



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Medicina

Identificación de sitios responsivos presentes en los
promotores de los genes que codifican para las enzimas
responsables del sistema intratiroideo de reciclaje de yodo en
el humano.

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Doctora en Ciencias de la Salud

Presenta

Ruth Magdalena Gallegos Torres

Bajo la dirección de

Dr. en C. Juan Carlos Solís Sáinz

Santiago de Querétaro
Octubre de 2011



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Medicina
Doctorado en Ciencias de la Salud

Identificación de sitios responsivos presentes en los promotores de los genes que codifican para las enzimas responsables del sistema intratiroideo de reciclaje de yodo en el humano.

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

Doctora en Ciencias de la Salud

Presenta:

M. en C.E. Ruth Magdalena Gallegos Torres

Dirigido por:

Dr. en C. Juan Carlos Solís Sáinz

SINODALES

Dr. en C. Juan Carlos Solís Sáinz
Presidente

Dra. en C. María Carlota García Gutiérrez
Secretaria

Dr. en C. Pablo García Solís
Vocal

Dr. en C. Hebert Luis Hernández Montiel
Suplente

Dra. en C. Ma. Ludivina Robles Osorio
Suplente

Med. Esp. Enrique A. López Arvizu
Director de la Facultad

Firma

Firma

Firma

Firma

Firma

Dr. Luis Gerardo Hernández Sandoval
Director de Investigación y Posgrado

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Octubre, 2011
México

RESUMEN

Introducción: La glándula tiroidea (GT) secreta las hormonas triyodotironina (T_3) y tiroxina (T_4), las cuales regulan el metabolismo en prácticamente todos los tejidos. El yodo (I) es la materia prima para la producción de dichas hormonas y es un elemento muy escaso en la naturaleza. La GT recicla el yodo que no se orgnifica en hormona tiroidea gracias a la acción de: la desyodasa de yodotironinas tipo 1 (ID1) y la deshalogenasa de yodotirosinas (tDh). Objetivo: Reconocer, *in silico* e *in vitro* los sitios responsivos tiroideo-relevantes presentes en los promotores de los genes que codifican para tDh e ID1. Metodología: estudio experimental de dos etapas, un modelo *in silico* y un modelo *in vitro*. Se trabajó con 2kb, 1.5kb, 1.0kb y 0.5kb de los promotores de los genes que codifican para tDh e ID1; la secuencia de los promotores se obtuvo de la base de datos de la Universidad Santa Cruz (UCSC). Para el modelo *in silico* se introdujeron dichas secuencias en dos bases de datos (Genomatix-Matinspector y TransFac-Patch 1.0) para obtener información relacionada con los elementos cis tiroideo relevantes que se encuentran en la región promotora de las enzimas sujeto de estudio. Para el modelo *in vitro* se amplificaron las regiones promotoras ya mencionadas, del gen *tDh*, a partir de DNA genómico. Posteriormente, con estas secuencias, se generaron los vectores acoplados a luciferasa. Los experimentos se llevaron a cabo en células PCCL3 aplicando concentraciones fisiológicas de I, T_3 y Tg. Resultados: el modelo *in silico* reportó sitios responsivos para los elementos estudiados que no son coincidentes con lo registrado en la literatura. En el modelo *in vitro*, las células tratadas no mostraron respuesta empleando el vector reportero de 2Kb. Conclusiones: los resultados del modelo *in silico* señalan que abundan los sitios responsivos para T_3 en la secuencia promotora de 2kb, sin embargo no coinciden los resultados con las predicciones obtenidas en ambas bases de datos, por lo que los algoritmos actuales no son funcionales para GT. En cuanto al modelo *in vitro*, no fue posible detectar sitios responsivos en el promotor de 2Kb del gen que codifica para tDh.

Palabras clave: (promotor, desyodasa tipo 1, deshalogenasa).

SUMMARY

Introduction: The thyroid gland (TG) releases two important hormones: T_3 and T_4 , which have functions related to metabolism. Iodine (I) is the feedstock for the production of these hormones, which is a scarce element in nature. The GT recycled iodine without organification as a thyroid hormone by the action of: iodothyronine deiodinase type 1 (ID1) and dehalogenase iodotyrosine (tDh). Objective: To recognize, *in silico* and *in vitro* thyroid-responsive sites relevant, present in the promoters of the genes coding for tDh and ID1. Methodology: An experimental two-stage model: *in silico* and *in vitro*. We worked with 2kb, 1.5kb, 1.0kb and 0.5kb promoters of genes coding for tDh and ID1; the promoter sequence was obtained from the database of the University of Santa Cruz (UCSC). In the *in silico* model, these sequences were introduced (Genomatix-Matinspector and TransFac-Patch 1.0) for information regarding thyroid cis elements that encode the promoter region of the enzymes subject of study. For the *in vitro* model, specific primers were constructed to recognize the required sequences in the promoter, from genomic DNA. The experiments were conducted in PCCL3 cells using physiological concentrations of I, T_3 and Tg. A test was conducted to assess luciferase reporter activity in the presence of the substrate. Results: The *in silico* model responsive sites did not report for the studied elements in the promoter of the tDh gene 2kb or ID1. In the *in vitro* model, the treated cells showed no change in reporter 2kb. Conclusions: The *in silico* model results indicate that there are many sites responsive to T_3 in the 2kb promoter sequence, however the results do not coincide with the cast in each of the databases, so that existing algorithms are not functional to GT. *In vitro* model for tDh responsive site is not in the promoter 2kb.

Key words: (promoter, deiodinase type 1, dehalogenase.

DEDICATORIAS

Ana María, Guillermo, Nahúm:

Siempre me han apoyado en todos mis proyectos, sufren conmigo, se alegran conmigo...y me aguantan. Ese apoyo va plasmado en este trabajo. Gracias.

Ángel:

Gracias amor por soportarme en mis tiempos difíciles, por tener paciencia cuando no pude estar contigo, por cuidarme y por ser mi compañero y amigo. Te amo mucho.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	vi
ÍNDICE DE TABLAS	vii
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Planteamiento del problema.....	2
1.2 Justificación.....	4
1.3 Objetivos.....	4
1.4 Hipótesis.....	5
II. REVISIÓN DE LA LITERATURA	6
2.1 Generalidades embriológicas, anatómicas e histológicas de la glándula tiroides	6
2.2 El yodo como materia prima para la síntesis de HT	8
2.3 Las hormonas tiroideas	11
2.3.1 Mecanismo de síntesis	13
2.4 Regulación en la producción hormonal.....	17
2.4.1 Eje hipotálamo-hipófisis-tiroides	17
2.4.2 Yodo	19
2.4.3 Tiroglobulina	20
2.4.4 Triyodotironina	21
2.5 Las desyodasas de yodotironinas.....	21
2.6 Deshalogenasa de yodotirosinas.....	25
2.7 Estructura básica de un gen y su promotor.....	27
III. METODOLOGÍA	29
3.1 Modelo <i>in silico</i>	29
3.2 Modelo <i>in vitro</i>	31
3.3 Ética del estudio.....	35
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	36
4.1 Modelo <i>in silico</i>	36
4.2 Modelo <i>in vitro</i>	38
V. CONCLUSIONES	42
VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Detalles anatómicos de la GT	7
Figura 2.	Estructura de los folículos tiroideos	8
Figura 3.	Metabolismo del yodo	11
Figura 4.	Estructura química de la T ₃ y T ₄	12
Figura 5.	Síntesis de las HT	13
Figura 6.	Eje hipotálamo-hipófisis-tiroides	18
Figura 7.	Unidad de transcripción y sus elementos críticos	27
Figura 8.	Proceso de búsqueda de artículos sobre <i>Dio1</i> y <i>tDh</i> en la base de datos de PubMed.	31
Figura 9.	Secuencias de 2Kb, 1.5Kb y 1.0Kb del promotor del gen que codifica para tDh.	32
Figura 10.	Proceso de construcción del vector	33
Figura 11.	Células PCCL3 tratadas con yodo, en promotor reportero de 2Kb	39
Figura 12.	Células PCCL3 tratadas con T ₃ , en promotor reportero de 2Kb	40
Figura 13.	Células PCCL3 tratadas con Tg, en promotor reportero de 2Kb	40

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Ingesta de I recomendada por grupo de edad	9
Tabla 2.	Desórdenes por deficiencia de yodo en diferentes etapas de la vida	10
Tabla 3.	Algunas funciones y efectos de las HT en el organismo	12
Tabla 4.	Características particulares de las desyodasas	22
Tabla 5.	Mutaciones en el gen tDh1.	26
Tabla 6.	Denominación responsiva de los elementos tiroideo relevantes y su secuencia consenso	30
Tabla 7.	Ensayo de Luciferasa	34
Tabla 8.	Posición de los sitios responsivos identificados, <i>in silico</i> , en el promotor del gen Dio1 humano	36
Tabla 9.	Posición de los sitios responsivos identificados, <i>in silico</i> , en el promotor del gen Dio1 de rata.	36
Tabla 10	Posición de los sitios responsivos identificados, <i>in silico</i> , en el promotor del gen tDh humano	37
Tabla 11	Posición de los sitios responsivos identificados, <i>in silico</i> , en el promotor del gen tDh de rata	37
Tabla 12	Posición de los sitios responsivos identificados en el promotor del gen <i>Dio1</i> , de humano y rata, en modelos <i>in vitro</i>	38

I. INTRODUCCIÓN

En el siglo XXI, el avance de la ciencia ha reforzado el trabajo experimental realizado a lo largo del tiempo en las diversas áreas de la fisiología, favoreciendo que día con día se cuente con conocimientos recientes del funcionamiento normal y patológico de los procesos celulares. En este sentido, la investigación hecha en el área de la fisiología de la glándula tiroides no es la excepción, sobre todo porque aún existen diversas lagunas del conocimiento a nivel de mecanismos moleculares.

Con base en lo anterior, en esta investigación, se propuso llevar a cabo un acercamiento, desde el punto de vista molecular, en el intrincado funcionamiento del sistema intratiroideo de reciclaje de yodo (I) en el humano, con la meta final de generar nuevo conocimiento en esta área. Ante todo, se estudió la regulación de la desyodasa de yodotironinas tipo 1 (ID1) y la deshalogenasa de yodotirosinas (tDh), enzimas que participan en dicho sistema de reciclaje.

Así, en la revisión de la literatura se presenta una visión global y concreta de la embriología, anatomía e histología de la glándula tiroides; de la misma manera se describieron los procesos involucrados en la síntesis de las hormonas tiroideas (HT) y su regulación, las que juegan un papel vital en la homeostasis de los vertebrados.

En la metodología, se señalan con detalle los aspectos experimentales llevados a cabo con la finalidad de dar respuesta a los objetivos planteados. Posteriormente se presentan los resultados del estudio.

1.1 Planteamiento del problema

El I, es un elemento químico indispensable para el organismo, ya que participa en una amplia gama de funciones. Sin embargo, a pesar de su importancia en sistemas biológicos, su concentración es muy escasa en la tierra, así como en el organismo (WHO, 2004; Zimmermann, 2009), por lo que es considerado un oligoelemento. En la naturaleza, solamente los vertebrados poseen un órgano especializado en capturar activamente este halógeno: la glándula tiroides (GT) (Solís y Valverde, 2006).

El principal papel del I es participar en la síntesis de HT; cuando hay una deficiencia de I, se presentan diversas alteraciones funcionales y de desarrollo, denominadas desórdenes debidos a deficiencia de I o IDD (Iodine Deficiency Disorders, por sus siglas en inglés), siendo el bocio la principal manifestación (WHO, 2004; Andersson *et al.*, 2005).

A nivel mundial la deficiencia de I es un problema de salud pública, que afecta a todos los grupos de edad. Su presencia es especialmente delicada en niños y mujeres embarazadas, debido a las consecuencias que se manifiestan en el desarrollo del producto (WHO, 2004; Andersson *et al.*, 2005; Pérez-López, 2007). Cuando se presenta dicha deficiencia, se produce un aumento compensatorio de la captación del I por la GT, mediado por una mayor secreción de TSH, para aumentar la síntesis de HT (Terry *et al.*, 2006).

Por tanto, es indispensable una adecuada ingesta de I, así como un apropiado funcionamiento del eje hipotálamo-hipófisis-tiroides, (Vono-Toniolo y Kopp, 2004), que garanticen la homeostasis de este oligoelemento en el organismo.

En este sentido, el estudio de los factores que coadyuvan para la presencia de patologías relacionadas con la alteración de las concentraciones de I en la GT a nivel del organismo humano y no sólo de la presencia o ausencia del I

en los alimentos, tomó un auge especial con la aplicación de la biología molecular (Terry *et al.*, 2008).

Al respecto, Rivolta *et al.* (2005) señalan que los avances en la biología molecular han permitido descifrar los mecanismos moleculares responsables de ciertas formas de hipotiroidismo e hipertiroidismo autoinmune, que permiten explicar la patogenia de formas localizadas o generalizadas de la función de las células tiroideas. Así mismo, señalan que gracias a este tipo de estudios, se han identificado mutaciones en los genes involucrados en la ontogenia de la tiroides y en la mayoría de los pasos del metabolismo del yodo, aunque en la actualidad, aún queda mucho por investigar a este nivel.

A fin de que las HT ejerzan sus efectos a nivel nuclear, la prohormona tiroxina (T_4) se transforma intracelularmente a triyodotironina (T_3) por un mecanismo enzimático denominado desyodación (aspecto que se describirá con más detalle en los siguientes apartados), gracias a la acción de la enzima desyodasa de yodotironinas tipo 1 (ID1) y 2 (ID2), regulando así las concentraciones y acciones de las HT a nivel celular (Wang *et al.*, 2009).

