número que se regulan por T3 en ambos tejidos de sistema nervioso central (SNC), ocurriendo lo contrario en hígado dónde la mayor cantidad de genes responsivos son T2 dependientes (**Figura 7**).

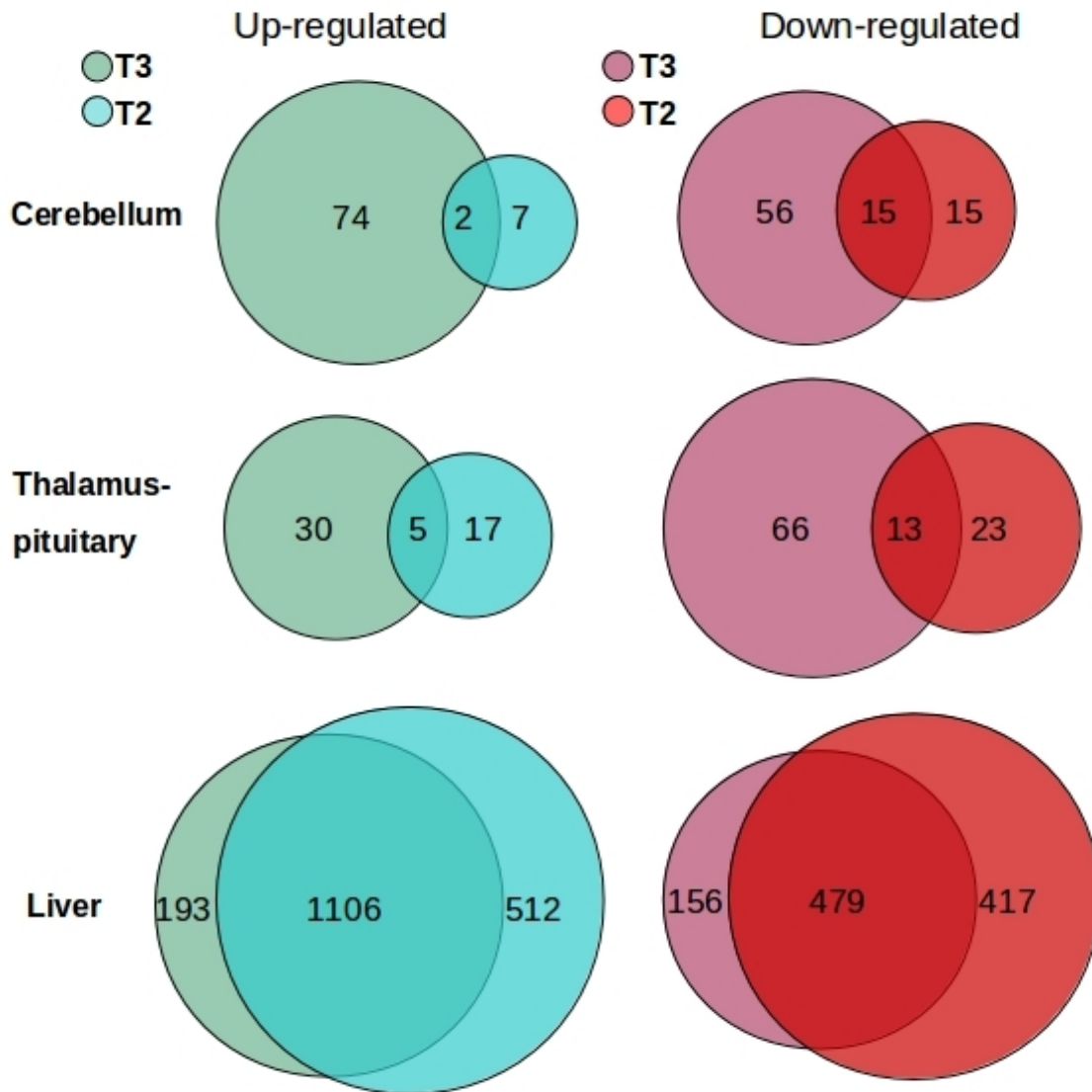


Figura 7. Genes regulados por T2 o T3. Diagramas de venn que representan el número de genes regulados a la alta en verde y a la baja en rojo. La intersección entre T2 y T3 representa los genes que se regulan por ambos tratamientos mientras que la diferencia representa los genes regulados específicamente por el tratamiento. En hígado hay un mayor número de genes que responden a THs comparado con SNC.

Posteriormente realizamos una búsqueda del patrón de regulación de genes clásicamente involucrados en la fisiología tiroidea, como es el caso de la D2 y el TRβ1 cuya expresión ha sido reportada previamente (Mendoza et al., 2013; Navarrete et al., 2013). Entre estos genes,

solo encontramos al transportador de hormonas tiroideas MCT8 regulado significativamente a la baja por T2 en hígado (FDR < 0.05). Otros genes como las desyodasas 2 y 3 (D2 y D3), o TR α y TR β , no presentaron diferencias estadísticamente significativas en su expresión; sin embargo, la tendencia encontrada en su respuesta, así como el patrón tejido-especifico fue lo esperado.

Patrones de expresión en respuesta a los tratamientos con THs. Se realizó un análisis de agrupamiento jerárquico de la tasa de cambio o LFC, para determinar los patrones de expresión globales de los transcritos en los diferentes tejidos (**Figura 8**). Se observaron patrones claros de expresión como resultado de los tratamientos con THs. Estos patrones, también fueron tejido-específicos, y los transcritos del SNC se agruparon más cercanamente comparados con el hígado, como era esperado.

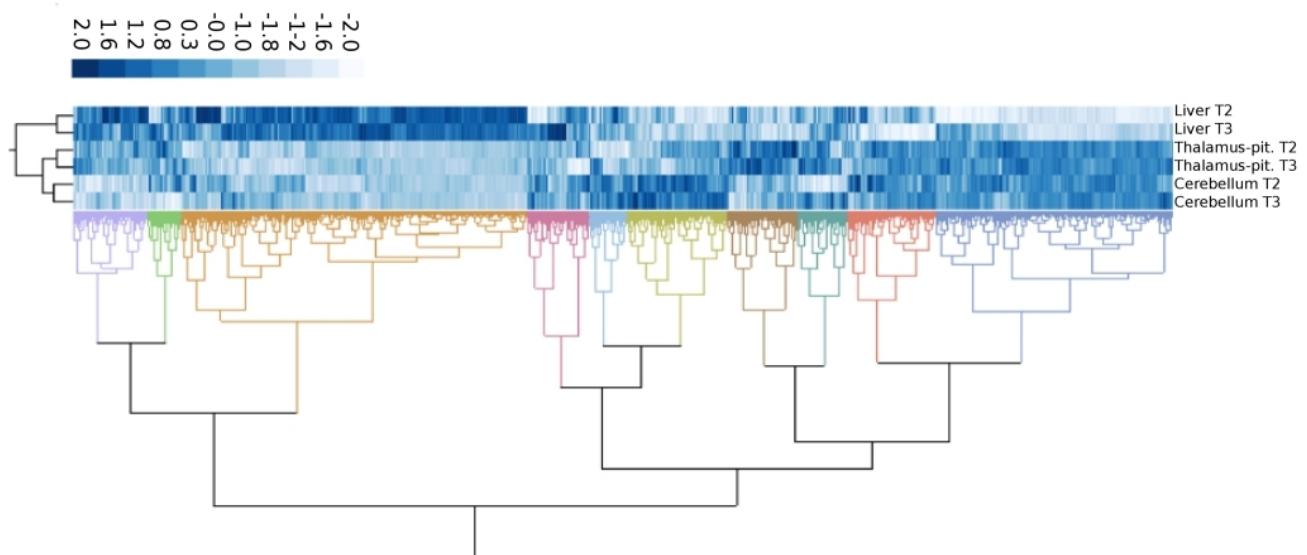


Figura 8. Patrones globales de expresión en respuesta a los tratamientos con THs. Mapa de calor de agrupamiento jerárquico realizado con la tasa de cambio logarítmica (logFC), a la baja (azul oscuro) y a la alta (azul claro), por tejido.

