

UNIVERSITA' DI PISA



Facoltà di Medicina e Chirurgia  
Scuola di Dottorato in Neuroscienze e Scienze Endocrinometaboliche  
Programma di Dottorato: Esplorazione Molecolare, Metabolica E  
Funzionale Del Sistema Nervoso E Degli Organi Di Senso

Ciclo XXV

SSD BIO/10

Tesi di dottorato

***Dosaggio della 3-iodotironamina ( $T_1AM$ ) e sua  
distribuzione nei tessuti e nel sangue.***

CANDIDATO

Dr.ssa Maja MARCHINI

RELATORE

Prof. Riccardo ZUCCHI

Anno Accademico 2011-2012

*Come sempre, ai miei genitori*

*A Gabriele*

*La saggezza non è solo  
sintomo di cose fatte bene,  
ma anche di errori  
che servono da lezione.*

*La vita dell'uomo consiste nell'affetto  
che principalmente lo sostiene e nel quale  
trova la sua più grande soddisfazione.*

*San Tommaso*

*Il lavoro di questa tesi è stato svolto presso il Dipartimento di Scienze dell'Uomo e Dell'Ambiente, Sezione di Chimica e Biochimica Medica.*

*Un ringraziamento particolare al Professor Riccardo Zucchi, per avermi coinvolto in questo progetto di ricerca e per avermi dimostrato che si può essere "grandi uomini" senza mai perdere di umanità, comprensione e gentilezza.*

*Un grazie di tutto cuore al Dott. Alessandro Saba, costantemente presente, per il sostegno, la pazienza, la disponibilità e gli utili consigli durante tutto il percorso ed in particolare durante il periodo di stesura della tesi. E per le chiacchierate lavorative e non davanti ad un buon caffè in compagnia del Dott. Andrea Raffaelli.*

*Desidero ringraziare le Dott.sse Grazia Chiellini, Sandra Ghelardoni, Vittoria Carnicelli, Giuseppina D'Urso per la disponibilità e l'aiuto, sia sul piano tecnico-scientifico che umano. Infine ringrazio la Dott.ssa Sabina Frascarelli che in questi anni da collega si è trasformata in amica, con la quale ho condiviso non solo interminabili ore di lavoro, ma anche bei momenti, mettendo a mia disposizione le sue orecchie, la sua esperienza e la sua vitalità.*

## RIASSUNTO

Lo scopo di questa tesi è la messa a punto di una metodica per il dosaggio quantitativo delle tironamine, ed in particolare della 3-iodotironammima ( $T_1AM$ ), mediante spettrometria di massa accoppiata ad HPLC.

È stata svolta una analisi dettagliata dei vari stadi della preparazione del campione e della tecnica di rilevazione per definire le condizioni migliori.

Dopo alcuni studi preliminari per individuare il limite di rilevabilità (limit of detection, LOD), il limite di quantificazione (limit of quantification, LOQ), la linearità, l'accuratezza e la specificità, il recupero dell'analita dal processo di estrazione in fase solida, l'effetto matrice (la soppressione ionica) e la stabilità del campione, sono state svolte analisi su campioni ematici umani e su tessuti animali ed umani.

Il metodo si è dimostrato in grado di rilevare la presenza di  $T_1AM$  in tutti i campioni analizzati. È stato quindi possibile confrontare per la prima volta le concentrazioni di  $T_1AM$  in diversi tessuti di ratto, mostrando che i livelli maggiori si riscontrano nel fegato, nel rene e nel sistema nervoso centrale. Le concentrazioni tissutali risultano essere maggiori delle concentrazioni ematiche, suggerendo l'esistenza di specifici meccanismi di accumulo cellulare, confermati da esperimenti condotti in colture cellulari e nel cuore isolato.

A livello tissutale la  $T_1AM$  va incontro a deaminazione ossidativa a dare acido 3-iodotiroacetico e può essere inoltre deiodinato a dare tironamina. La via di sintesi della  $T_1AM$  non è stata ancora chiarita, ma esperimenti condotti in vivo dimostrano che la produzione è inibita dal trattamento con perclorato e metimazolo, e che in presenza di tali inibitori della funzione tiroidea la  $T_1AM$  non può essere prodotta da  $T_4$  esogeno.

Grazie alla disponibilità di campioni di siero ottenuti da volontari sani, pazienti cardiopatici e pazienti endocrinologici abbiamo potuto dimostrare per la prima volta la

presenza di T<sub>1</sub>AM nel sangue umano, in una casistica di 42 pazienti. La concentrazione media è risultata pari a  $0.219 \pm 0.012$  pmol/mL ed è significativamente correlata a quella degli ormoni tiroidei. Si è inoltre osservata una significativa correlazione con i livelli di emoglobina glicosilata ed un incremento significativo dei suoi livelli in un sottogruppo di pazienti diabetici.