Junto con la ID1, participa la deshalogenasa de yodotirosinas (tDh), que interviene en el metabolismo de las HT al remover el I presente en los precursores de las HT, la monoyodotirosina (MIT) y la diyodotirosina (DIT) (Wang *et al.*, 2009). Así, ID1 y tDh forman parte del sistema de reciclaje de I intratiroideo, lo que asegura la disponibilidad de I para la nueva síntesis de HT.

A nivel molecular, existen actualmente diversos vacíos en el conocimiento sobre los mecanismos de funcionamiento de estas dos enzimas, por lo que en función de eso se planteó la presente investigación, buscando dar respuesta a la pregunta:

¿Existen sitios responsivos tiroideo-relevantes presentes en los promotores de los genes que codifican para tDh e ID1?

1.2 Justificación

Los mecanismos involucrados en el proceso de regulación de la síntesis de HT han sido caracterizados en forma parcial, y es mucho lo que se desconoce acerca de la regulación del metabolismo intratiroideo del I. Se reconoce que la participación de las enzimas ID1 y tDh es relevante, pero los detalles a nivel de los promotores de los genes que las codifican aún se encuentran pobremente definidos.

El estudio de los procesos de regulación molecular de la GT, constituye una de las fronteras actuales del conocimiento dentro del campo de investigación de la fisiología tiroidea a nivel mundial, por lo que su estudio permitirá seguir sentando las bases sobre las que giran las patologías y tratamientos relacionados con esta, de manera tal que se puedan generar nuevos tratamientos y ante todo, se puedan entender aquellos síndromes derivados de diversos tipos de alteraciones.

En este sentido, se tiene plena conciencia de que mientras más se comprenda la fisiología de la GT, mejores bases poseerán los profesionales de la salud para dirigir de forma acertada sus intervenciones en tratamiento y cuidado.

1.3 Objetivos

Generales

- Reconocer, *in silico*, los sitios responsivos tiroideo-relevantes presentes en los promotores de los genes que codifican para tDh e ID1
- Identificar, *in vitro*, la presencia de sitios responsivos tiroideo-relevantes presentes en los promotores de los genes que codifican para tDh e ID1.

Específicos

- Determinar, *in silico*, la presencia de sitios responsivos tiroideo relevantes en los promotores de los genes que codifican para tDh e ID1.
- Determinar, *in vitro*, la presencia o ausencia de sitios responsivos a I, Tg y T₃ en los promotores de los genes que codifican para tDh y ID1.

1.4 Hipótesis

Ha: Los promotores de los genes que codifican para las enzimas que constituyen el sistema de reciclaje intratiroideo de I poseen sitios responsivos funcionales a I, Tg y T₃.

II. REVISIÓN DE LA LITERATURA

2.1 Generalidades embriológicas, anatómicas e histológicas de la glándula tiroides

Generalidades embriológicas

En la tercer semana de gestación, cuando el embrión humano mide entre 3.5 y 4 mm de longitud, comienza el desarrollo de la GT (Larsen *et al.*, 2003). Genéticamente hablando, participan en este proceso tres factores de transcripción (definidos por Zannini *et al.*, 1997 como mecanismos genéticos responsables de la diferenciación de los órganos) tiroideo relevantes: TTF1, uno de los más importantes para la organogénesis (Lazzaro *et al.*, 1991; Nonaka *et al.*, 2008); TTF2, responsable de la migración de la tiroides desde una posición sublingual a su posición definitiva en la traquea (Santisteban, 2004) y PAX8, el responsable de la formación de los folículos tiroideos (Santisteban, 2004; Trueba *et al.*, 2005; Solís-S y Valverde-R, 2006; Kopp *et al.*, 2007).

La GT se origina del revestimiento interno de la laringe (Sadler, 2007). Los cartílagos y músculos de dicho revestimiento, provienen del mesénquima de los arcos faríngeos cuarto y sexto. Como consecuencia de la rápida proliferación de este mesénquima, se modifica la conformación del orificio laríngeo, que de una hendidura sagital adquiere la forma de T. Posteriormente, el mesénquima se transforma en el cartílago tiroides (Sadler, 2007).

En la segunda mitad de la 4ª semana de gestación, se produce una invaginación del tejido, para dar lugar al conducto tirogloso, a partir del cual se desarrollarán el istmo y los lóbulos laterales de la GT (Miralles y De Leiva, 1996). El conducto tirogloso, que unía el lóbulo piramidal a la base de la lengua, comienza a obliterarse entre las 6ª y 8ª semanas para luego fragmentarse y desaparecer al concluir la embriogénesis tiroidea (Miralles y De Leiva, 1996).

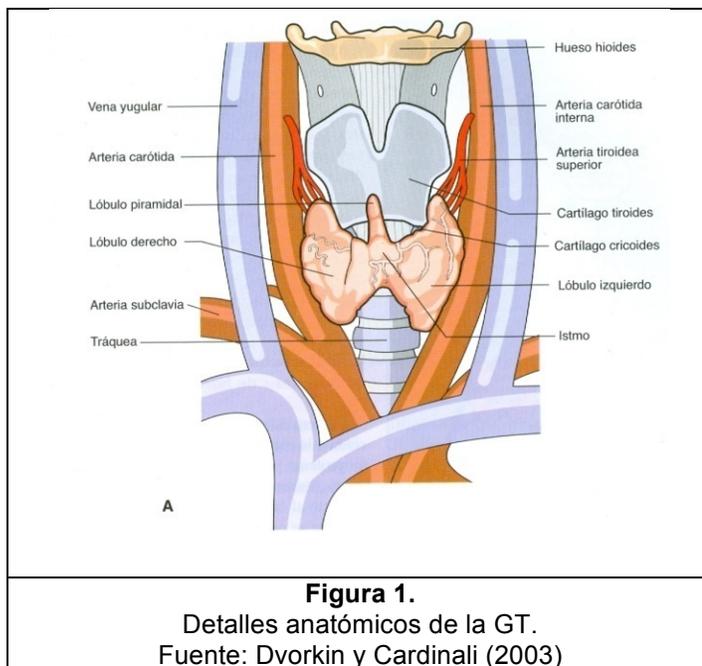
Generalidades anatómicas

La GT es una glándula endócrina voluminosa, impar, casi simétrica, localizada en el en la parte mediana del tercio inferior ventral del cuello (figura 1). Su peso en el humano adulto es de aproximadamente 15 a 20 g (Larsen *et al.*, 2003; Latarjet y Ruiz, 2005).

La GT está constituida por dos lóbulos (derecho e izquierdo) unidos por un istmo transversal, donde el conjunto adopta la forma de H. Su parte inferior es más gruesa que la superior, que se adelgaza hacia arriba hasta terminar en un vértice (Latarjet y Ruiz, 2005).

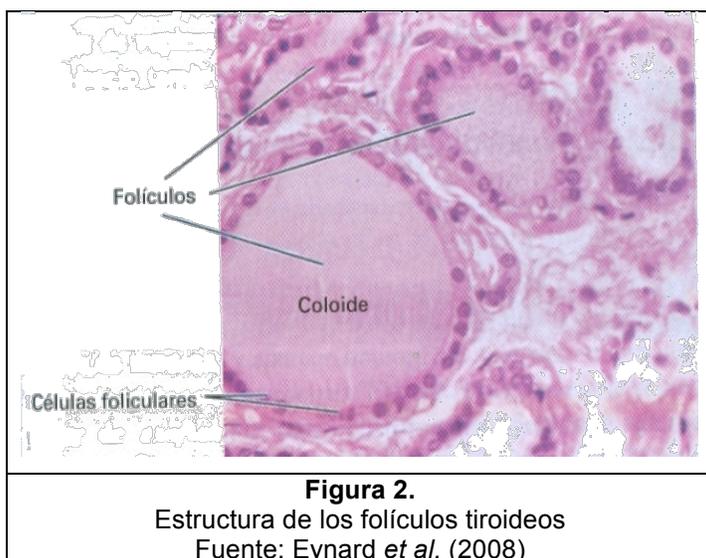
La cara anterior de la GT es convexa y su cara posterior es cóncava y abraza a

los dos primeros cartílagos traqueales. Su borde inferior es corto y cóncavo hacia abajo, a veces está desarrollado en un lóbulo tiroideo medio. Su borde superior es cóncavo hacia arriba, donde llega cerca del cartílago cricoides. Desde la parte media del borde superior, asciende el lóbulo piramidal (Piramide de Lalouette), que es una prolongación aplanada, alargada, cuyo vértice afinado alcanza el borde superior del cartílago tiroides y puede llegar al hueso hioides, desde donde está prolongado por un ligamento suspensor, vestigio del conducto tirogloso (Latarjet y Ruiz, 2005).



Generalidades histológicas

Histológicamente, la GT consta de acinos estrechamente empaçados, denominados folículos, los cuales constituyen la unidad anatómica y funcional de la tiroides. Los folículos tiroides están formados por células epiteliales llamadas tirocitos (figura 2) (Eynard *et al.*, 2008). Cada folículo se encuentra rodeado por capilares y estroma (McPhee *et al.*, 2003; Larsen *et al.*, 2003).



La cápsula de la GT consiste de tejido conjuntivo de colágeno fino del cual parten tabiques hacia el interior del parénquima glandular y lo subdividen en lobulillos. Las células parenquimatosas de la glándula tiroides forman folículos con coloide, compuestos por 1) células

foliculares (epitelio simple cúbico) y 2) células parafoliculares (células claras) ubicadas en la periferia de los folículos (Gartner y Hiatt, 2007).

El interior de los folículos está lleno con un coloide proteináceo claro, que constituye la mayor parte de la masa tiroidea (Larsen *et al.*, 2003). Dicho coloide está compuesto principalmente por tiroglobulina (Tg, proteína precursora en la síntesis hormonal) y HT almacenadas (McPhee *et al.*, 2003; García-Conde *et al.*, 2004).

2.2 El yodo como materia prima para la síntesis de HT

La materia prima para la formación de las HT es el I. Como se mencionó, el I es un micronutriente indispensable para la vida de los vertebrados. Su

importancia se debe a que sin él, no pueden sintetizarse las HT (Morreale y Escobar, 2008).

El I entra al cuerpo en el agua o en los alimentos, convirtiéndose de esta manera en yoduro (I⁻) en el estómago (Jara, 2001; Morreale y Escobar, 2008). La ingestión recomendada de I en el adulto es de 150 µg/día, si es inferior a 50 µg/día para los adultos (ver tabla 1), la GT es incapaz de mantener una secreción hormonal adecuada y como consecuencia se presenta hipertrofia tiroidea (Bocio) e hipotiroidismo (tabla 2) (Jara, 2001).

Tabla 1. Ingesta de I recomendada por grupo de edad

GRUPO	EDAD	I (µg/día)
Prematuros		> 30
Niños	0-5 meses	90
	6-12 meses	90
	1-3 años	90
	4-6 años	90
	7-10 años	120
Adultos		150
Mujeres embarazadas		250
Mujeres lactantes		300

Fuente: Morreale y Escobar (2008).

El principal aporte de I está en la alimentación. Las algas marinas del sushi, del género *Laminaria* (Wakame, Kombu, etc.) son el alimento que más I contiene (Markou *et al.*, 2001), seguido por los productos lácteos, huevo y carne. La sal aporta muy poco I, a no ser que se adicione artificialmente (sal yodada) (Muela *et al.*, 2008). El I⁻, se absorbe con rapidez en el tubo digestivo y se distribuye al torrente sanguíneo.

Aunque la concentración de I⁻ en el líquido extracelular varía en relación directa a su ingestión, lo habitual es que sea bastante baja por su captación por la tiroides y eliminación por los riñones (Jara, 2001).

Tabla 2. Desórdenes por deficiencia de I en diferentes etapas de la vida

PERIODO DE LA VIDA	PROBLEMÁTICAS
FETO	Abortos Mortinatos Anomalías congénitas Incremento de la mortalidad perinatal Cretinismo endémico Sordomudez
Neonato	Bocio neonatal Hipotiroidismo neonatal Retraso mental endémico Incremento de la susceptibilidad de la GT a radiación nuclear
Niños y adolescentes	Bocio Hipotiroidismo (subclínico) Hipertiroidismo (subclínico) Deterioro de la función mental Retraso en el desarrollo físico Incremento de la susceptibilidad de la GT a radiación nuclear
Adulto	Bocio, con sus complicaciones Hipotiroidismo Deterioro de la función mental Hipertiroidismo espontáneo en la vejez Hipertiroidismo inducido por I Incremento de la susceptibilidad de la GT a radiación nuclear

Fuente: WHO, 2004.

La GT capta aproximadamente 115 µg de I en 24 h; cerca de 50 µg se utilizan para la síntesis de hormonas y se almacenan en la tiroglobulina, mientras que el resto regresa al líquido extracelular. En promedio 8 a 10 mg de I se almacenan y protegen al organismo contra la carencia de este elemento. Este I hormonal está unido a proteínas séricas fijadoras de tiroxina, que constituyen el almacén circulante de alrededor de 600 µg de I hormonal (T₃ y T₄). La mayor parte del I de la dieta se excreta en orina (aproximadamente 485 µg/L) (Jara, 2001). En la figura 3 se muestra un esquema del metabolismo del I.