Con el objetivo de alcanzar un análisis que nos proveyera de información más detallada, realizamos otro análisis de agrupamiento. Normalizando los valores de logFC de la expresión génica, el valor resultante fue utilizado para comparar los grupos tratados con THs contra el grupo control (**Figura 9**). El beneficio de este acercamiento es reducir el ruido de los falsos

positivos o negativos, y describir con mayor precisión las respuestas biológicas.

Como se puede apreciar en la **figura 9a**, primero nos enfocamos en los genes que son regulados por ambas hormonas los cuales se denominarán regulados por THs. El análisis muestra claramente que el número total de genes regulados por THs, ya sea a la alta o a la baja, fue similar en los tejidos de SNC, mientras que el hígado presenta una respuesta transcripcional mayor. Otra particularidad tejido-específica observada fue el hecho de que en SNC e hígado se observaron tendencias opuestas, mientras que en SNC la mayoría de genes regulados a la baja por THs, en hígado la mayoría se encontraron regulados a la alta. Después nos enfocamos en aquellos genes que también presentaron una regulación por ambas tironinas, pero que diferían en la amplitud de respuesta (**Figura 9b**). Estos genes representan solo algunos en SNC (~20 genes), mientras que en hígado hay una mayor cantidad (~270 genes). Notablemente, las respuestas en la transcripción fueron mayoritariamente tejido- y hormona-específica. Por ejemplo, T3 indujo la regulación a la baja más intensa en el tálamo-hipófisis, pero no en el hígado, y T2 indujo una respuesta más intensa a la alta en el hígado, pero no así en los tejidos de SNC. El análisis de agrupamiento también reveló que hay grupos de genes que se regulan de manera opuesta con T2 y T3, a la alta o baja (**Figura 9c**), aunque el número de genes perteneciente a estos grupos fue muy reducido. Finalmente, un número significativo de genes (alrededor de 380 en el hígado), mostró una respuesta específica en la regulación por una u otra hormona (**Figura 9d**), apoyando la hipótesis de que la T2 y la T3 regulan redes específicas de genes en diferentes tejidos de los teleósteos.

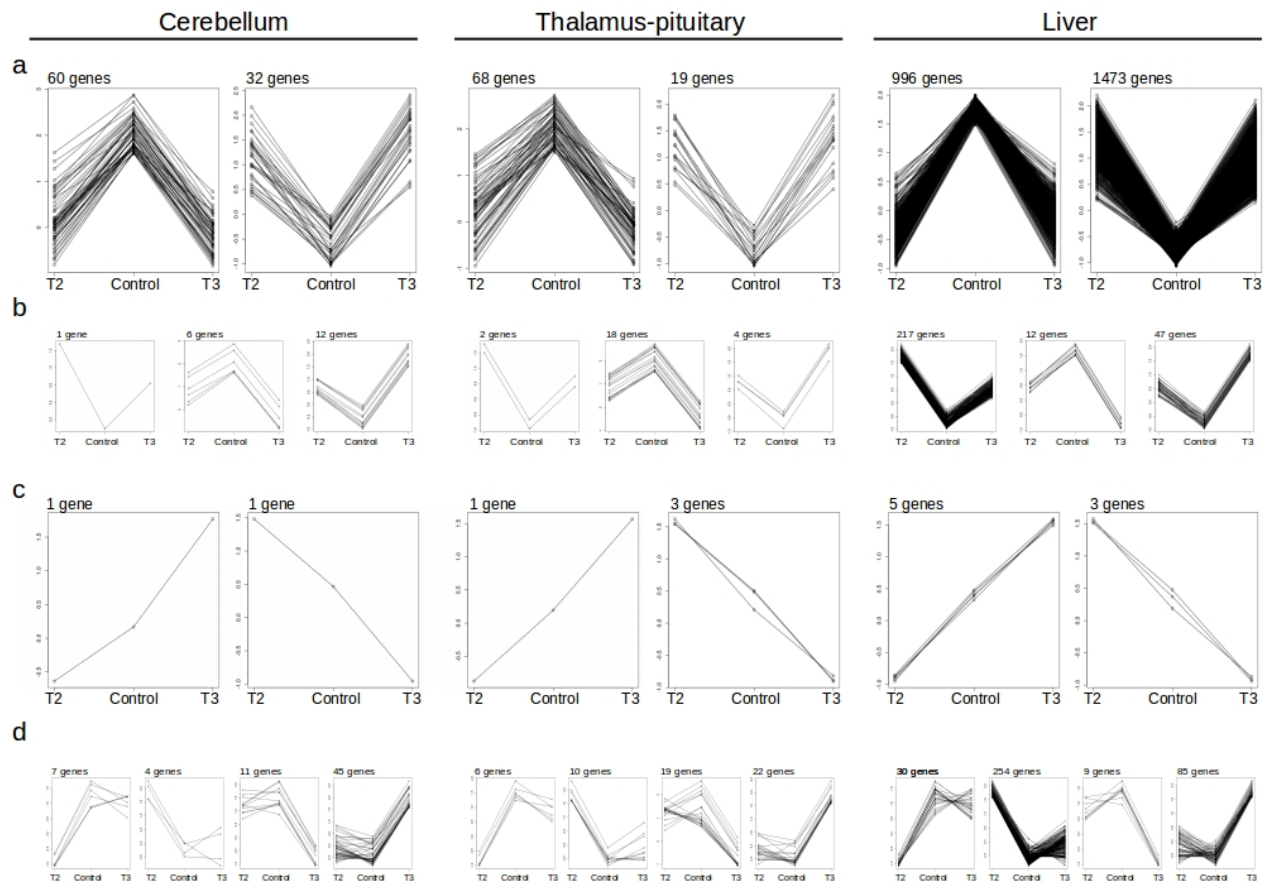


Figura 9. Patrones de expresión específicos en respuesta a los tratamientos con THs. Análisis de agrupamiento de la tasa de cambio logarítmica ($\log FC$), normalizada y escalada en el eje Y, comparando el tratamiento de THs contra el control (eje X). a) Grupo de genes regulados en la misma dirección, a la baja (cuadro izquierdo) o a la alta (cuadro derecho) por T2 y T3. b) Grupo de genes regulados en la misma dirección con diferente magnitud de respuesta. c) Grupo de genes regulados en diferentes direcciones por T2 y T3. D) Grupo de genes regulados específicamente por T2 o T3.

Ontología genética. Para analizar aquellas vías/interacciones afectados por el tratamiento con T2 y T3 se utilizaron las listas de genes regulados diferencialmente y se realizó un análisis de enriquecimiento (GSEA y SNEA), análisis que nos dan información acerca de las vías de señalización anotadas y las redes de interacción entre genes respectivamente. Los resultados nos arrojaron listas de vías e interacciones que se agruparon manualmente en “temas principales” o procesos biológicos generales. Como se muestra en las **tablas 3 y 4**, identificamos vías en las cuales participan únicamente genes que fueron regulados exclusivamente por T2 o por T3, las cuales denominamos vías específicas. Dentro de este contexto, T2 está involucrado principalmente en vías relacionadas a la señalización celular y a

la transcripción; mientras que T3 participa principalmente en la señalización celular, sistema inmune y también metabolismo de lípidos. Las vías reguladas por ambas hormonas incluyen transcripción, traducción, replicación y reparación del DNA, metabolismo de lípidos, metabolismo de aminoácidos, entre otros (**Tabla 5**). Principalmente en el hígado, ambas hormonas convergen regulando las mismas vías.