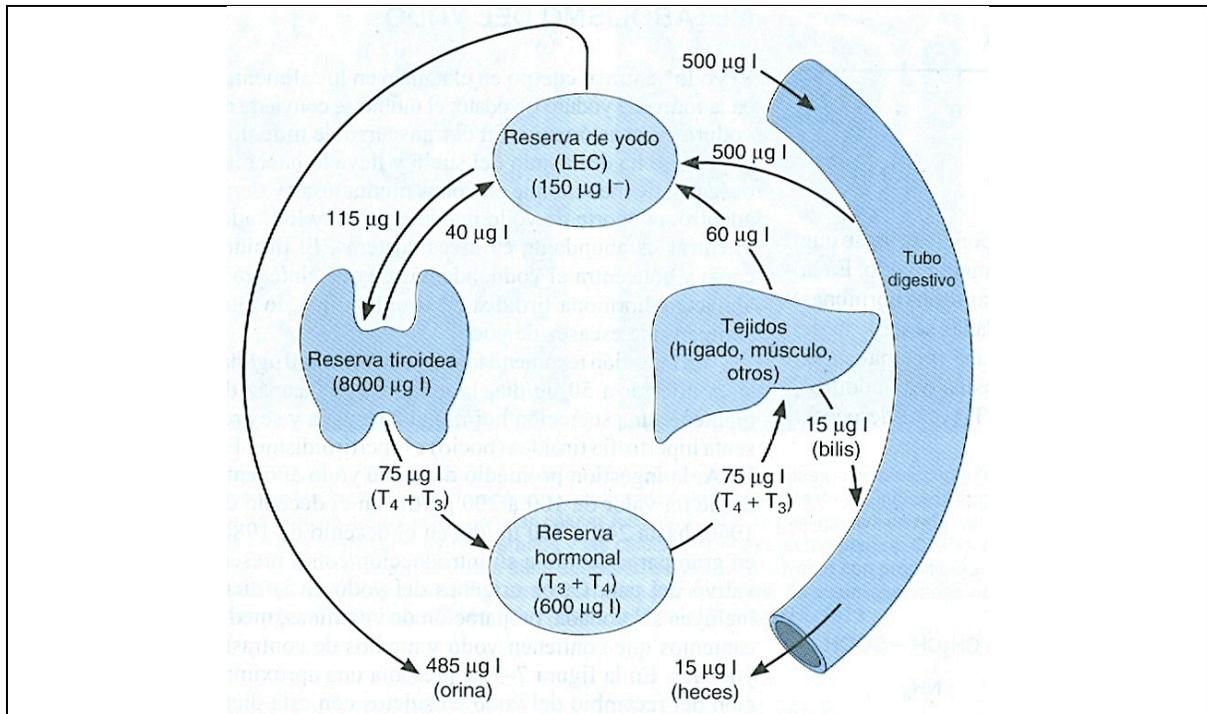
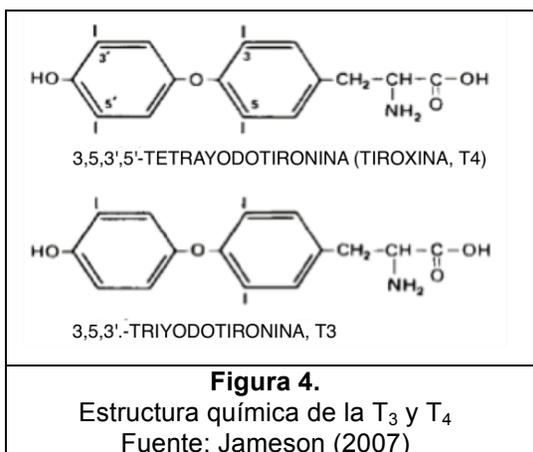


Figura 3. Metabolismo del I. Los valores indicados son representativos de los que se encontrarían en una persona sana que ingiere 500 µg de I al día.

Fuente: Greenspan y Gardner(1998).

2.3 Las hormonas tiroideas

Las HT (figura 4) poseen diversos efectos en el organismo (García-Conde *et al.*, 2004) (tabla 3). La triyodotironina (T₃) y la tiroxina (T₄) son el resultado de acoplamiento de dos yodotirosinas (Carrasco, 2005). Las HT participan en diversos procesos fisiológicos como son la termorregulación, el consumo de oxígeno, la síntesis y degradación de lípidos, glucogénesis y utilización de glucosa, la formación de vitamina A, contracción muscular, la motilidad intestinal, etc. Sin embargo, quizá su papel más relevante es durante el desarrollo fetal, donde son primordiales en la formación del sistema nervioso central, afectando la proliferación, viabilidad, diferenciación, migración, sinaptogénesis y mielinización de las células nerviosas (Cuevas, 2007).



Las HT regulan el ritmo de diversos procesos metabólicos, los cuales se describen a continuación (Sherwood, 2001; Solís-S y Valverde-R, 2006; Jameson, 2007; Eynard *et al.*, 2008):

- Ejercen su efecto al unirse a receptores del núcleo de las células “blanco”, donde activan la transcripción de ARNm específicos, con incremento de la

síntesis y el metabolismo de proteínas y carbohidratos.

- Su elevación acelera el metabolismo basal, mientras que una disminución lo reduce. Las HT son los reguladores más importantes del consumo de O₂.
- Su aumento en la circulación inhibe la producción y secreción hipotalámica de la hormona liberadora de la tirotrópina (TRH), y la Hormona Estimulante de la Tiroides o TSH, siendo esta última la responsable de la producción y liberación de T₄ y T₃.

El aspecto más relevante de las HT es que su deficiencia o exceso puede conducir a procesos patológicos como el bocio (incremento en el volumen de la GT), hipotiroidismo (disminuye en los niveles circulantes de HT), cretinismo (alteración irreversible en el desarrollo y crecimiento), hipertiroidismo (incremento en los niveles circulantes de las HT), etc. (Eynard *et al.*, 2008).

Tabla 3. Algunas funciones y efectos de las HT en el organismo.

Función	Efecto
Calorigénesis	Aumento de la glucólisis y consumo de oxígeno. Síntesis de agentes desacoplantes en la grasa parda.
Vitaminas	Participación en la síntesis de la vitamina A. Aumento en la demanda de otros componentes del complejo B. Disminución de la fosforilación de tiamina.
Crecimiento y diferenciación celular	Aumento en el crecimiento somático. Maduración del sistema nervioso. Osificación epifisiaria.
Sistema nervioso central	Esenciales en el desarrollo y maduración neuronal. Modulan la velocidad de conducción-excitación y los patrones de conducta.
Carbohidratos	Aumento de la absorción y utilización de glucosa, glucogenólisis. Degradación de insulina.
Corazón	Efecto inotrópico y cronotrópico. Sinergismo con catecolaminas.
Músculo	Disminución de la conversión de creatina a fosfocreatina.
Metabolismo hidroelectrolítico	Aumento en la filtración glomerular y diuresis extracelular de sodio.

Fuente: adaptado de Solís-S y Valverde-R (2006).

2.3.1 Mecanismo de síntesis

La síntesis de T_4 y T_3 por la GT incluye nueve etapas principales (**Figura 5**) (Sherwood, 2001; Greenspan y Gardner, 2005; Kopp en Braverman y Uttinger, 2005; Solís-S y Valverde-R, 2006; Levy *et al.*, 2006):

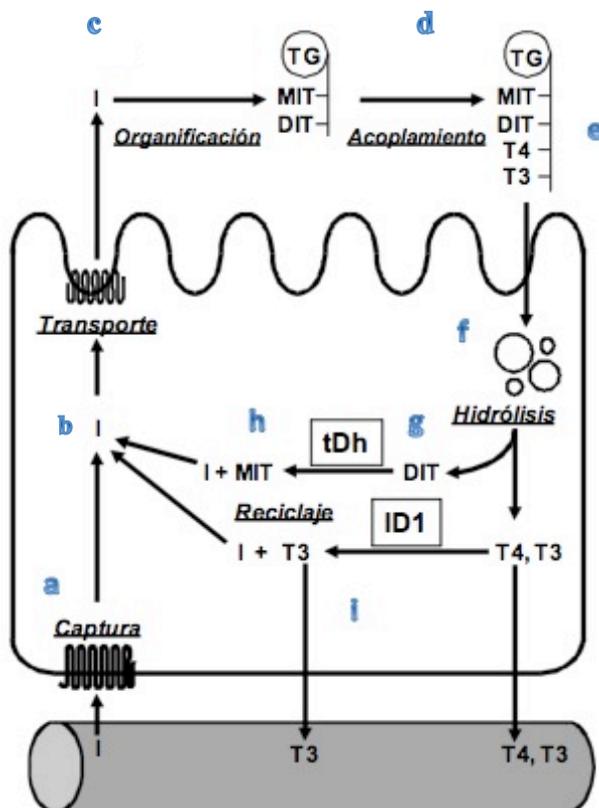


Figura 5. Síntesis de las HT. Se detallan a continuación los pasos clave en el proceso de síntesis hormonal:

a) El I se captura; b) Se transporta y c) se organifica en residuos tirosilo selectos de la Tg, dando origen a la monoyodotirosina (MIT) y diyodotirosina (DIT); d) Las yodotirosinas son acopladas para dar origen a las HT; e) todavía unidas a las moléculas de Tg. f) A continuación la Tg es endocitada e hidrolizada para liberar a las HT y a las yodotirosinas no acopladas. g) Finalmente, se lleva a cabo la desyodación intratiroidea por parte de la deshalogenasa de yodotirosinas (tDh) y h) la desyodasa tipo 1 (ID1), lo cual permite la reutilización o reciclaje del halógeno. i) Finalmente, las HT pasan a través de la membrana basolateral del tirocito para ser llevadas a los tejidos.
Fuente: adaptado de Solís-S y Villalobos (2008).

- a. Captación de I. El paso inicial es el transporte activo de I a través de la membrana basal desde la circulación hacia la GT. Este paso se conoce como transporte activo del yoduro al interior del tirocito y es llevado a cabo por el simportador Na^+/I^- (NIS). El paso del I dentro de la GT es contra el gradiente químico y eléctrico de la glándula.
- b. Formación de Tg madura. La Tg se sintetiza en el retículo endoplásmico, gobernado por factores de transcripción como TTF1, TTF2 y PAX8. La Tg es una larga glicoproteína, que sirve como matriz para la síntesis de tiroxina (T_4) y

triyodotironina (T_3). La tiroglobulina (Tg) es un precursor de las HT; es sintetizada por los tirocitos y secretada dentro del lumen de los folículos tiroideos, donde es almacenada como el mayor componente del coloide. En la interfase entre la célula y el coloide, modificaciones postraduccionales de la Tg ocurren, las cuales están caracterizadas por el acoplamiento de residuos tirosilo con el I, permitiendo la formación de residuos de HT con la molécula de Tg. La liberación hormonal requiere que se tome Tg del coloide por los tirocitos mediante endocitosis (Marinò y McCluskey, 2000).

El proceso de internalización y degradación de Tg por el tirocito debe ser estrictamente regulado para proporcionar cantidades adecuadas y evitar la liberación excesiva de HT. Un gran problema deriva de la extremadamente alta concentración de Tg dentro del coloide, la cual puede llegar a 800 mg/mL (Marinò y McCluskey, 2000).

Después de su síntesis, las cadenas peptídicas nacientes de Tg se separan en monómeros que forman dímeros estables. En este paso participan proteínas acompañantes (llamadas chaperonas) tales como calnexina, proteínas de unión (BIP), proteína 94 (GRP94) y proteína disulfuro isomerasa (PDI). Estas proteínas se localizan en el retículo endoplásmico y facilitan el correcto plegamiento de Tg. Las chaperonas escoltan a la Tg hasta el aparato de Golgi para su glucosilación.

- c. Transporte apical de I. Aquí el yoduro es transportado desde el polo apical del tirocito hacia la cavidad folicular mediante la proteína pendrina (PDS).
- d. Oxidación y organificación. Justo dentro del lumen del folículo, el I es incorporado dentro de moléculas particulares del tirocito, en sitios específicos dentro de la Tg. Este paso es llevado a cabo por la enzima peroxidasa tiroidea (TPO), la cual oxida al I^- , que le permite organificarse o unirse a la molécula de la Tg, específicamente en ciertos residuos tirosilo (llamados sitios

hormonogénicos). Este paso permite la formación de las yodotirosinas mono-yodo-tirosina (MIT), que posee dos átomos de I y di-yodo-tirosina (DIT) con un solo átomo de I.

- e. Acoplamiento. Unión de 2 residuos yodotirosilo, generando la estructura final de la HT. Las yodotironinas producidas en este proceso, así como las yodotirosinas no acopladas, permanecen unidas a la Tg dentro del coloide, constituyendo así un depósito glandular de HT y de I. Una molécula DIT es yuxtapuesta con otra molécula DIT para formar T_4 , o con una molécula MIT para formar T_3 .
- f. Proteólisis de tiroglobulina. En respuesta a la demanda de hormona tiroidea, la tiroglobulina es internalizada a la célula folicular por micro y macropinocitosis y digerida en los lisosomas, liberándose T_4 y T_3 , así como MIT y DIT.
- g. Desyodación de yodotirosinas. Las yodotirosinas, que contienen el 60% del I presente en la Tg, son desyodadas por la deshalogenasa tiroidea (tDh), enzima que permite que este I removido pueda “reutilizarse” e iniciar otro ciclo de síntesis hormonal.
- h. Desyodación intratiroidea de T_4 a T_3 . Aquí, la desyodasa de yodotironinas o ID1 (en este caso la tipo 1, que es la que funciona a nivel de glándula tiroides [ver más adelante]) desyoda la T_4 para producir T_3 , lo cual también permite que el I liberado sea reutilizado en otro ciclo de síntesis hormonal, e incrementa la cantidad de T_3 liberada hacia la circulación periférica.
- i. Finalmente, las HT pasan a la circulación a través de la membrana basolateral del tirocito, donde son llevadas a los tejidos blanco (Solís-S y Valverde-R, 2006).

La concentración plasmática normal de la T₄ es de 8 µg/dL y de la T₃ de aproximadamente 0.15 µg/dL. A nivel sanguíneo, ambas hormonas se enlazan a las proteínas plasmáticas, entre las cuales se incluyen la albúmina, la transtiretina y la globulina fijadora de tiroxina (TBG). Las proteínas fijadoras de hormona tiroidea sirven sobre todo para transportar T₄ y T₃ en el suero y facilitar su distribución uniforme a nivel tisular (McPhee *et al.*, 2003).

Las HT pueden ser metabolizadas por distintas vías: desyodación, sulfatación, conjugación con ácido glucorónico, descarboxilación y desaminación. Aproximadamente el 80% de la T₄ se metaboliza mediante desyodación, y cerca del 20% se excreta por las heces en forma de conjugados con ácido glucorónico (Jara, 2001; Brandan *et al.*, 2002).

2.4 Regulación en la producción hormonal

2.4.1 Eje hipotálamo-hipófisis-tiroides

La TRH es un tripéptido sintetizado y secretado en el hipotálamo por las neuronas del núcleo paraventricular. La TRH se secreta al sistema venoso porta hipofisario, y llega a la hipófisis anterior, donde regula la síntesis y liberación de la TSH (Greenspan y Gardner, 1998).

En la hipófisis anterior, la TRH se une a receptores específicos de membrana en las células tirotropas y secretoras de prolactina, lo que estimula la síntesis y liberación de TSH. Las HT provocan una depleción lenta de receptores hipofisarios para TRH, lo cual disminuye la respuesta a ésta, inhibiendo la producción de TRH y TSH. El estrógeno aumenta los receptores para TRH, incrementando la sensibilidad hipofisaria a esta hormona (Greenspan y Gardner, 1998).

La TSH, es una glicoproteína, sintetizada y secretada por los tirotrópos de la hipófisis anterior (Greenspan y Gardner, 1998). Esta hormona desempeña un papel crucial en el control fisiológico de la síntesis de las HT, al incrementar la producción de prácticamente todas las proteínas involucradas en la hormonogénesis (Levy *et al.*, 2006; Jameson, 2007). De esta forma, la TSH es el factor regulador primario del crecimiento de las células tiroideas; logrando su efecto al unirse al receptor específico de TSH (TSH-R) en la membrana del tirocito. La TSH tiene muchas acciones en la célula tiroidea, la mayor parte de ellas son mediadas por el AMPc, pero también puede estar implicado el sistema de activación del fosfatidilinositol (PIP₂) con aumento del calcio intracelular (Greenspan y Gardner, 1998).

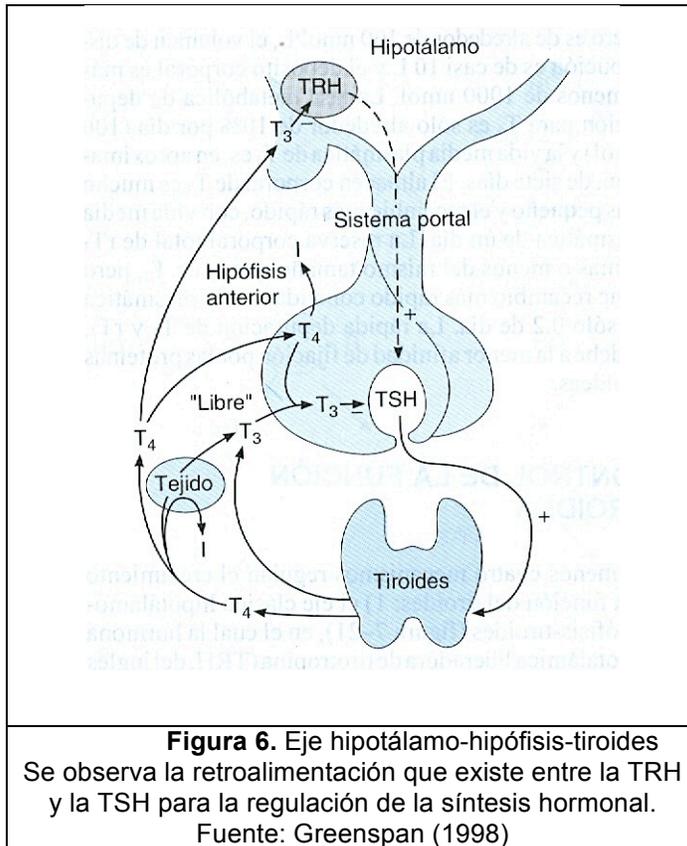
El punto de ajuste en este eje es el establecido por la TSH, donde el mecanismo se realiza a través del hipotálamo. Así, la Hormona Liberadora de Tirotrófica o TRH es el principal regulador positivo de la síntesis y excreción de TSH (Ver figura 6) (Jameson, 2007).

Una de las acciones de la TSH en el tirocito es inducir con rapidez la formación de pseudópodos en el límite célula-coloide, lo que acelera la resorción de Tg. De la misma manera, la TSH estimula todas las fases del metabolismo del I, desde el incremento en la captación y transporte de I hasta el aumento en la yodación de la Tg, y el incremento en la secreción de hormonas de transporte de I, mientras que la hidrólisis de PIP₂ y la elevación de Ca²⁺ intracelular estimulan la yodación de la Tg (Greenspan y Gardner, 1998).

El efecto de la TSH en el transporte de I es bifásico: al principio, disminuye (eflujo de I) y, después de un lapso de varias horas, incrementa la captación de I. El eflujo puede deberse a aumento rápido en la hidrólisis de tiroglobulina con liberación de la hormona y drenaje de I fuera de la glándula. Otra función de la TSH es el favorecer el incremento del ARNm para la tiroglobulina y peroxidasa

tiroidea (TPO), con aumento en la incorporación I en forma de MIT, DIT, T₃ y T₄. Así mismo, se incrementa la actividad lisosomal, con aumento de T₄ y T₃ a partir

de la glándula (Greenspan y Gardner, 1998).



Los niveles reducidos de HT aumentan la producción basal de TSH y potencian la estimulación de TSH mediada por TRH (debido a la falta de retroinhibición). Los niveles elevados de HT suprimen de forma rápida y directa la TSH e inhiben la estimulación de la TSH mediada por TRH, lo que indica que las HT son el regulador dominante en la producción de TSH. Sin

embargo, hay ciertos estados patológicos, como el bocio multinodular tóxico, que favorecen que la GT actúe de forma independiente, sin la regulación de la TSH (Álvarez *et al.*, 2004).

2.4.2 Yodo

En este sentido, el I por sí mismo actúa como un regulador de la síntesis de la HT, donde ante un incremento significativo en los niveles circulantes de I, se produce un bloqueo en la síntesis de HT, situación que se denomina efecto Wolff-Chaikoff, el cual es transitorio y la síntesis hormonal se reanuda a las 24-48 horas posteriores, por adaptación o escape de esta inhibición (Brandan *et al.*, 2002).

Con base en Eng *et al.* (1999, 2001) y Pearce *et al.* (2002), el efecto Wolff-Chaikoff se genera al haber ingesta excesiva de I, produciéndose una disminución en el ARNm del NIS y de su proteína, que a su vez lleva a la

disminución de la concentración de I intracelular. De igual manera, Kanno *et al.* (1992) señala que en respuesta a este efecto, hay una inhibición en la síntesis de tiroglobulina; así mismo hay una inhibición de la NADPH (Cardoso *et al.*, 2001). Así, Pearce *et al.* (2002) explica que este fenómeno no se da en todos los individuos y es una forma en que se puede presentar hipotiroidismo inducido por I, ya que, a pesar de la exposición sostenida al I, muchos individuos no pueden “escapar” al efecto agudo del Wolff-Chaikoff y continuar con la síntesis normal de las HT.

De acuerdo con Greenspan y Gardner (1998), el exceso de I inhibe muchas funciones tiroideas que incluyen: transporte de I⁻, formación de AMPc, generación de H₂O₂, síntesis y secreción de hormona, y la unión de TSH y TSH-R a su receptor para TSH.

2.4.3 Tiroglobulina

Recientemente se ha reportado que la propia Tg ejerce efectos reguladores predominantemente inhibitorios sobre el proceso de síntesis de las HT; sin embargo, los mecanismos responsables de este efecto permanecen en parte, desconocidos (Kohn *et al.*, 2001).

Bizhanova y Kopp (2009) señalan que se ha mostrado que la tiroglobulina participa en la supresión de genes tiroideo específicos, incluyendo el receptor a TSH, NIS, TPO y TG. La presencia de la tiroglobulina permite disminuir la expresión del gen que codifica para el NIS, lo que genera una reducción subsecuente del consumo de I, *in vitro*.

In vivo, la acumulación de tiroglobulina en el lumen folicular suprime el consumo de I. Se ha sugerido que la relación inversa entre la concentración de tiroglobulina en el lumen folicular y el I consumido puede ser importante en la

regulación de la función tiroidea bajo niveles constantes de TSH y promover el flujo de I dentro del lumen folicular (Bizhanova, 2009).

2.4.4 Triyodotironina

Aunque las HT pueden actuar en el organismo vía mecanismos no genómicos, pueden ejercer su función mayormente por la interacción con sus receptores nucleares (TRs por sus siglas en inglés). Los TRs son factores de transcripción que regulan la actividad de T_3 hacia genes específicos dependientes de ligando. Por lo tanto, el efecto biológico de T_3 en determinado tejido depende de un número variado de factores (Basset, 2003 citado por Puzianowska *et al.* 2006).

En la GT, T_3 incrementa marcadamente el ARNm del gen que codifica para la ID1, esto como consecuencia de la interacción directa de T_3 con el TR (Toyoda *et al.*, 1995).

2.5 Las desyodasas de yodotironinas

La desyodación es la transformación metabólica más importante de las HT, la cual se encuentra catalizada por enzimas denominadas desyodasas, de las cuales se conocen tres tipos: ID1, ID2 e ID3. Dichas enzimas se han clonado y su secuencia de aminoácidos se ha definido (Jara, 2001).

Las desyodasas son selenoproteínas, ya que tienen el aminoácido seleno-cisteína (Se-Cys) presente en el sitio activo de la enzima. La inserción de este aminoácido requiere por una parte, la presencia en el ARNm del codón UGA, comúnmente reconocido como codón de paro, pero que en este caso codifica para Se-Cys (Jara, 2001). De la misma manera, poseen un elemento SECIS (*selenocysteine insertion sequence*) en la región 3' no traducida (UTR) de su ARNm (Gereben *et al.*, 2008). Estas desyodasas poseen diferencias catalíticas y

sustratos específicos (ver tabla 4) (Toyoda *et al.*, 1997), por ejemplo, para ID1 el sustrato predilecto es rT_3 , para ID2 son T_4 y rT_3 y para ID3 son T_3 y T_4 (Gereben *et al.*, 2008).

Las 3 desyodasas, están presentes en todos los vertebrados estudiados hasta la fecha, indicando que la desyodación de la HT es un componente intrínseco en la homeostasis de la HT. En experimentos llevados a cabo en animales, se ha concluido que los cambios coordinados en la expresión y actividad de estas enzimas asegura la homeostasis de HT y la producción constante de T_3 , constituyendo el mayor mecanismo para la adaptación a los cambios como ingesta de I, hambruna y modificaciones en la temperatura del medio ambiente (Bianco, 2004).

La actividad biológica de las HT depende en gran medida de la localización de los átomos de I dentro de la molécula (Greenspan y Gardner, 2005). Las desyodasas regulan la actividad de las HT, eliminando las fracciones 5 o 5' de I de la molécula precursora T_4 (Bianco y Kim, 2006).

La desyodación del anillo externo de la T_4 , produce T_3 , que es entre 3 a 8 veces más potente que T_4 para ejercer sus efectos biológicos. La desyodación del anillo interno de la T_4 produce T_3 reversa (rT_3), metabólicamente inerte. La monodesyodación del anillo externo de la tiroxina aumenta la actividad metabólica del compuesto resultante (paso de T_4 a T_3); la del anillo interno es un “descenso” como proceso de inactivación de la hormona (paso de T_4 a rT_3) (Greenspan y Gardner, 2005).

La desyodasa tipo 1 es la más abundantemente expresada en múltiples tejidos. Tiene una afinidad más o menos baja por la T_4 (Jameson, 2007). Su función principal es proporcionar T_3 al plasma (Greenspan y Gardner, 2005), aunque no es su mayor productor (Gereben *et al.*, 2008); aumenta en el hipertiroidismo (Greenspan y Gardner, 2005) y disminuye en el hipotiroidismo. La

inhibición de esta enzima deteriora la conversión de T_4 a T_3 (Greenspan y Gardner, 2005).

Tabla 4 Características particulares de las desyodasas

PARÁMETRO	ID1	ID2	ID3
Anillo que desyoda	Interno y externo	externo	interno
Posición en que desyoda	5 o 5'	5'	5
Masa molecular (kDa)	29	30	32
Selenocisteína	Presente	Presente	Presente
Vida media	> 12 horas	~20 minutos	Horas
Localización cromosómica	1p32-p33	14q24.3	14q32
Acción fisiológica	Proporciona T_3 al plasma	Proporciona T_3 intracelular	Inactiva T_3 y T_4
Localización tisular	Hígado, riñón, músculo, tiroides	SNC, hipófisis, tejido graso pardo y placenta	Placenta, SNC, piel, hígado fetal
Hipotiroidismo	Disminuye en hígado y riñón. Aumenta en tiroides	Aumenta en todos los tejidos	Disminuye en cerebro
Hipertiroidismo	Aumenta en tiroides Aumenta en hígado y riñón	Disminuye en la mayoría de los tejidos. Aumenta en tiroides	Aumenta en cerebro

Fuente: Greenspan (2005); Gereben *et al.* (2008); Germain (2009).