Realizamos esta aproximación también a los grupos de genes que se agruparon según su respuesta al tratamiento (**Figura 9**). El análisis nos reveló que el grupo de genes regulados a la baja por THs participan en la mayoría de vías enriquecidas dentro de los tres tejidos (**Tabla 6**), sugiriendo que es una respuesta redundante entre las hormonas lo cual correlaciona con el número de genes diferencialmente expresados en este grupo. Analizando las vías que son enriquecidas en los grupos de genes, nos encontramos también con respuestas tejido-específicas; por ejemplo, el metabolismo energético y de carbohidratos fueron encontrados en el hígado. Más aún, aquellos grupos de genes que respondían solo a una de las dos hormonas también fueron enriquecidos con procesos biológicos definidos, como en el cerebelo la señalización celular y procesos mitocondriales para T3 y T2, respectivamente.

Pathway T2 specific	Main Theme	Cerebellum	Thalamus-p	Liver	
Spindle Assembly	Cell growth and death				
Telomere Maintenance					
Actomyosin-based Movement	Cell motility				
AdenosineR -> AP-1 signalling	Cell signalling				
CholecystokininR -> ELK-SRF signalling					
EDG3/5 -> AP-1/ELK-SRF signalling					
EndothelinRb -> AP-1/CREB/ELK-SRF signalling					
FrizzledR -> CTNNB signalling					
GNRHR -> ELK-SRF signalling					
ProstaglandinFR -> ATF1/ELK-SRF/CREB signalling					
PTAFR -> AP-1/ATF1/CREB/ERK-SRF signalling					
Double Strand DNA Non-Homologous Repair		DNA replication and repair			
NGFR -> NF-kB signalling		Immune system			
Transcytosis	Membrane transport				
Endosomal Recycling					
Capecitabine and Fluorafur metabolism	Other				
Irinotecan metabolism					
Nicotinate and nicotinamide metabolism					
Vitamin K metabolism					

EGFR/ERBB3 -> MEF/MYOD/NFATC/MYOG signalling			
CHRAC Chromatin Remodeling	Transcription		
NURD Chromatin Remodeling			
NURF Chromatin Remodeling			
SRCAP Chromatin Remodeling			
SWI/SNF BRG1/BAF Chromatin Remodeling			
SWI/SNF BRG1/PBAF Chromatin Remodeling			

Tabla 3. Vías y procesos regulados por T2. La tabla muestra las vías específicas y los procesos biológicos generales en los que participan los genes para cada tejido.

T3 specific Pathway	Main Theme	Cerebellum	Thalamus-p	Liver
Lysine metabolism	Amino acid metabolism			
Phenylalanine and Tyrosine metabolism				
Ubiquitin-dependent Protein Degradation				
Amino sugars synthesis	Carbohydrate metabolism			
Galactose metabolism				
Mannose metabolism				
L-sugars oxidation				
N-Glycan biosynthesis				
Adherens Junction Regulation	Cell community			
Gap Junction Regulation				
Focal Junction Assembly				
Tight Junction Assembly (Occludin)				
TLR -> AP-1 signalling				
TNFR -> CREB/ELK-SRF signaling	Cell growth and death			
Apoptosis				
Cleavage of Lamina in Apoptosis	Cell signalling			
AGER -> CREB/SP1 signalling				
AngiopoietinR -> STAT signalling				
CannabinoidR -> AP-1/EGR signaling				
CCR1 -> STAT signalling				
CCR2/5 -> STAT signalling				
CCR5 -> TP53 signalling				
CD19 -> AP-1/ELK-SRF signalling				
CholinergicRm -> CREB/ELK-SRF signaling				
EctodysplasinR -> AP-1 signalling				
EctodysplasinR -> LEF1 signalling				
EGFR -> CTNND signalling				
EGFR/ERBB2 -> CTNNB signalling				
EGFR -> SMAD1 signalling				
EGFR -> ZNF259 signalling				
EphrinR -> actin signalling				
ErythropoietinR -> ELK-SRF/FOS signalling				
FcIgER -> NFATC1 signalling				
FGFR1 -> STAT signalling				
Guanylate Cyclase Pathway				
IL1R -> STAT3 signalling				
IL8R -> CREB/EGR signalling				

NeuropeptideYR -> ATF/CREB signalling				
NeurotensinR -> ELK-SRF/AP-1/EGR signalling				
NTRK -> FOXO/MYCN signalling				
OxytocinR -> ELK-SRF/GATA/AP-1 signalling				
SerotoninR1 -> FOS signalling				
TachykininR -> ELK-SRF signalling				
ThromboxaneR -> CREB signalling				
TNFRSF1A -> STAT signalling				
VasopressinR2 -> MEF/MYOD/NFATC/MYOG signalling				
VEGFR -> NFATC signalling				
Single-Strand Nucleotide Excision DNA Repair	DNA replication and repair			
Pyruvate metabolism	Energy metabolism			
Tricarboxylic acid cycle				
AGER -> NF-kB signalling				
Alternative Complement Pathway				
B-cell receptor -> NF-kB signalling				
B-cell receptor -> NFATC signalling				
CD19 -> NF-kB signalling				
Classical Complement Pathway				
EctodysplasinR -> NF-kB signalling				
FibronectinR -> NF-kB signalling				
GHR -> NF-kB signalling				
IL12R -> NF-kB/NFATC signalling				
IL15R -> NF-kB/NFATC signalling				
IL7R -> FOXO/NF-kB signalling				
Lectin-induced Complement Pathway				
MacrophageR -> CEBPB/NF-kB signalling				
Mast Cell Activation				
NK Cell Activation				
PTAFR -> NF-kB signalling				
T Cell Activation				
T-cell receptor -> AP-1 signalling				
T-cell receptor -> NF-kB signalling				
T-cell receptor -> NFATC signalling				
TLR4/5/7/9 -> NF-kB signalling				
Ganglioside-type glycosphingolipid biosynthesis				
Globoside-type glycosphingolipid biosynthesis				
Glycosylphosphatidylinositol(GPI)-anchor biosynthesis				
Metabolism of triacylglycerols				
Omega-6-fatty acid metabolism				
Sphingolipid metabolism				
Purine metabolism	Nucleotide metabolism			
Ascorbate biosynthesis				
Extracellular Matrix Turnover				
Ethanol metabolism				
Gonadotrope Cell Activation				
Melanogenesis				
Skeletal Myogenesis Control				
Histone Ubiquitination				
Lacto- and neolacto-type glycosphingolipid biosynthesis	Transcription			

RNA Gene Silencing				
mRNA Degradation				
Secretory Pathway: Golgi Transport				

Tabla 4. Enriquecimiento de genes regulados por T3. La tabla muestra las vías específicas y los procesos biológicos generales en los que participan los genes para cada tejido.