La desyodasa tipo 2 cataliza exclusivamente la desyodación del anillo externo, generando la forma activa de la HT T_3 por desyodación de T_4 . Su efecto principal es mantener un valor constante de T_3 intracelular en los tejidos que la expresan. La reducción de T_4 circulante eleva con rapidez sus concentraciones en cerebro y células hipofisarias; las concentraciones altas de T_4 sérica reducen su cantidad, lo que protege a las células cerebrales de cantidades excesivas de T_3 (Greenspan y Gardner, 2005). Permite regular localmente las concentraciones de T_3 , una propiedad importante en la reposición de la T_4 ; la expresión de esta enzima se encuentra regulada por la HT (Jameson, 2007).

La desyodasa tipo 3 inactiva la T_4 al convertirla en rT_3 y la T_3 al convertirla en 3',5'- T_2 . Esta enzima se eleva en el hipertiroidismo y disminuye en el hipotiroidismo, con lo que ayuda a proteger al feto y al cerebro del exceso o deficiencia de T_4 (Greenspan y Gardner, 2005).

La actividad de las desyodasas puede substancialmente alterar la señalización de la HT, en una célula específica (Bianco y Kim, 2006). De forma general, las funciones de las desyodasas son tres:

- a. Al estar expresadas en los tejidos periféricos, proporcionan los medios para los controles tisular y celular locales de la actividad de las HT.
- b. Permiten la adaptación del organismo a los estados cambiantes del ambiente como la insuficiencia de I o la enfermedad crónica.
- c. Tienen participación importante en el desarrollo temprano de muchos vertebrados.

Para fines de este proyecto, la desyodasa con la que se trabajará será la tipo 1, puesto que es la que está presente en la GT, por lo que a continuación se presentan mayores detalles de la misma.

La desyodasa de yodotironinas tipo 1 (ID1), es el producto del gen *Dio1*, el cual se encuentra localizado en el cromosoma 1 en el humano. Este gen posee cuatro exones con el codón UGA en el exón 2 y el codón de paro y el elemento SECIS en el exón 4. Su proteína es de ~ 27 kDa (Gereben *et al.*, 2008).

Se ha demostrado que la T_3 incrementa marcadamente el ARNm del gen *Dio1*, como consecuencia de la interacción de T_3 con el receptor de la HT. La inducción en la expresión del gen requiere la interacción del ligando con el receptor de T_3 , el cual se une a una secuencia específica de ADN denominada Elementos Responsivos a Hormonas Tiroideas (TREs, por sus siglas en inglés). Estos TRE usualmente se encuentran en la región 5' de los genes responsivos a T_3 (Toyoda *et al.*, 1995).

El papel de esta desyodasa sobre la salud aún no es claramente conocido, sin embargo, como se mencionó previamente, su actividad se

incrementa en pacientes con hipertiroidismo, ya que en este padecimiento la desyodación por ID1 de T_4 es la principal fuente extratiroidea de T_3 (Gereben *et al.*, 2008; Bianco y Kim, 2006).

La ID1 convierte T_4 a T_3 proporcionando una fracción significativa (~50%) de T_3 en plasma en el humano hipertiroideo, pero una fracción mucho más baja que en el estado eutiroideo. En parte, esto es causado por el hecho de que la expresión del gen *Dio1* incrementa en respuesta a T_3 (Zhang *et al.*, 1998).

Esta desyodasa se encuentra regulada por una gran cantidad de factores, como factores de crecimiento y citoquinas. De la misma manera, la deficiencia de selenio reduce la actividad de la desyodasa, aspecto que se ha comprobado en estudios llevados a cabo en líneas celulares (Jakobs *et al.*, 1997).

2.6 Deshalogenasa de yodotirosinas.

Las yodotirosinas MIT y DIT, son desyodadas por una deshalogenasa intratiroidea y recicladas para la nueva síntesis de HT (Vono-Toniolo y Kopp, 2004). Esta desyodación enzimática es un proceso reductivo que permite que el I y la tirosina sean reutilizados para la síntesis de tiroglobulina (Gnidehou *et al.*, 2004). Debido a que MIT y DIT contienen la mayor cantidad de I dentro de la GT, estos son desyodados para el reciclaje del I y preservación de este raro elemento (Afink *et al.*, 2008).

La desyodación de las yodotirosinas ocurre predominantemente en los microsomas (aparato de Golgi) y requiere NADPH como un cofactor. La deshalogenasa es una proteína transmembranal, presente en la membrana plasmática celular y localizada mayormente en el polo apical del tirocito. Así mismo, la catepsina B, K y L contribuyen a la proteólisis extracelular de tiroglobulina en la superficie apical de la célula.

El *tDh*, ha sido identificado como el gen que codifica para la deshalogenasa de yodotirosinas (tDh) en la tiroides, la cual, como se ha visto, participa en el control del reciclaje de I en la síntesis de HT (Kopp, 2008). Dicho gen posee un tamaño de 33 kDa y está localizado en el cromosoma 6 (Krause *et al.*, 2007).

La deshalogenasa es una proteína que pertenece a las nicotinamida adenindinucleótidos, de la superfamilia de oxidasa/Flavin reductasa. Su secuencia esta altamente conservada entre los mamíferos. Esta enzima es mayormente expresada en la tiroides, pero además se ha detectado en el hígado, riñón y colon. La identificación del gen que codifica para esta enzima, ha proporcionado detalles bioquímicos en la desyodación *in vitro* de MIT y DIT (Afink *et al.*, 2008).

Los defectos congénitos en la desyodación de MIT y DIT generan una liberación excesiva de I, provocando una deficiencia de I que lleva a hipotiroidismo con bocio de tamaño variable (Gnidehou *et al.*, 2004).

La presencia de defectos en la deshalogenasa de yodotirosinas entre personas con hipotiroidismo hereditario, es desconocida. Se especula que la expresión límite durante el periodo neonatal y un posible enmascaramiento de estos defectos como un bocio no autoinmune, podría generar un subdiagnóstico del defecto en el gen (Moreno *et al.*, 2008). La tabla 5 muestra los distintos defectos en este gen.

Tabla 5. Mutaciones en el gen tDh1.

Mutación	Consecuencia
Arg101→Trp	Neutraliza la actividad del gen. Ausencia del flavin mononucleótidos-dependiente en la actividad de la deshalogenasa de yodotirosinas.
Ile116→Thr	Deja residuos significativos de la actividad de la Deshalogenasa de Yodotirosinas (ótDh). Disminución de la actividad de la desyodasa de yodotirosinas.
Phe105-Ile106→Leu	Neutraliza la actividad del gen. Ausencia del flavin mononucleótidos-dependiente en la actividad de la deshalogenasa de yodotirosinas.

Fuente: adaptado de Moreno, *et al.* (2008).

2.7 Estructura básica de un gen y su promotor

Un gen es una secuencia de ADN, de doble cadena, que codifica para un producto específico. Este producto puede ser una proteína (como en el caso de la mayoría de los genes) o puede ser ARN (como en el caso de los genes que codifican para ARNt y ARNr). El rasgo crucial es que el producto desconocido se produce lejos del sitio de síntesis para el que actúa (Lewin, 2000, 2008). Dentro del mismo gen, sólo una de las dos cadenas de ADN, la cadena molde, suele transcribirse a ARN (Pierce, 2006).

Se entiende por unidad de transcripción al tramo de ADN que codifica una molécula de ARN y las secuencias necesarias para la transcripción. Dentro de la unidad de transcripción se reconocen tres sitios críticos (figura 7): un promotor, una secuencia que codifica ARN y un terminador (Pierce, 2006). Para fines del proyecto, profundizaremos en los aspectos generales de la región promotora.

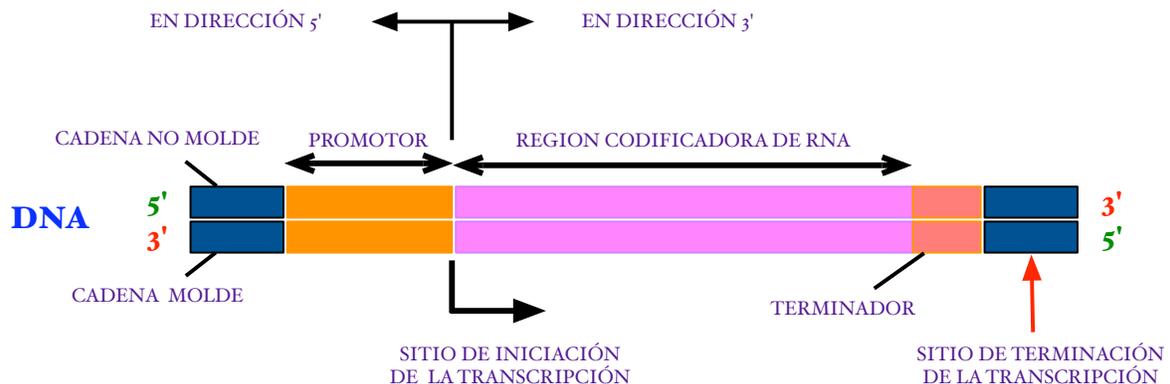


Figura 7. Unidad de transcripción y sus elementos críticos

Se aprecia la posición del promotor en el gen, la dirección en que se lleva a cabo la transcripción y los elementos para que se realice esta última.

Fuente: Lewin (2008)

Un promotor es una región de ADN involucrada en el reclutamiento de la ARN polimerasa que inicia la transcripción genética (Santisteban, 2004). La información para la función de un promotor es proporcionada directamente por una

secuencia de ADN: su estructura es la señal (Lewin, 2000). El promotor indica cuál de las dos cadenas de ADN debe ser leída como molde y la dirección de la transcripción, así como el primer nucleótido que será transcrito a ARN (Pierce, 2006).

Los factores de transcripción se unen a sitios responsivos específicos, localizados dentro de la región promotora de los genes blanco, donde llevan a cabo su efecto generalmente incrementando la tasa de transcripción y por consiguiente a la proteína activa (Santisteban, 2004).

Los genes se encuentran activos sólo en las células en las que son expresados y en las cuales iniciarán su transcripción, siempre y cuando posean los elementos necesarios. En este sentido, la transcripción de un gen en estado activo, está dada por la interacción del ARN polimerasa con el promotor. Un elemento (enzima, proteína, molécula, etc.) que hace que un gen responda a estos factores se determina por su posición dentro del promotor, dado que este posee elementos de respuesta o sitios responsivos (Lewin, 2008).

En resumen, “un gen es regulado por una secuencia en el promotor o *enhancer*, que es reconocido por una proteína específica. La proteína funciona como un factor de transcripción necesario para que la ARN polimerasa inicie. La proteína activa está disponible sólo bajo condiciones donde el gen va a ser expresado” (Lewin, 2008; Pierce, 2006).

III. METODOLOGÍA

La presente investigación contempló dos etapas: 1) modelo *in silico* y 2) modelo *in vitro*. A continuación se describe cada una de ellas.

3.1 Modelo *in silico*

Para llevar a cabo este proceso, se realizaron los siguientes pasos:

- a) En la base de datos de la Universidad Santa Cruz, en California (UCSC, <http://genome.ucsc.edu/>) se obtuvo una secuencia de 2 Kb de la región promotora de los genes que codifican para las enzimas *Dio1* y *tDh*, tanto para humano como para rata (modelo animal más utilizado en estudios *in vitro*).
- b) Se introdujo la secuencia de cada una de las enzimas (de humano y rata) en dos bases de datos, una pública y una privada, para poder obtener información específica relacionada con los elementos *cis*, lo que permitió realizar predicciones de los elementos tiroideos que codifican para la región promotora de las enzimas sujeto de estudio. Las bases de datos utilizadas se describen como sigue:
 - Genomatix-Matinspector (http://www.genomatix.de/online_help/help_matinspector/matinspector_help.html). Software de carácter privado. Para poder tener acceso ilimitado a sus funciones, es necesario cubrir una cuota. Mediante el registro personal del investigador, se puede trabajar en una versión *demo*.
 - TransFac-Patch 1.0 (<http://www.biobase-international.com/product/transcription-factor-binding-sites>). Software de carácter público. No se requiere cubrir ninguna cuota para poder trabajar en él.

- c) Se utilizaron los siguientes elementos responsivos para ubicar las posiciones:

Tabla 6. Denominación responsiva de los elementos tiroideo relevantes y su secuencia consenso

NOMBRE COMÚN ELEMENTO TIROIDEO	NOMBRE ALTERNO	SECUENCIA CONSENSO
TTF2	FOXE	
TTF1	NKX2.1	CCAAT
PAX8	PAX8	GGCAGGTAAGCACGAA
T ₃	RXR	RRGTCA YRRGGTCA
TSH	CAMP/AMPC	

- d) Se llevó a cabo una revisión bibliográfica exhaustiva en la base de datos de PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>), para identificar la información existente sobre los promotores de estudio, en modelos *in vitro* (figura 8).

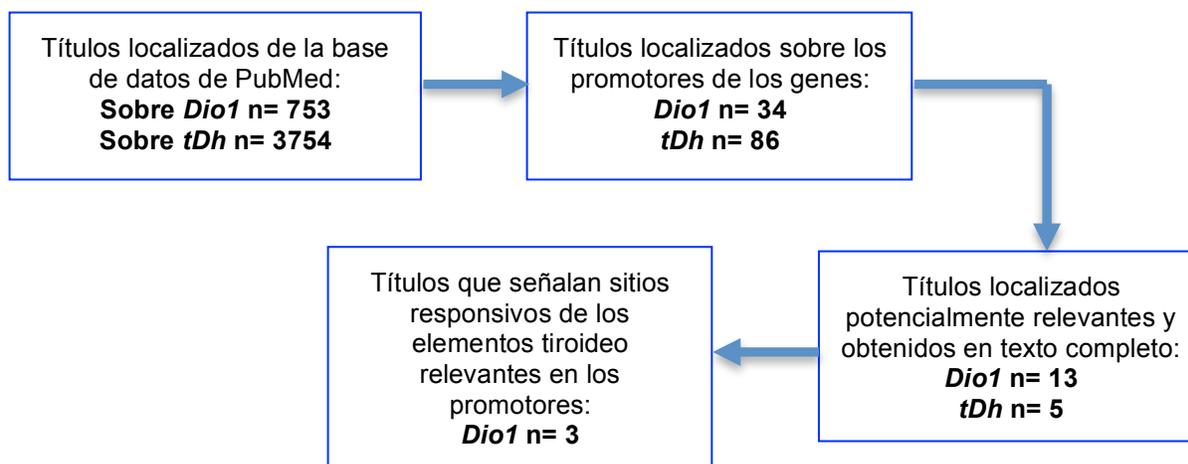


Figura 8. Proceso de búsqueda de artículos sobre *Dio1* y *tDh* en la base de datos de PubMed.

3.2 Modelo *in vitro*

3.2.1 Creación de vectores reporteros

Extracción de ADN genómico

A partir de una muestra sanguínea de 3 mL, se obtuvo ADN genómico, utilizando las instrucciones del fabricante del kit empleado (Wizard Genomic DNA Purification Kit by Promega).

PCR

Mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se realizó la amplificación de la región del promotor del gen que codifica para tDh e ID1, de fragmentos de 2kb, 1.5kb, 1kb y 0.5 kb (Phusion™ Hot Start by New England Biolabs).

Los oligos se diseñaron manualmente; con apoyo de la página del *New England Biolabs*, se determinaron las enzimas de restricción que se podían utilizar en este promotor. La secuencia de oligos se muestra a continuación, marcando las bases correspondientes a los sitios de restricción de las enzimas usadas para la digestión (subrayado):

tDh 2kb sentido: 5' TATAACGCGTCTGACACCCTTTCAG 3'

tDh 1.5 kb sentido: 5' TATAACGCGTCAGGAAATACATATATAAGTTTGT 3'

tDh 1.0 kb sentido: 5' TATAACGCGTTTTTTTTAGAGGAACTTTCAGT 3'

tDh 0.5 kb sentido: 5' TATAACGCGTTACTCCATATATTGGCTC 3'

tDh + 10 kb antisentido: 5' AAAACTCGAGGGAAATACATGGTCTGG 3'

ID1 2 kb sentido: 5' TTTTGGTACCCACTGAATTGGAAGCTGTA 3'

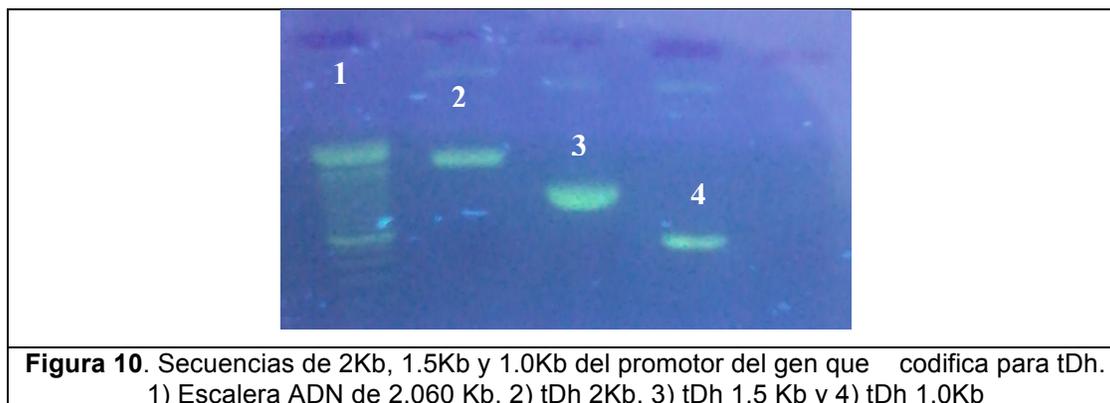
ID1 1.5 kb sentido: 5' TATAGGTACCGTCAAGAGTTCAAGACCAGC 3'

ID1 1.0 kb sentido: 5' TATAGGTACCTTCATTTAGGAAATGGTAGCG 3'

ID1 0.5 kb sentido: 5' TATAGGTACCCTGGGCGACAGAGC 3'

ID1 + 10 kb antisentido: 5' AAAAGCTAGCGCAGCCCCATCTC 3'

Los productos obtenidos en la PCR, se verificaron mediante electroforesis con gel de agarosa (figura 10).



Ligación

Los productos de PCR obtenidos fueron purificados, digeridos con las enzimas XhoI y MluI (*New England Biolabs*) y posteriormente ligados al vector pGL3 básico (Promega).

Transformación

Se llevó a cabo por la técnica de “*heat shock*”, empleando las células competentes XL Blue (Stratagene).

Comprobación de la construcción.

Se llevó a cabo la secuenciación y mapa de restricción en el laboratorio del Instituto de Neurobiología de la UNAM en Juriquilla, Querétaro (figura 10).

Cultivos celulares

Las células HeLa fueron mantenidas en medio modificado de Dulbecco, modificado del medio Eagle (DMEM) (Promega), conteniendo 10% de suero fetal bovino, 100 unidades/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomycin, a 37°C, en una atmósfera de CO₂ al 5%.

Las células PCCL3 se mantuvieron en medio F-12 modificado de Coon + 10% de suero fetal bovino + 100 unidades/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina, 2 µg/mL de doxiciclina, 5 mU/mL de TSH (Sigma), 10 µg/mL de insulina (Sigma) y 3.2 ng/mL de hidrocortisona factores de crecimiento, a 37°C; en una atmósfera de CO₂ al 5% (Fusco, 1987).

Ensayos de transactivación

Para llevar a cabo los experimentos, se transfectaron dos líneas celulares: HeLa y PCCL3. La primera se utilizó para contar con un grupo control (células de origen no tiroideo) de trabajo y la segunda para aplicar los tratamientos necesarios (células de origen tiroideo).

- El día anterior a la transfección, las células fueron distribuidas en platos de cultivo de 12 pozos y crecidas hasta alcanzar el 70% de confluencia. El vector pGL3 sin promotor, fue utilizado como control negativo en todos los experimentos.

Transfección

Para poder llevar a cabo este proceso, se trabajó con la técnica de precipitación con fosfato de calcio, donde:

- Se sembraron las células en los platos de cultivo y el día posterior se cambió el medio de cultivo que contenían, 5 horas antes de iniciar con la técnica. Estando las células semiconfluentes, estas se diluyeron en solución de fosfato de calcio (30

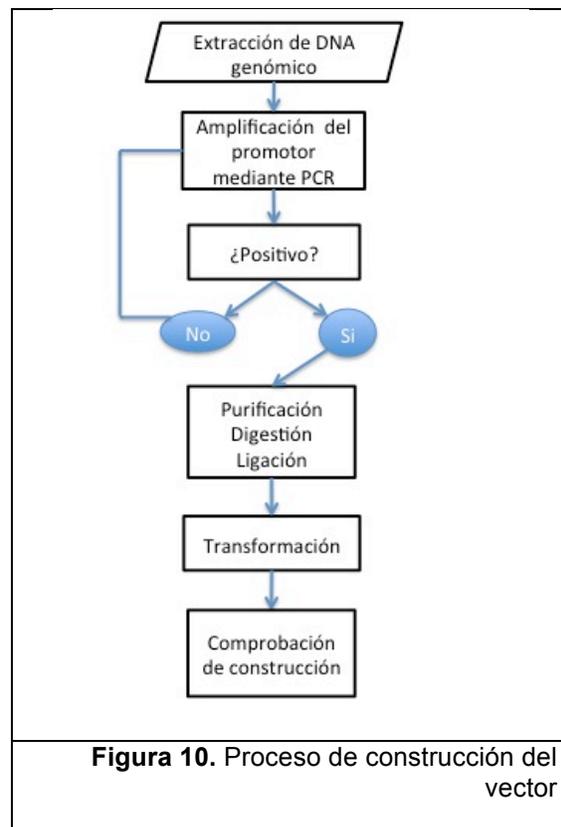


Figura 10. Proceso de construcción del vector

µg/ml). Al finalizar con este proceso, se lavaron las células con suero fetal bovino, agregando 1ml de DMSO al 25% (Promega) en solución taponada de HEPES (Promega) 1X.

Tratamientos experimentales

Consistió en agregar a los platos con células PCCL3 concentraciones fisiológicas de yodo (1µM), T₃ (40 nM) y Tg (1 mg/mL). Se contó para estos experimentos con un grupo control de células que no contaban con el vector reportero. Se utilizó un buffer de lisis conteniendo: 150 µL de Triton X, 15 µL de 1M DTT y 9 mL de buffer GME.

Ensayo de luciferasa

48 horas posterior a la transfección, con las condiciones señaladas en la tabla 6 se realizó el ensayo:

Tabla 7. Ensayo de luciferasa

BUFFER	CANTIDAD PARA 24 MUESTRAS
200 mM ATP	120 µL
SOLUCIÓN DE LUCIFERINA	
Buffer GME	4 mL
1M DTT	50 mL
Luciferina	1 mL

Una vez hecho lo anterior, se lisaron las células para evaluar la actividad del reportero en presencia del substrato de la luciferasa (luciferina) y la bioluminiscencia, las cuales fueron cuantificadas en el luminómetro mediante la siguiente reacción general:



para determinar la posible transactivación del vector reportero, bajo las condiciones experimentales empleadas. El ensayo de luciferasa incluyó una solución de luciferina + DTT + GME + ATP.

3.3 Ética del estudio

En este proyecto, no se hará uso de animales de laboratorio. Se trabajó con cultivos celulares, sin embargo, se cuidó el manejo apropiado de los desechos que de este estudio se derivaron, de manera tal que no existió contaminación de las personas que en él participaron o bien del medio ambiente.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Modelo *in silico*

Para cumplir con el objetivo de identificar *in silico*, los sitios responsivos tiroideo-relevantes presentes en los promotores de los genes que codifican para tDh e ID1, se trabajó con los software ya señalados, obteniéndose los siguientes resultados:

Tabla 8. Posición de los sitios responsivos identificados, *in silico*, en el promotor del gen *Dio1* humano.

ELEMENTO	Bases de datos	
	Privada	Pública
	POSICIÓN	POSICIÓN
TTF2 (FOXE)	No encontrado	No encontrado
TTF1 (NKX2.1)	No encontrado	No encontrado
PAX8 (PAX8)	97	384, 549, 678, 1088.
T ₃ (RXR)	135, 491, 640, 778, 809, 922, 1297, 1305, 1394, 1418.	144, 149, 151, 255, 261, 271, 334, 414, 497, 499, 517, 553, 605, 636, 662, 671, 726, 843, 959, 1028, 1303, 1311, 1313, 1331, 1497, 1728, 1872, 1890, 1954.
TSH (AMPc)	141, 406, 490, 596, 699, 870, 1303, 1304, 1870	149, 214, 264, 497, 704, 994, 1311, 1377, 1718.

Tabla 9. Posición de los sitios responsivos identificados, *in silico*, en el promotor del gen *Dio1* de rata.

ELEMENTO	Bases de datos	
	Privada	Pública
	POSICIÓN	POSICIÓN
TTF2 (FOXE)	No encontrado	No encontrado
TTF1 (NKX2.1)	No encontrado	No encontrado
PAX8 (PAX8)	1962	617, 1068
T ₃ (RXR)	1062, 1184, 1403, 1766	25, 90, 234, 242, 509, 545, 1114, 1227, 1266, 1291, 1419, 1510, 1526, 1833, 1865, 1954, 1969.
TSH (AMPc)	152, 524, 707, 1029	158, 427, 1625, 1715, 1761.

Fuente: Base de datos privada y base de datos pública

Tabla 10. Posición de los sitios responsivos identificados, *in silico*, en el promotor del gen tDh humano.

ELEMENTO	Bases de datos	
	Privada	Pública
	POSICIÓN	POSICIÓN
TTF2 (FOXE)	No encontrado	No encontrado
TTF1 (NKX2.1)	No encontrado	No encontrado
PAX8 (PAX8)	1259	1430, 1448, 1819, 1981
T ₃ (RXR)	1820, 78, 339, 684, 1210, 1225	91, 389, 682, 690, 1033, 1105, 1177, 1198, 1215, 1216, 1240, 1409, 1680, 1808.
TSH (AMPc)	1399, 1406, 1971, 1973, 1976, 1208.	312, 451, 855, 856, 1099, 1153, 1213, 1216, 1412, 1437, 1981, 1985.

Fuente: Base de datos privada y base de datos pública

Tabla 11. Posición de los sitios responsivos identificados, *in silico*, en el promotor del gen tDh de rata.