Pathway non-specific	Main Theme	T2 Cerebellum	T3 Cerebellum	T2 Thalamus-p	T3 Thalamus-p	T2 Liver	T3 Liver
Methionine metabolism	Amino acid metabolism						
Selenocompound biosynthesis							
Tryptophan metabolism							
Cell Cycle Regulation	Cell growth and death						
Centriole Duplication and Separation							
Kinetochore Assembly							
Sister Chromatid Cohesion							
Intermediate Filament Polymerization	Cell motility						
Atlas of signalling	Cell signalling						
EphrinB -> JUN signalling							
GRM1/5 -> CREB signalling							
Coagulation Cascade	Circulatory system						
Hedgehog Pathway	Development						
Chromosome Condensation	DNA replication and re-pair						
Direct DNA Repair							
DNA Replication							
Double Strand DNA Homologous Repair							
Single-Strand Base Excision DNA Repair							
Single-Strand Mismatch DNA Repair							
TNFR -> NF-kB signalling	Immune system						
Biosynthesis of cholesterol	Lipid metabolism						
Metabolism of glycerophospholipids and ether lipids							
Mevalonate pathway							
Mitochondrial DNA Replication and Transcription	Mitochondrial processes						
Mitochondrial Protein Transport							
Mitochondrion Fusion and Fission							
Pyrimidine metabolism	Nucleotide metabolism						
Nuclear Envelope	Other						
Pterine biosynthesis							
Skeletal Myogenesis Control							
Histone Acetylation	Transcription						
Histone and DNA Methylation							
Histone Phosphorylation							
Histone Sumoylation							
INO80 Chromatin Remodeling							
TRRAP/TIP60 Chromatin Remodeling							
Co-translational ER Protein Import	Translation						

Protein Folding							
Protein Nuclear Import and Export							
Translation							

Tabla 5. Vías de señalización afectadas por ambas THs. Análisis de enriquecimiento de genes regulados por ambas tironinas. La tabla muestra las vías específicas y los procesos biológicos generales en los que participan los genes para cada tejido.

	Liver								Thalamus-pituitary								Cerebellum							
	T2/T3 Down	T2/T3 Up	T2 down	T3 down	T2 up	T3 up	T2 down/T3 up	T2 up/T3 down	T2/T3 Down	T2/T3 Up	T2 down	T3 down	T2 up	T3 up	T2 down/T3 up	T2 up/T3 down	T2/T3 Down	T2/T3 Up	T2 down	T3 down	T2 up	T3 up	T2 down/T3 up	
Amino acid metabolism																								
Carbohydrate metabolism																								
Cell community																								
Cell growth and death																								
Cell motility																								
Cell signalling																								
Circulatory system																								
Development																								
Differentiation																								
DNA replication and repair																								
Energy metabolism																								
Immune system																								
Lipid metabolism																								
Membrane transport																								
Mitochondrial processes																								
Nervous system																								
Transcription																								
Translation																								
Xenobiotics																								
Other																								

Tabla 6. Vías de señalización afectadas por grupos de genes regulados por THs. Análisis de enriquecimiento de grupos de genes regulados por THs. La tabla muestra los procesos biológicos generales en los que participan los grupos de genes para cada tejido.

PCR de verificación. Se seleccionaron en total 6 genes como método de validación del RNA-seq, los cuales mostraron un cambio notable ($LFC > 2.5$) y significativo ($FDR < 0.05$), así como especificidad a T2 o T3. Los genes seleccionados para el grupo tratado con T2 fueron: Luc7 en cerebelo, anaphase promoting complex subunit 11 (APC11) en tálamo/hipófisis, y Sequestosome 1 en hígado. En el análisis del transcriptoma, estos genes presentaron un LFC de 4.89, 3.80, 2.73, respectivamente. Para el grupo tratado con T3: Ubiquitin specific peptidase 40 (USP40), Anserinase, ATPase H⁺/K⁺ exchanging alpha polypeptide (ATPase); con un valor de LFC de 8.02, 5.12, 11.86, respectivamente. La cuantificación de estos transcritos seleccionados muestra concordancia con el análisis del transcriptoma, donde se confirma la tendencia general del cambio en la expresión con respecto al tratamiento (**Figura 10**). El gen ATPase, no muestra un cambio significativo, sin embargo, la tendencia de aumento con T3 se conserva. Los genes Luc7 y APC11 también responden a T3 significativamente.

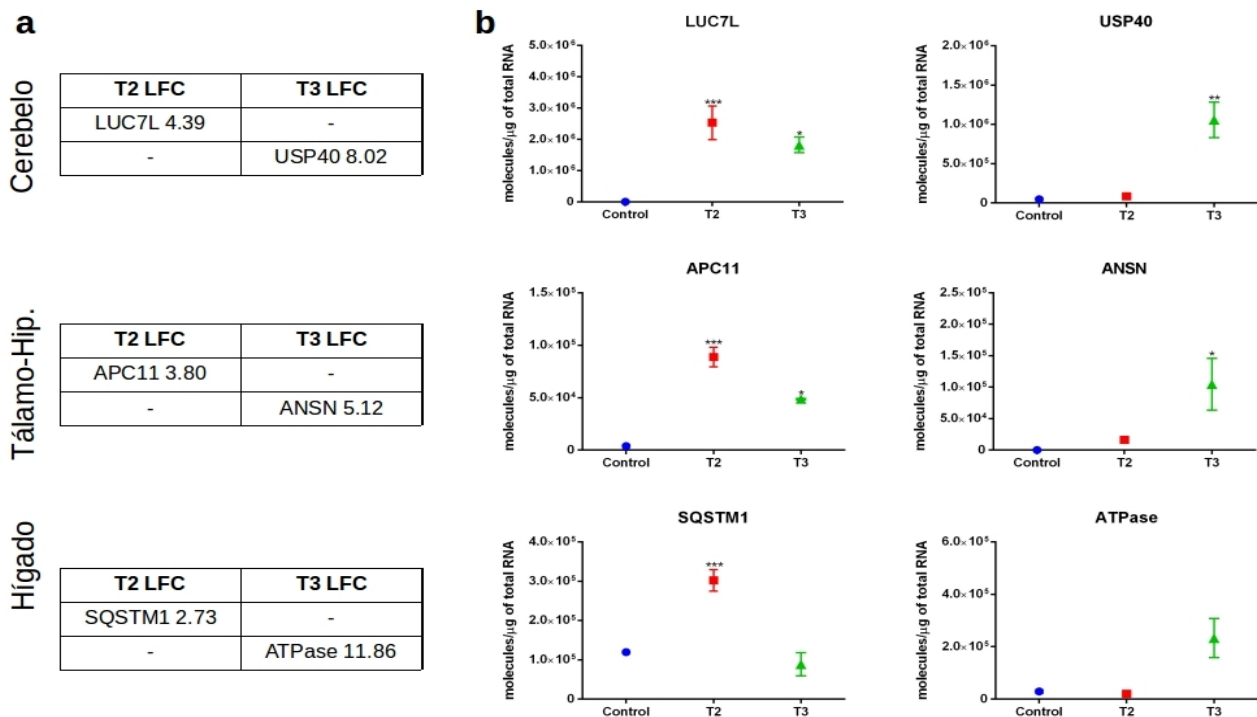


Figura 10. PCR de verificación. a) Valores logarítmicos de cambio (LFC) de genes específicamente regulados a la alta por T2 o T3 en los datos de secuenciación. b) Número de moléculas por μg de RNA total. Los tejidos analizados fueron: cerebelo para Luc7 y USP40, tálamo/hipófisis para APC11 y Anserinase, hígado para Sequestosome 1 y ATPase. Se gráfica el valor de la media con ±SEM, la significancia se indica como p : *** < 0.0001, ** < 0.001, * < 0.01 contra el control.

8. Discusión

Datos de nuestro grupo (Navarrete-Ramírez et al., 2014; Mendoza et al., 2013) y de otros (Lietzow et al., 2016), apoyan la hipótesis de que T2 es una hormona bioactiva, capaz de actuar a nivel nuclear interactuando con un TR. Este es el primer estudio para elucidar el papel de la T2 en la fisiología de los peces, identificando vías de señalización donde participan genes que son regulados por T2, ya sea de manera directa o como producto de otros factores de transcripción regulados por el tratamiento con THs.