ELEMENTO	Bases de datos	
	Privada	Pública
	POSICIÓN	POSICIÓN
TTF2 (FOXE)	No encontrado	No encontrado
TTF1 (NKX2.1)	No encontrado	No encontrado
PAX8 (PAX8)	No encontrado	No encontrado
T ₃ (RXR)	249, 351, 626, 823, 1006, 1030, 1144, 1155, 1313, 1321, 1821, 1975	61, 237, 392, 457, 634, 795, 830, 924, 949, 1153, 1165, 1328, 1493, 1541, 1567, 1984.
TSH (AMPc)	623, 1159, 1423	98, 172, 702, 1163, 1166, 1982

Fuente: Base de datos privada y base de datos pública

Como se puede observar, no existe concordancia entre los valores arrojados por los programas, sobre el sitio responsivo de cada uno de los elementos, en las 2Kb del promotor del gen de la *tDh* y *Dio1* del humano y rata.

En el presente, no es posible hacer una comparación completa de los hallazgos en el modelo *in silico* con lo referido por la literatura en modelos *in vitro*, puesto que la caracterización de los promotores de los genes que codifican para ID1 y tDh, está poco definida, sobre todo en el caso de tDh.

Los datos con los que se cuenta de los sitios responsivos al promotor del gen de *Dio1*, se describe en la tabla 12.

Tabla 12. Posición de los sitios responsivos identificados en el promotor del gen *Dio1*, de humano y rata, en modelos *in vitro*.

ELEMENTO	HUMANO	RATA
TTF1	<i>No hay respuesta</i> en 6.5 Kb*.	---
TTF2	---	---
PAX8	No hay respuesta*	
T ₃ (RXR)	TRE1: 90 pb (TSS) independiente del RXR, DR10 TRE2: 660 pb (TSS), DR4. RXRTR clásico**, ***.	No se ha identificado, a pesar de que el gen en el ratón se incrementa posterior a la administración de T ₃ <i>in vivo</i> **.
TSH (AMPc)	---	---

Fuente: *Gereben, *et al.* (2001), **Toyoda *et al.* (1995), ***Zhang *et al.* (1998)

Gereben *et al.* (2001) señalan que no hay sitios responsivos en el promotor de ID1 para TTF1, lo cual coincide con lo expresado en el modelo *in silico*. Así mismo, hacen referencia que la misma ocurre con PAX8.

Para el caso de T₃, Toyoda *et al.* (1995) y Zhang *et al.* (1998) reportaron que hay sitios responsivos de este elemento en el promotor del gen de ID1 en las posiciones 90 y 660, resultados que tampoco coinciden con lo arrojado por los software público y privado.

4.2 Modelo *in vitro*

Los resultados se muestran como nivel de activación respecto a las células transfectadas con el vector reportero vacío, y se expresan como promedio \pm SD, correspondiente al menos a 3 experimentos independientes realizados por triplicado.

Con respecto al cumplimiento del objetivo del modelo *in vitro*, posterior a que se llevaran a cabo los experimentos señalados, se obtuvieron los siguientes resultados: en las células que recibieron tratamiento con I no hubo modificación en la expresión del reportero, tal como se aprecia en la figura 11.

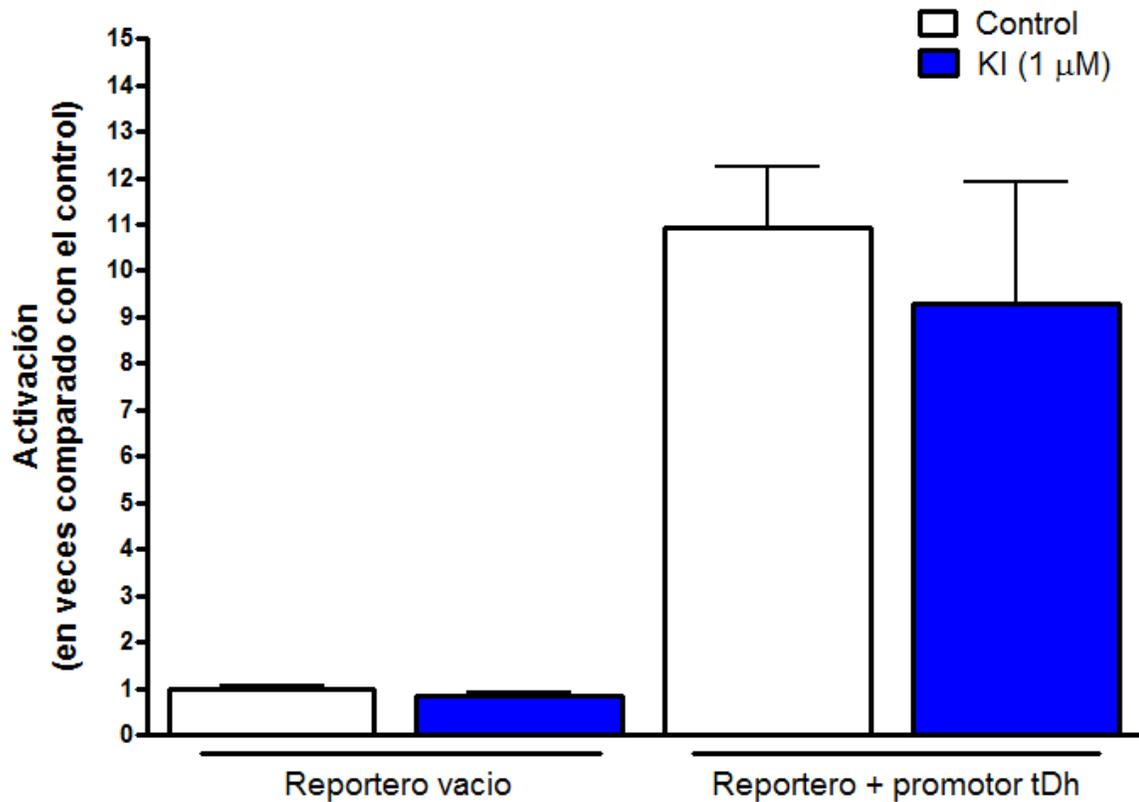


Figura 11. Células PCCL3 tratadas con yodo, en promotor reportero de 2kb (ver sección de material y métodos para mayor detalle). El reportero sin promotor fue utilizado como grupo control con y sin tratamiento. Como se observa, se incrementó la actividad del reportero en el grupo control, aunque no hubo diferencia significativa con el grupo experimental.

En las células que recibieron tratamiento con T_3 y T_g , igualmente no mostraron modificación en su reportero (figuras 12 y 13; respectivamente).

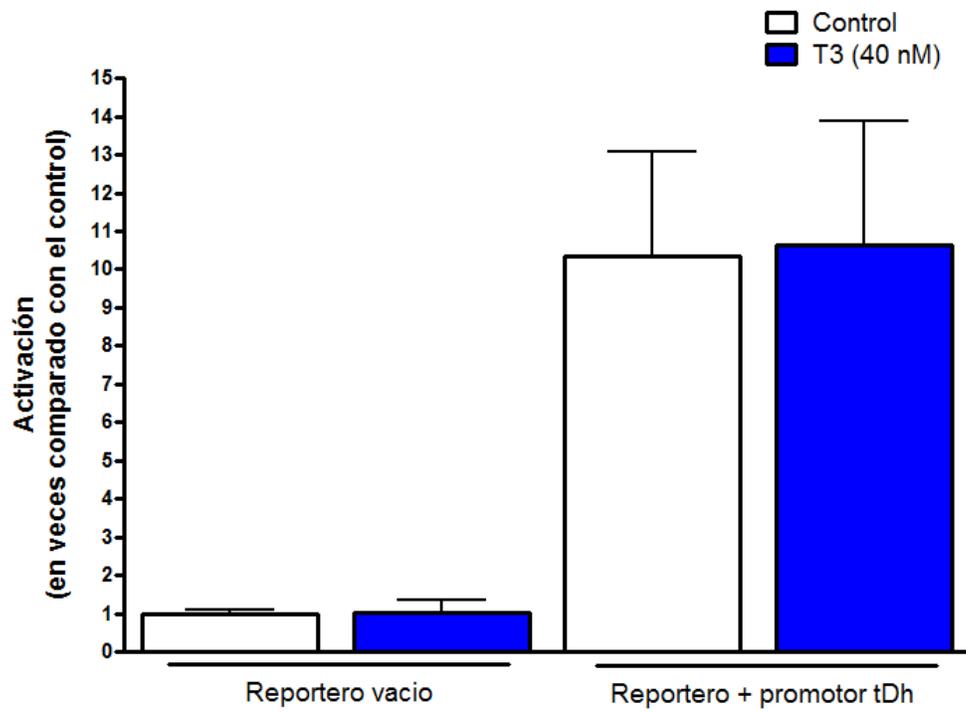


Figura 12. Células PCCL3 tratadas con T₃, en promotor reportero de 2kb

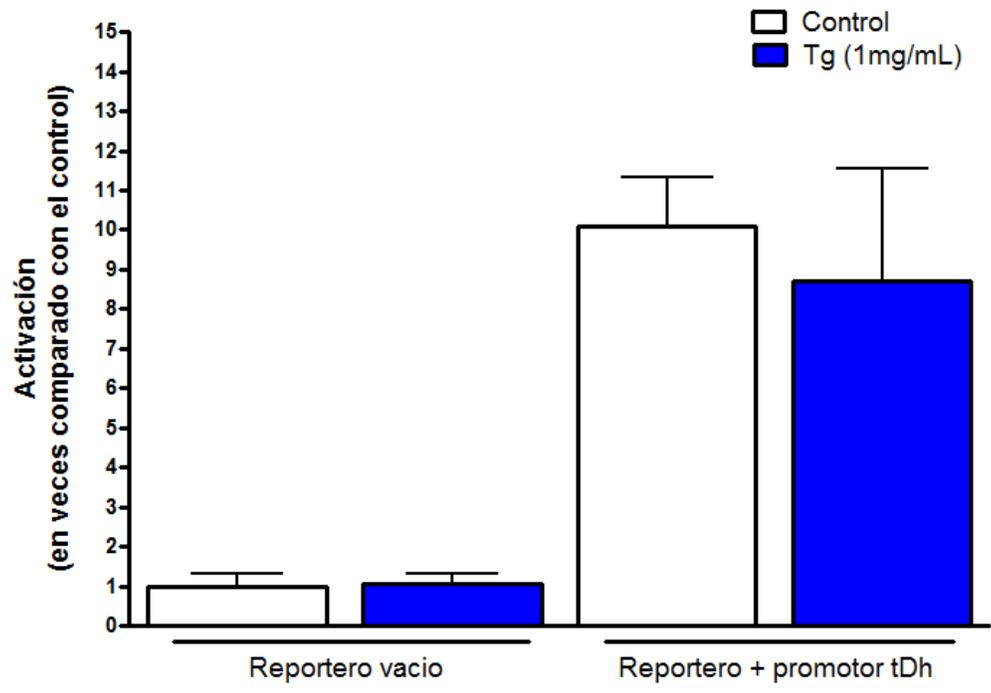


Figura 13. Células PCCL3 tratadas con Tg, en promotor reportero de 2kb

La falta de activación en todos los experimentos puede explicarse por:

- 1) Los sitios responsivos funcionales para tDh, para los factores de transcripción estudiados, no se encuentra dentro de la región promotora, sino más alejado del sitio de inicio.
- 2) La dosis empleada de concentraciones fisiológicas de I, T₃ y Tg no fue suficiente para generar respuesta y se necesita más.
- 3) El tiempo de respuesta para generar el efecto deseado requiere ser de mayor tiempo para montar la reacción en el promotor.
- 4) El compuesto evaluado con el reportero no tiene efecto sobre el promotor.
- 5) El número de experimentos no fue el suficiente como para observar una respuesta.

V. CONCLUSIONES

Los análisis realizados nos permiten, además de lo señalado, concluir que:

En el modelo *in silico*:

Los algoritmos actuales de los programas no son funcionales para GT, por lo que pierden confiabilidad; por lo tanto se considera importante elaborar un algoritmo especial para GT.

En el modelo *in vitro*:

Es necesario realizar mayores experimentos ya que estos resultados indican hasta el momento, que el efecto puede ser a nivel de la zona pre y postraducciona del promotor.

VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Afink, G., W. Kulik, H. Overmars, J. de Randamie, T. Veenboer, A. Van Cruchen, M. Craen, y C. Ris-Stalpers. 2008. Molecular characterization of iodotyrosine dehalogenase deficiency in patients with hypothyroidism. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 93:4894-4901.

Álvarez, P., M. San Juan, y F. Cordido. 2004. Hipertiroidismo. *Guías Clínicas* 31:1-4.

Andersson, M., B. Takkouche, I. Egli, H. Allen, y B. Benoist. 2005. Current global iodine status and progress over the last decade towards the elimination of iodine deficiency. *Bulletin World Health Organization* .83:518-525.

Bianco, A. 2004. Triplets! Unexpected structural similarity among the three enzymes that catalyze initiation and termination of thyroid hormone effects. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.* 48:1-20.

Bianco, A., y B. Kim. 2006. Deiodinases: implications of the local control of thyroid hormone reaction. *J. Clin. Invest.*116:2571-2579.

Bizhanova, A., y P. Kopp. 2009. The sodium-iodide symporter NIS and endrin in iodide homeostasis of the thyroid. *Endocrinology.* 140:1084-1090.

Brandan N, C. Llanos, C. Miño, P. Gerometta, y S. Sandrigo. 2002. Hormonas Tiroideas, mecanismos de acción. Universidad Nacional del Nordeste, Facultad de Medicina. Cátedra de bioquímica. Consultado en <http://ceupromed.ucol.mx/morfo/articulos/articulos/tiroides.pdf>

Braverman L y R. Utiger. 2005. *The thyroid. A fundamental and clinical text.*9th ed. Lippincott Williams & Wilkins. USA.