Una fortaleza del presente trabajo fue que los peces fueron expuestos a dosis equimolares de T2 o T3. Aunque no se cuantificaron las concentraciones de las tironinas en circulación, en nuestra experiencia, esta concentración (25 nM), así como el tiempo de exposición de 12 horas no induce un estado hipertiroideo (García-G et al., 2007). Más aún, las concentraciones intramusculares de T2 y T3 en el pez cebra se encuentran en el mismo rango nano molar (Little et al., 2013), destacando las diferencias entre teleósteos y mamíferos en términos de niveles circulantes de THs bioactivas. Estas ideas apoyan la importancia de usar dosis equimolares bajas en los tratamientos experimentales con THs.

Se observaron diferencias claras en la regulación génica, mostrando que los cambios en la disponibilidad de THs fueron censados en el hígado y en el SNC, induciendo la modulación de la expresión de genes. La actividad de las THs está determinada por reguladores que incluyen: transportadores específicos, desyodasas, receptores nucleares, entre otros; la regulación de estos genes es sensible a cambios en la disponibilidad de THs. Inesperadamente, y posiblemente debido al estricto corte estadístico usado, los niveles de expresión de estos genes no fueron significativamente diferentes en los datos de secuenciación. Sin embargo, cuando cuantificamos por PCR en tiempo real en protocolos experimentales equivalentes, encontramos que la expresión de los genes que determinan la activación/inactivación intracelular (D2 y D3, respectivamente), el transporte (MCT8), o los receptores nucleares (TR α y TR β), se ve modulada por ambas tironinas en una manera tejido-específica, apoyando la eficacia del protocolo experimental (**Figura suplementaria 1**).

Se identificaron genes cuya expresión es regulada por ambas THs, así como genes regulados exclusivamente por T2 o T3. La responsividad de los genes hacia el tratamiento con THs fue notablemente mayor en hígado con un total de 2863 genes regulados,

comparado con SNC (169 en cerebelo, 154 en tálamo-hipófisis). Este contraste entre tejidos no es sorprendente. Podría estar reflejando en parte, la diferencia del influjo de THs; el hígado exhibe un alto influjo sanguíneo y es considerado como el mayor reservorio de THs después de la tiroides (Muzzio et al., 2014), mientras que el flujo sistémico de THs hacia el SNC está altamente regulado por transportadores en la barrera hemato-encefálica (Visser et al., 2011; Muzzio et al., 2014). Otro factor que podría estar participando en las diferencias observadas, es la expresión de los receptores TR α y TR β . Como se muestra en la **figura suplementaria 1**, estos genes muestran patrones de expresión diferentes en los tejidos de los peces del grupo control, y son dinámicamente regulados en una manera TH- y tejido-específica, sugiriendo una interacción entre la activación o la represión de los genes.

Cuando se visualizaron los patrones de expresión en respuesta a T2 o T3 con el análisis de grupos, observamos que ambas hormonas se encuentran modulando mayoritariamente la expresión de los mismos genes y en la misma dirección (represión o activación). Esta redundancia fue observada en células HepG2 para TR α y TR β , en donde estos receptores regularon mayoritariamente el mismo grupo de genes en respuesta a T3 (Chan & Privalsky, 2009). Esta superposición funcional observada para TR α y TR β en HepG2, podría estar asegurando el control de los procesos biológicos generales regulados por THs, tal como se observó en el análisis de ontología genética (ej. metabolismo de lípidos, replicación y reparación del DNA, metabolismo de aminoácidos). De manera interesante, observamos que algunos genes muestran diferentes amplitudes de respuesta a T2 y a T3, mientras que algunos grupos de genes fueron regulados en direcciones opuestas por estas hormonas. Considerando que los teleósteos expresan dos isoformas de TR ligando-específicas, (T2 + L-TR β 1 o T3 + S-TR β 1) (Mendoza et al., 2013; Hernández-Puga et al., 2017), la diferencia en la magnitud de respuesta para la transcripción podría ser explicada con el reclutamiento de complejos de co-reguladores TR-específicos en los promotores de los genes blancos. El hecho de que algunos grupos de genes son regulados de manera opuesta por T2 y T3 también pudiera reflejar los diferentes mecanismos moleculares que favorecen la pleiotropía y especificidad de las THs. Esta idea puede ser ilustrada por observaciones en nuestro grupo de trabajo, con la proteína “jun activation domain-binding protein1” (Jab1), la cual actúa como co-activador en el complejo T2 + L-TR β 1, o como co-represor en el complejo T3 + S-TR β 1 (Hernández-Puga et al., 2017).

Los análisis de ontología genética revelaron que los temas recurrentes más enriquecidos por ambas THs y en los tres tejidos fueron los procesos relacionados al sistema inmune. En mamíferos, varios grupos han descrito la relación entre el eje tiroideo y el sistema inmune, donde las THs, la TSH y el TRH modulan diferentes funciones inmunes en el SNC así como en tejidos periféricos (Kamath et al., 2008; Stevenson et al., 2013; Csaba, 2014; Straub, 2014). En teleósteos, el papel inmunomodulatorio de las THs es pobremente entendido; sin embargo, los receptores TR α y TR β han sido detectados en leucocitos aislados del riñón y en la circulación periférica de la trucha (*Oncorhynchus mykiss*), donde el TR α es altamente expresado en órganos inmunes comparado con el hígado, mientras que el TR β es predominantemente expresado en el hígado, sugiriendo una función tejido-específica (Quesada-García et al., 2014). Más aún, se encontró que, *in vivo*, la T3 modula diversos genes y vías de señalización relacionadas al sistema inmune, sugiriendo así una compleja comunicación cruzada entre los sistemas tiroideo e inmune, lo cual podría estar conservado en los vertebrados (Quesada-García et al., 2016).

Se identificaron transcritos que fueron específicamente regulados por T3 o T2. Un avance significativo ha sido el hecho de identificar por primera vez transcritos que fueron regulados específicamente por T2 en el SNC. En el cerebelo, por ejemplo, dentro de los genes regulados a la baja por T2 se encuentran dos miembros de la familia de la keratina, KRT1 y KRT2, los cuales son conocidos por encontrarse sobrepresados en un modelo de ratón resistente a THs (Milleret et al., 2004). Vías de señalización que involucran estas proteínas incluyen los neurofilamentos que remodelan el citoesqueleto (Chuang & Huang, 2007). Otro gen que fue regulado a la baja por T2, también involucrado en el desarrollo del SNC, es la poli-ADP-ribosiltransferasa Tankyrase, un transcrito involucrado en activar la vía de señalización Wnt. Bajo condiciones fisiológicas normales, esta vía está reprimida, dando lugar a una apropiada mielinización durante la diferenciación de los oligodendrocitos de mamíferos (Casaccia, 2011). Como último ejemplo, el factor de transcripción SRY-relacionado HMG-boX Sox2, es un gen que fue regulado a la baja por T2, y está involucrado en la regulación del desarrollo embrionario y en la determinación del destino celular. Se ha descrito que la represión de Sox2 es dependiente del complejo T3 + TR α , promoviendo así el compromiso de las células troncales neurales y la progresión hacia los fenotipos de neuroblastos migratorios,

esto, en la zona sub-ventricular del ratón adulto (López-Juárez et al., 2012). Reuniendo estas ideas, nuestros datos apuntan a que T2 es un importante modulador en el SNC, involucrado en los procesos de mielinización, diferenciación de tejidos neurales y en el control de la homeostasis de proliferación/diferenciación. Una respuesta conservada fue también observada entre mamíferos y teleósteos en los genes regulados por T3. Por ejemplo, el gen que codifica para la proteína asociada al sinaptosoma SNAP25, fue específicamente regulado a la baja por T3 en el cerebelo de tilapia, y también se ha descrito esta regulación en el cerebro de la rata en desarrollo, donde la represión de la transcripción de SNAP25 es requerida para una apropiada extensión de las neuritas y sinaptogénesis (Price et al., 2012). La molécula de adhesión glial, HEPACAM, es otro gen regulado diferencialmente por T3 en teleósteos, y en mamíferos. Este gen está involucrado en la mielinización, motilidad celular, y las interacciones célula-matriz. Se observó que las células HepG2 que expresan establemente TR α y TR β , regulan a la alta la transcripción de HEPACAM cuando se tratan con T3 (Chan & Privalsky, 2009).

Más aún, en un reciente trabajo en hígado de ratón hipertiroideo, se identificaron 493 genes regulados por T3 (Grøntved et al., 2015). Notablemente, dentro de estos 493 genes, 124 fueron identificados en los datos de nuestro transcriptoma de hígado como regulados por THs. De estos, 32 fueron específicamente regulados por T2, 17 por T3, y 75 por ambas. Dentro del grupo de genes regulados específicamente por T2, encontramos al citocromo P450 1A (cyp1a) y al miembro 7 de la familia de acarreadores de solutos 22 (SLC22A7). Ambas proteínas están implicadas en el sistema de biotransformación de xenobióticos (XBS). Interesantemente, estos dos genes han sido identificados también como T2-responsivos en ratones (Lietzow et al., 2016). En contraste, de los 493 genes regulados por T3 identificados en el hígado de ratón, solo 7 fueron identificados como diferencialmente expresados en el transcriptoma del SNC de la tilapia, reforzando la hipótesis de que la regulación tejido-específica es un amplio fenómeno conservado en vertebrados para la regulación génica mediada por THs. Los múltiples efectos observados para T2 y T3 en la tilapia son consistentes con un reciente análisis transcriptómico en el besugo azul, donde el tratamiento con T3 elicó efectos pleiotrópicos en el hígado y cerebro (Rastorgev et al., 2016), apoyando la noción de que las THs actúan a través de diferentes estrategias funcionales, llevando a cabo la modulación de diversos aspectos fisiológicos.

9. Conclusiones

En resumen, demostramos que, al igual que T3, T2 regula la expresión de genes en el hígado y SNC de tilapia *in vivo*. Bajo las condiciones del presente trabajo, identificamos genes que fueron específicamente regulados por T2 y T3. Los perfiles de expresión observados en respuesta al tratamiento con TH son tejido-específicos, y las múltiples funciones que un gen puede ejercer se reflejan en las diferentes vías de señalización moduladas. Más aún, las respuestas conservadas entre mamíferos y teleósteos destacan la importancia de los sistemas tiroideos para la homeostasis en vertebrados y apoyan la relevancia de la acción de la T2 como una importante hormona bioactiva.

10. Bibliografía

- Aagaard M. M., Siersbæk R. & Mandruo S., 2011. Molecular basis for gene-specific transactivation by nuclear receptors. *BBA-Mol Basis Dis* 1812: 824-835.
- Ahmed O. M., El-Gareib A. W., E-bakry A. M., Abd S. M., & Ahmed R. G., 2008. Thyroid hormones and brain development interactions. *Int J Devl Neuroscience*, 26:147-209.
- Baqui M., Botero D., Gereben B., Curcio C., Harney J. W., Salvatore D., Sorimachi K., Larsen P. R. & Bianco A. C., 2000. Distinct subcellular localization of transiently expressed types 1 and 2 iodothyronine deiodinases as determined by immunofluorescence confocal microscopy. *Endocrinology*, 141: 4309-4312.
- Bhumika S., and Darras V. M., 2014. Role of thyroid hormones in different aspects of nervous system regeneration in vertebrates. *Gen Comp Endocrinol*, 203: 86-94.
- Bianco A.C. & Kim B. W., 2006. Deiodinases: implications of the local control of thyroid hormone action. *J Clin Invest*, 116: 2571-2579
- Bianco A. C., Salvatore D., Gereben B. & Berry M. J., 2002. Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases. *Endocrine Rev*, 23: 38-89
- Blanton M. L. & Specker J. L., 2007. The hypothalamic-pituitary-thyroid (HPT) axis in fish and its role in fish development and reproduction. *Crit Rev Toxicol*, 37:97-115
- Brent G. A., 2012. Mechanisms of thyroid hormone action. *J Clin Invest*, 122: 3035-3043
- Casaccia P., 2011. Anti-TANKyrase weapons promote myelination. *Nat Neurosci*, 14: 945-947.
- Chan I & Privalsky M., 2009. Isoform-specific transcriptional activity of overlapping target genes that respond to thyroid hormone receptors $\alpha 1$ and $\beta 1$. *Mol Endocrinol*, 23: 1758-1775.
- Cheng S. Y., Leonard J. L. & Davis P. J., 2010. Molecular aspects of thyroid hormone actions. *Endocr rev*, 31: 139-70.
- Chuang & Huang, 2007. Interaction of integrin beta1 with cytokeratin 1 in neuroblastoma NMB7 cells. *Biochem Soc Trans*, 35: 1292-1294.
- Csaba, G., 2014. Hormones in the immune system and their possible role. Aa critical review. *Acta Microbiol Immunol Hung*, 61: 241-260.
- Dardente H., Hazlerigg D. G. and Ebling F. J. P., 2014. Thyroid hormone and seasonal rhythmicity. *Front Endocrinol*, 5:1 9
- Darras V. M., & Van Heck S. L. J., 2012. Iodothyronine deiodinases structure and function: from ascidians to humans. *J Endocrinol*, 215: 189-206
- Darras V. M., Houbrechts A. M., Van Herck L. J., 2015. Intracellular Thyroid hormone metabolism as a local regulator of nuclear thyroid hormone receptor-mediated impact on vertebrate development. *Biochim Biophys Acta*, 1849: 130-141.
- Denver R. J., Glennemeier K. A. & Boorse G. C., 2002. *Endocrinology of complex life cycles: amphibians in: Hormones, Brain and Behavior*, Chapter 28. Elsevier Science (USA).
- DuRant S. E., Carter A. W., Denver R. J., Hepp G. R. and Hopkins W. A., 2013. Are thyroid hormones mediators of incubation temperature-induced phenotypes in birds? *Biol Lett*, 10: 20130950.