Braverman. 1999. Escape from the acute Wolff-Chaikoff effect is associated with a decrease in thyroid sodium/iodide symporter Messenger ribonucleic acid and protein. *Endocrinology.* 40: 3404-3410.

Cardoso L, D. Martins, M. Figueiredo, D. Rosenthal, M. Vaisman, A. Violante, y D. Carvalho. 2001. Ca^{2+} /Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-dependent H^2O^2 generation is inhibited by iodine in human thyroids. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86:4339–4343.

Carrasco N. 2005. Thyroid hormone synthesis. A. Thyroid iodine transport. Página 37 en *The thyroid. A fundamental and clinical text*. 9th ed. L. Braverman, y R. Utiger, eds. Lippincott Williams & Wilkins, Filadelfia, Filadelfia.

Cuevas E. 2007. Hormonas tiroideas y migración neuronal. Memorias. En http://www.inb.unam.mx/historias_noticias/2007/tiroides_puebla.pdf

Dvorkin, M., y D.P. Cardinali. 2003. Best & Taylor. Bases Fisiológicas de la Práctica Médica. 13ª ed. Edit. Med. Panam. Buenos Aires, Arg.

Eng, P., G. Cardona, S. Fang, M. Previti, S. Alex, N. Carrasco, W. Chin, y L.

Eng, P., G. Cardona, M. Previti, W. Chin, y L. Braverman. 2001. Regulation of the sodium iodide symporter by iodide in FTRL-5 cells. *Eur. J. Endocrinol.* 144:139-144.

Eynard, A., M. Valentich, y R. Rovasio. 2008 *Histología y embriología del ser humano*. 4ª ed. Ed. Medica Panamericana. Ciudad de México, México,

Fox, S. 2006. *Human physiology*. 9th. Ed. McGraw Hill. USA

Fusco, A., M. Berlingieri, P. Di Fiore, G. Portella, M. Grieco, y G. Vecchio. 1987. One- and two step transformations of rat thyroid epithelial cells by retroviral oncogenes. *Mol. Cell Biol.* 7: 3365-3370.

García-Conde, J., J. Merino y J. González. 2004. *Patología General. Semiología clínica y fisiopatología*. 2ª ed. McGrawHill Interamericana.

Gartner, L., y J. Hiatt. 2007 *Atlas color de histología*. (4ª Ed). Editorial Médica Panamericana.

Gereben, B., A. Zeöld, M. Dentice, D. Salvatore, y A.C. Bianco. 2008. Activation and inactivation of thyroid hormone by deiodinases: local action with general consequences. *Cell. Mol. Life Sci.* 65:570-590.

Germain, D., V. Galton, y A. Hernandez. 2009. Minireview: Defining the Roles of the Iodothyronine Deiodinases: Current Concepts and Challenges. *Endocrinology.* 150:1097-1107.

Gnidehou, S., B. Caillou, M. Talbot, R. Ohayon, J. Kaniewski, M. Noël-Hudson, S. Morand, D. Agnangji, A. Sezan, F. Courtin, A. Virion y C. Dupuy. 2004. Iodotyrosine dehalogenase 1 (DEHAL1) is a transmembrane protein involved in the recycling of iodide closet o the thyroglobulin iodination site. *FASEB J.* 18:1574-1576.

Greenspan, F. y D. Gardner. 1998. *Endocrinología básica y clínica*. 4ª ed. Manual Moderno. México.

Greenspan, F. y D. Gardner. 2005. Endocrinología básica y clínica. 6ª ed. Manual Moderno. México

Havis, E., L. Sachs y B. Demeneix. 2003. Metamorphic T3-response genes have specific co-regulator requirements. EMBO reports. 4:883-888.

Jakobs, T., C. Schmoltzler, J. Meissner y J. Köhrle. 1997. The promoter of the human type I 5' deiodinase gene. Eur J. Biochem. 247:288-297.

Jamerson, J. 2007. Harrison. Endocrinología. McGraw Hill Interamericana.

Jara, A. 2001 Endocrinología. Editorial Médica Panamericana. México

Kanno, J., H. Onodera, K. Furuta, A. Maekawa, T. Kasuga y Y. Hayashi. 1992. Tumor-Promoting Effects of Both Iodine Deficiency and Iodine Excess in the Rat Thyroid. Toxicol.Pathol.206:226-235.

Kohn, L., K. Suzuki, M. Nakazato, I. Royaux y E. Green. 2001 Effects of thyroglobulin and pendrin on iodide flux through the thyrocyte. Trends. Endocrinol. Metab. 12:10.

Kopp, P.A. 2008. Reduce, recycle, reuse – iodotyrosine deiodinase in thyroid iodine metabolism. N. Engl. J. Med. 358:856-9.

Kopp, P., L. Pesce, S. Schnyder, *et al.* 2007. Thyroid hormone synthesis. Memorias. En http://www.inb.unam.mx/historias_noticias/2007/tiroides_puebla.pdf

Krause, K., S. Karger, O. Gimm, S. Sheu, H. Dralle, A. Tannapfel, K. Schmid, C. Dupuy y D. Fuhrer. 2007. Characterization of DEHAL1 expression in thyroid pathologies. Eur. J. Endocrinol. 156:295-301.

Langman, S. 2007. Embriología médica. Con orientación clínica. 10ª ed. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina.

Larsen R, Kronenberg H, Melmed S y Polonsky K. 2003. Williams Textbook of Endocrinology. (10th Ed.) Saunders. USA

Latarjet, M. y L.A. Ruiz. 2005 Anatomía Humana. 4ª Ed. Edit. Med. Panam. Tomo 2. España.

Lazzaro, D., M. Price, M. De Felice y R. Di Lauro. 1991. The transcription factor TTF-1 is expressed at the onset of thyroid and lung morphogenesis and in restricted regions of the foetal brain. Development. 113:1093-1104.

Levy, M., B. Koepfen y B. Stanton. 2006. Berne & Levy. Principles of Physiology. Fourth Ed. Elsevier Mosby. USA

Lewin B. 2000. Genes VII. Oxford University Press.USA

Lewin B. 2008. Genes IX. Jones and Bartlett Publishers.USA

Marinò, M. y R. McCluskey. 2000. Role of thyroglobulin endocytic pathways in the control of thyroid hormone release. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 279:1295-1306.

Markou, K., N. Georgopoulos, V. Kyriazopoulou, y A.G. Vagenakis. 2001. Iodine-Induced hypotiroidism. *Thyroid.* 11:501-510.

McPhee, S., V. Lingappa y W. Ganong. 2003. Fisiopatología médica: unaintroducción a la medicinaclínica. 4ª ed. Manual moderno. México.

Miralles, J. y A. De Leiva. (1996).Endocrinología y nutrición. Kadmos. Ediciones Universidad Salamanca. España.

Moreno, J.C., W. Klootwijk, H. Van Toor, G. Pinto, M. D'Alessandro, A. Lèger, D. Goudie, M. Polak, A. Grütters y T. Visser. 2008. Mutations in the iodotyrosine deiodinase gene and hypothyroidism. *N. Engl. J. Med.* 358: 1811-8.

Morreale, G. y F. Escobar. 2008. Metabolismo de las hormonas tiroideas y el yodo en el embarazo. Razones experimentales para mantener una ingesta de yodo adecuada en la gestación. *Endocrinol Nutr.* 55:7-17.

Muela, J., A. García, R. Torres, P. Santiago y F. Sóriguer. 2008. Efectos de la deficiencia de yodo sobre variantes intelectuales en una población infantil. *Psicothema.* 20:279-284.

Nonaka, D., Y. Tang, L. Chiriboga, M. Rivera y R. Ghossein. 2008. Diagnostic utility of thyroid transcription factors Pax8 and TTF-2 (FoxE1) in thyroid epithelial neoplasms. *Modern Pathology.* 21:192-200.

Pearce, E.,R. Gerber, D. Gootnick, L. Khan, R. Li, S. Pino y L. Braverman. 2002. Effect of Chronic Iodine Excess in a Cohort of Long-Term American Workers in West Africa. *J. Clin. End. Metab.* 87:5499-5502.

Pérez-López F.R. 2007. Iodine and thyroid hormones during pregnancy and postpartum. *Gynecological Endocrinology.* 23:414-428.

Pierce, B. 2006. Genética. Un enfoque conceptual. Edit. Med. Paname. 2ª edición.

Poolev, A., H. Fickenscher, S. Mundlos, A. Winterpacht, B. Zabel, A. Fidler, P. Gruss y D. Plachov. 1992. PAX8, a human paired box gene: isolation and expresion in developing thyroid, kidney and Wilms's tumors. *Development* 116: 611-623.

Puzianowska-Kuznicka, M., M. Pietrzak, O. Turowska y A. Nauman. (2006) Thyroid hormones and their receptors in the regulation of cell proliferation. *Acta Biochim Pol.* 53:641-650.

Rivolta, C., C. Moya, S. Esperante, V. Gutnisky, V. Varela y H. Targovnik. 2005. La tiroides como modelo de mecanismos moleculares en enfermedades genéticas. *Medicina.* 65:257-267.

Santisteban, P. 2004. Mecanismos moleculares implicados en la función tiroidea: control de procesos fisiológicos y alteraciones patológicas. En http://webs.uvigo.es/endocrinologia/PDFS%202004_05/PDFS/Tiroides_P Santisteban.pdf Consultado en: junio de 2009

Solís-S, J. y C. Valverde-R. 2006. Hipotiroidismo neonatal: fisiopatogenia, aspectos moleculares, metabólicos y clínicos. *Rev. Invest. Clin.* 58: 318-334.

Solís-S, JC; P. Villalobos; A. Orozco; A. Quintanar-Stephano, P. García-Solís, H.L. Hernández-Montiel, L. Robles-Osorio, A. Hernández-Lomelí, G.E. Leo-Amador y C. Valverde-C. Regulación de la desyodación intratiroidea y su relación con el efecto Wolff-Chaikoff. Memorias. Jornadas 2008. Instituto de Neurobiología, UNAM Campus Juriquilla. Querétaro, Mex. En http://www.smb.org.mx/XXVIICONGRESO/Text/AREA-2/CARTELES/2_2.pdf.

Sherwood, L. 2001. *Human Physiology. From Cells to System.* 4th Ed.

Taki, K., T. Kogai, Y. Kanamoto, J. Hershman y G. Brent. 2002. A thyroid-specific Far-Upstream Enhancer in the Human Sodium/Iodide Symporter Gene Requires Pax-8 Binding and Cyclic Adenosine 3', 5'-Monophosphate Response Element-Like Sequence Binding Proteins for Full Activity and Is Differentially Regulated in Normal and Thyroid Cancer Cells. *Mol Endocrinol.* 16:2266-228.

Terry, B., D. Zulueta y M. de la Paz. 2006. Propuesta de sistema de vigilancia de la producción, distribución y consumo de sal yodada en Cuba. *Rev. Cubana Hig. Epidemiol.* 44:1561-3003.

Toyoda, N., E. Kaptein, M.J. Berry, J.W. Harney, P.R. Larsen y T.J. Visser. 1997. Structure-activity relationships for thyroid hormone deiodination by mammalian type I iodothyronine deiodinases. *Endocrinology.* 138:213-9.

Toyoda, N., A. Zavacki, A. Maia, J. Harney y R. Larsen. 1995. A novel retinoid X Receptor-Independent thyroid hormone response element is present in the human type 1 deiodinase gene. *Mol. Cell. Biol.* 15:5100-5112.

Trueba, S.S., J. Augé, G. Mattei, H. Etchevers, J. Martinovic, P. Czernichow, M. Vekemans, M. Polak y T. Attie-Bitach. 2005. PAX8, TITF1, and FOXE1 gene expression patterns during human development: new insights into human thyroid

development and thyroid dysgenesis-associated malformations. *J.Clin.Endocrinol. Metab.* 90:455–462.

Vono-Toniolo, J. y P. Kopp. 2004. Thyroglobulin Gene Mutations and Other Genetic Defects Associated With Congenital Hypothyroidism. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.* 48:70-82.

Wang, K., Y. Sun, J. Liu, Y. Zhang, Y. Ye, L. Lin, Y. Yan y Z. Chen. 2009. The impact of iodine excess on thyroid hormone biosynthesis and metabolism in rats. *Biol. Trace Elem. Res.* 130:72-85.

World Health Organization, Department of Nutrition for Health and Development. 2004. Iodine status Worldwide. WHO Global data base on Iodine Deficiency. Ginebra Disponible en <http://whqlibdoc.who.int/publications/2004/9241592001.pdf>. Consultado el 28 de septiembre de 2009.

Zannini, M., V. Avantaggiato, E. Biffali, M. Arnone, K. Sato, M. Pischetola M, B. Taylor, S. Philips, A. Simeone y R. Di Lauro. 1997. TTF-2, a new forkhead protein, shows a temporal expression in the developing thyroid which is consistent with a role in controlling the onset of differentiation. *EMBO J.* 16:3185–3197.

Zhang, C., S. Kim, J. Harney y R. Larsen. 1998. Further characterization of thyroid hormone response elements in the human type 1 iodothyronine deiodinase gene. *Endocrinology.* 139:1156-1163.

Zimmermann M. 2008. Iodine requirements and the risks and benefits of correcting iodine deficiency in populations. *JTrace Element in Med Biol* 22:81-92.

Zimmermann M. 2009. Iodine deficiency. *Endocrine Reviews.* 30:376-408.