- Friesema E.C.H., Jansen J. & Visser T., J., 2005. Thyroid hormone transporters. *Biochem Soc Trans*, 33:228-32.
- García-G.C., López-Bojorquez L., Nuñez C.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
- Gereben B., Zavacki A. M., Ribich S., Kim B. W., Huang S. A., Simonides W. S., Zeöld A. & Bianco A. C., 2008a. Cellular and molecular basis of deiodinase-regulated thyroid hormone signaling. *Endocr Rev*, 29: 898-938
- Gereben B., Zeöld A., Dentice M., Salvatore D. & Bianco A. C., 2008b. Activation and inactivation of thyroid hormone by deiodinases: Local action with general consequences. *Cell Mol Life Sci*, 65: 570-590
- Geven E. J. W., Nguyen N., Van Den Boogaart M., Spanings F. A. T., Flik G. & Klaren P. H. M., 2007. Comparative thyroidology: thyroid gland location and iodothyronine dynamics in Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus* Peters) and common carp (*Cyprinus carpio* L.) *J Exp Biol*, 210: 4005-4015.
- Grøntved L., Waterfall J. J., Kim D. W., Baek S., Sung M-H., Zhao L., Park J. W., Nielsen R., Walker R. L., Zhue Y. J., Meltzer P. S., Hager G. L. & Cheng S-Y., 2015. Transcriptional activation by the thyroid hormone receptor through ligand-dependent receptor recruitment and chromatin remodeling. *Nat comm*, 6: 7048.
- Habibi H. R., Nelson E. R. & Allan E. R. O., 2012. New insights into thyroid hormone function and modulation of reproduction in goldfish. *Gen Comp Endocrinol*, 175: 19-26.
- Hogan N. S., Crump K. L., Duarte P., Lean D. R. S. & Trudeau V. L., 2007. Hormone cross-regulation in the tadpole brain: developmental expression profiles and effect of T3 exposure thyroidhormone and estrogen-responsive genes in *Rana pipiens*. *Gen Comp Endocrinol*, 154: 5–15.
- Kamath J., Yarbrough G. G., Prange A. J. Jr., & Winokur A. The thyrotropin-releasing hormone (TRH)-immune system homeostatic hypothesis. *Pharmacol Ther*, 121: 20-28.
- Kohel K. A., MacKenzie D. S., Rostal D. C., Grumbles J. S., & Lance V. A., 2001. Seasonality in plasma thyroxine in the desert tortoise, *Gopherus agassizii*. *Gen Comp Endocrinol*, 121: 214-222.
- Köhrle J., 2007. Thyroid hormone transporters in health and disease: advances in thyroid hormone deiodination. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 21: 173-191
- Larsen P. R, Davies T. F, Hay I. D., 1998. The Thyroid Gland. In: Wilson JB, Hoster D, Cronenberg HM, and Larsen PR (eds) *William's Textbook of Endocrinology*. 9th ed. W B Saunders, Philadelphia, pp 389-515.
- Leonard J. L, Köhrle J. 2000. Intracellular pathways of iodothyronine metabolism. In: Braverman LE, & Utiger RD (eds.) *The Thyroid: A Fundamental and Clinical Text*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp. 136-173.
- Lietzow J, Golchert J, Homuth G, Völker U, Jonas W & Köhrle J., 2016. 3,5-T₂ alters murine genes relevant for xenobiotic, steroid and thyroid hormone metabolism. *J Mol Endocrinol* 56, 311-323.
- Little G. M., Kunisue T., Kannan K., & Seebacher F., 2013. Thyroid hormone actions are temperature-specific and regulate thermal acclimatation in zebrafish (*Danio rerio*). *Biomedcentral Biol*, 11: 26.
- López-Juárez A., Remaud S., Hassani Z., Jolivet P., Simons J. P., Sontag T., Yoshikawa K., Price J., Morvan-Dubois G & Demeneix B. A., 2012. Thyroid hormone signaling acts as a neurogenic switch by repressing Sox2 in the adult neural stem cell niche. *Cell Stem Cell*, 10: 531-543.
- 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.
- Mendoza, A., Navarrete-Ramírez, P., Hernandez-Puga, G., Villalobos, P., Holzer, G., Renaud, J.P., Laudet, V., Orozco, A., 2013. 3,5-T₂ Is an Alternative Ligand for the Thyroid Hormone Receptor $\beta 1$. *Endocrinology*, 154: 2948-2958.

- Miller L. D., McPhie P., Suzuki H., Kato Y., Liu E. T., & Cheng S. Y., 2004. Multi-tissue gene-expression analysis in a mouse model of thyroid hormone resistance. *Gen Biol*, 5: R31.
- McNabb, F. M., 1992. *Thyroid hormones*. Prentice Hall, New Jersey, NJ, pp 43-80
- Navarrete-Ramírez, P., Luna, M., Valverde-R, C., Orozco, A., 2014. 3,5-di-iodothyronine stimulates tilapia growth through an alternate isoform of thyroid hormone receptor $\beta 1$. *J Mol Endocrinol*, 52: 1-9.
- Nelson E. R., & Habibi R. H., 2009. Thyroid receptors subtypes: Structure and function in fish. *Gen Comp Endocrinol*, 161: 90-96
- Nobel S., Abrahmsen L. & Oppermann U., 2001 Metabolic conversion as a pre-receptor control mechanism for lipophilic hormones. *Eur J Biochem*, 268: 4113-4125.
- Orozco A. & Valverde-R. C., 2005. Thyroid hormone deiodination in fish. *Thyroid* 15: 799-813
- Paquette M.A., Atlas E., Wade M.G., Yauk C.L., 2014. Thyroid hormone response element half-site organization and its effect on thyroid hormone mediated transcription. *PLoS ONE*, 9: e101155.
- Pawlak M., Lefebvre P., & Staels B., 2012. General molecular biology and architecture of nuclear receptors. *Curr Top Med Chem*, 12: 486-504.
- Peter M. C. S., 2011. The role of thyroid hormones in stress response of fish. *Gen Comp Endocrinol* 172:198-210.
- Quesada-García A., Valdehita A., Kropf C., Casanova-Nakayama A., Segner H., & Navas J. M., 2014. Thyroid signaling in immune organs and cells of the teleost fish rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish & shellfish immunol*, 38: 166-174.
- Quesada-García A., Encinas P., Valdehita A., Bauman L., Segner H., Coll J. M. & Navas J. M., 2016. Thyroid active agents T3 and PTU differentially affect immune gene transcripts in the head kidney of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicol*, 174: 159-168.
- Richardson S., Power D. & Klaren P., 2007. Comparative thyroid endocrinology. *Gen Comp Endocrinol*, 152: 176-177.
- Rastorguev S. M., Nedoluzhko A. V., Levina M. A., Prokhorchuk E. B., Skryabin K. G. & Levina B. A., 2016. Pleiotropic effect of thyroid hormones on gene expression in fish as exemplified from blue bream *Ballerus ballerus* (Cyprinidae): results of transcriptomic analysis. *Biochemistry, Biophysics and Molecular Biology* 467, 124-127.
- Straub R. H., 2014. Interaction of the endocrine system with inflammation: a function of energy and volume regulation. *Arthritis Res Ther*, 16: 203.
- Stevenson T. J., Kenneth G. O., Bradley S. P. & Prendergast B. J., 2013. Cell-autonomous iodothyronine deiodinase expression mediates seasonal plasticity in immune function. *Brain Behav Immun*, 36: 61-70.
- Shepherdley C., Daniels C. B., Orgeig S., Richardson S. J., Evans B. K. & Darras V. M., 2002. Glucocorticoids, thyroid hormones, and iodothyronine deiodinases in embryonic saltwater crocodiles. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 283: 1155-1163.
- Shiao J. C., Hwang P. P., 2006. Thyroid hormones are necessary for the metamorphosis of tarpon *Megalops cyprinoides leptocephali*. *J Exp Mar Biol Ecol*, 331: 121-132
- Schreiber A. M., Specker J. L., 1998. Metamorphosis in the summer flounder (*Paralichthys dentatus*): stage-specific developmental response to altered thyroid status. *Gen Comp Endocrinol*, 111: 156-166.
- Solís-Sainz J. C, Orozco A., García-G C., Robles-Osorio L. & Valverde-R C., 2010 Bioactividad de las hormonas tiroideas. Importancia clínica de los transportadores de membrana, de las desyodasas y de los receptores nucleares. *Rev Invest Clin*, 63: 287-308.

- St. Germain D. L., Galton V. A. & Hernandez A. 2009. Minireview: Defining the roles of the iodothyronine deiodinases: current concepts and challenges. *Endocrinology*, 150: 1097-1107.
- Tata J. R., 2002. Signaling through nuclear receptors. *Nat Rev Mol Cell*, 3: 702-710.
- Tata J. R., 2006. Amphibian metamorphosis as a model for the developmental actions of thyroid hormone. *Mol Cell Endocrinol*, 246: 10-20.
- Toyoda N., Berry M. J., Harney J. W. & Larsen P. R., 1995. Topological analysis of the integral membrane protein, type 1 iodothyronine deiodinase (D1). *J Biol Chem*, 270: 12310-12318.
- Valverde R. C., Orozco A., Aceves C, y Romero R.C., 1998. Control y regulación de la función tiroidea. Tomo IV, capítulo 4. En: *Texto de Fisiología. Células, Órganos y Sistemas*. J. Muñoz-Martínez y X. García. (Edits.) SMCF. FCE., SEP., UNAM. Pp 173-187.
- Valverde R. C., Orozco R. A., Becerra A., Jeziorski M. C., Villalobos P., & Solís J. C., 2004. Halometabolites and cellular dehalogenase systems: an evolutionary perspective. *Int Rev Cytol*, 234: 143-199
- Van der Deure W. M., Peeters R. P., Visser T. J., 2010. Molecular aspects of thyroid hormone transporters, including MCT8, MCT10, and OATPs, and the effects of genetic variation in these transporters. *J Mol Endocrinol*, 44: 1-11.
- Visser W. E., Friesema E. C., Jansen J. & Visser T. J., 2008. Thyroid hormone transport in and out of cells. *Trends Endocrinol Metab*, 19: 50-56.
- Visser W. E., Friesema E. C., Visser T. J., 2011. Minireview: Thyroid hormone transporters: The knowns and the unknowns. *Mol Endocrinol*, 25: 1-14.
- Vivek-Sagar G. D., Gereben B., Callebaut I., Mornon J. P., Zeöld A., Curcio-Morelli C., Harney J. W., Luongo C., Mulcahey M. A., Larsen P. R., Huang S. A. & Bianco A. C., 2008. The thyroid hormone-inactivating deiodinase functions as a homodimer. *Mol Endocrinol*, 22: 1382-1393.
- Williams G. R., 2000. Cloning and characterization of two novel thyroid hormone receptor β isoforms. *Mol Cell Biol*, 20: 8329-8342.
- Zhang J. & Lazar M. A., 2000. The mechanism of action of thyroid hormones. *Annu Rev Physiol*, 62: 439-466.
- Zhang H., Su Q. & Luo M., 2008. Thyroid hormone regulates the expression of SNAP-25 during rat brain development. *Mol Cell Biochem*, 307: 169-175.

11. Material suplementario

Muestra	Tratamiento	Total Secuencias	Alineadas	Porcentaje
C1_Cerebelo_results.xprs	Control	14514391	5755251	47.05%
C1_Higado_results.xprs		4225598	1820404	49.15%
C1_Talamo_results.xprs		14504830	5741832	47.37%
C2_Cerebelo_results.xprs		7689739	2582045	39.92%
C2_Higado_results.xprs		12107526	5612476	54.55%
C2_Talamo_results.xprs		16506206	5167001	38.43%
T2_1_Cerebelo_results.xprs	T2	4822691	1659861	40.56%
T2_1_Higado_results.xprs		9212482	3737020	52.34%
T2_1_Talamo_results.xprs		13576605	4453499	40.69%
T2_2_Cerebelo_results.xprs		13314607	5443278	48.33%
T2_2_Higado_results.xprs		10770374	4231626	49.85%
T2_2_Talamo_results.xprs		15314627	5075196	41.26%
T3_1_Cerebelo_results.xprs	T3	11232070	3701764	40.69%
T3_1_Higado_results.xprs		11823010	5713968	58.99%
T3_1_Talamo_results.xprs		14834362	5866975	48.29%
T3_2_Cerebelo_results.xprs		15221025	4640154	38.14%
T3_2_Higado_results.xprs		11230279	5285284	57.91%
T3_2_Talamo_results.xprs		10310338	3023411	37.36%

Tabla suplementaria 1. Estadística de secuenciación y mapeo.

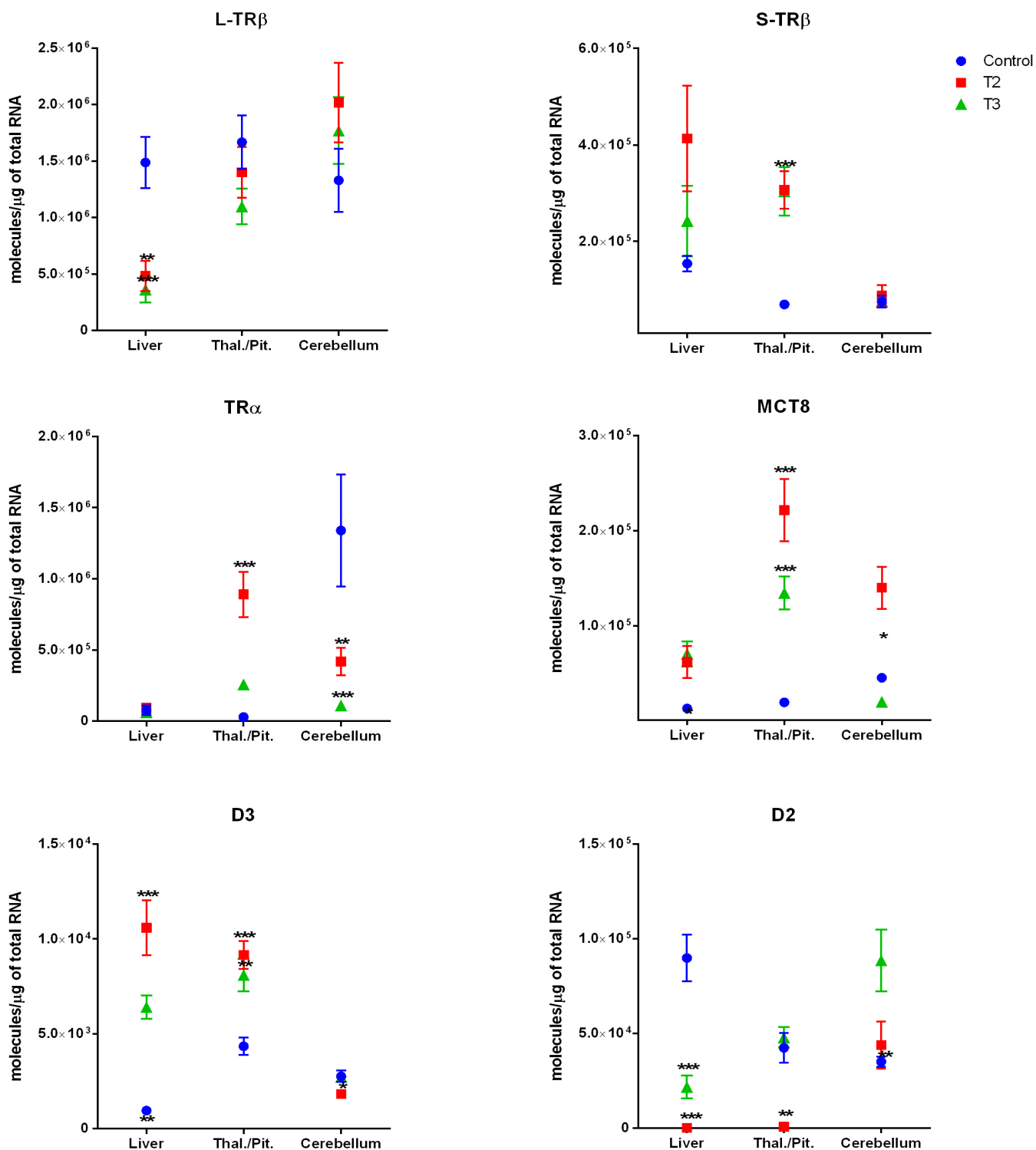


Figura suplementaria 1. qPCR de genes relacionados a la fisiología tiroidea. Número de moléculas por μg de RNA total. Se gráfica el valor de la media con $\pm\text{SEM}$, la significancia se indica como p : *** < 0.0001, ** < 0.001, * < 0.01 contra el control.