La metodica sviluppata è stata inoltre utilizzata per supportare studi comportamentali conseguenti alla somministrazione di T<sub>1</sub>AM esogeno a topi per via i.c.v.. Si è dimostrato che un aumento dei livelli cerebrali di T<sub>1</sub>AM di circa un ordine di grandezza si associa ad una migliore performance in test di apprendimento, ad una riduzione della soglia del dolore e a una riduzione dell'assunzione di cibo.

Pubblicazioni prodotte durante il dottorato.

1. Saba, A.; Chiellini, G.; Frascarelli, S.; Marchini, M.; Ghelardoni, S.; Raffaelli, A.; Tonacchera, M.; Vitti, P.; Scanlan, T.S.; Zucchi, R.. *Tissue distribution and cardiac metabolism of 3-iodothyronamine*. *Endocrinology* **2010**, 151, 5063–5073.
2. Pol, C.P., Muller, A.; Zuidwijk, M.J.; van Deel, E. D.; Kaptein, E.; Saba, A.; Marchini, M.; Zucchi, R.; Visser, T.J.; Duncker, D.J.; Paulus, W.J.; Simonides, W.S.. *Left-ventricular remodeling following myocardial infarction is associated with a cardiomyocyte specific hypothyroid condition*. *Endocrinology*, **2011**, 152, 669–679.
3. Agretti, P.; De Marco, G.; Russo, L.; Saba, A.; Raffaelli, A.; Marchini, M.; Chiellini, G.; Grasso, L.; Pinchera, A.; Vitti, P.; Scanlan, T.S.; Zucchi, R.; Tonacchera, M.. *3-Iodothyronamine metabolism and functional effects in FRTL5 thyroid cells*. *J. Mol. Endocrinol.*, **2011**, 47, 23–32.
4. Galli, E.; Marchini, M.; Saba, A.; Berti, S., Tonacchera, M.; Vitti, P.; Scanlan, T.S.; Iervasi, G.; Zucchi, R.. *Detection of 3-iodothyronamine in human patients: a preliminary study*. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **2012**; 97(1), E69-74.
5. Raimondi, L.; Manni, M.E.; Di Siena, G.; Dicembrini, I.; Saba, A.; Marchini, M.; Bigagli, E.; Cinci, L.; Lodovici, M.; Chiellini, G.; Zucchi, R.. *3-iodothyronamine, a modulator of the hypothalamus-pancreas-thyroid axes in mouse*. *Br. J. Pharmacol.*, **2012**, 166 (2), 650-658.
6. Hackenmueller, S.A.; Marchini, M.; Saba, A.; Zucchi, R.; Scanlan, T.S. *Biosynthesis of 3-iodothyronamine (TIAM) is dependent on the sodium-iodide symporter and thyroperoxidase but does not involve extrathyroidal metabolism of T4*. *Endocrinology*, **2012**, 153 (11), 5659-5667.
7. Manni, M.E.; De Siena, G., Saba, A.; Marchini, M.; Landucci, E.; Gerace, E.; Zazzeri, M.; Musilli, C.; Pellegrini-Giampietro, D.; Matucci, R.; Zucchi, R.; Raimondi, L.. *Pharmacological effects of 3-iodothyronamine (TIAM) in mice include facilitation of memory acquisition and retention and reduction of pain threshold*. *Br. J. Pharmacol.*, **2013**, 168 (2), 354-362.

# INDICE

<b>1. INTRODUZIONE</b> .....	1
<b>1.1 STRUTTURA</b> .....	2
<b>1.2. ORIGINE E CATABOLISMO DELLA T<sub>1</sub>AM.</b> .....	3
1.2.1 Ormoni tiroidei.....	3
<i>1.2.1.1 La tiroide</i> .....	4
<i>1.2.1.2 Biosintesi e secrezione</i> .....	5
<i>1.2.1.3. Trasporto e metabolismo</i> .....	9
<i>1.2.1.4. Regolazione</i> .....	12
<i>1.2.1.5. Recettori nucleari</i> .....	13
1.2.2 Biosintesi delle tironamine.....	15
1.2.3 Metabolismo delle tironamine.....	16
<b>1.3 RECETTORI DELLE TIRONAMINE</b> .....	19
<b>1.4 TRASPORTO INTRACELLULARE</b> .....	23
<b>1.5 EFFETTI SISTEMICI E LOCALI DELLA TIRONAMINE</b> .....	28
1.5.1 Effetti sulla temperatura corporea.....	28
1.5.2 Effetti metabolici ed endocrini.....	29
1.5.3 Effetti cardiaci.....	31
<b>1.6 PROPRIETÀ FARMACOLOGICHE</b> .....	34
<b>1.7 CONCENTRAZIONI ENDOGENE</b> .....	34
<b>1.8 SCOPO DELLA TESI</b> .....	36
<b>2. MATERIALI E METODI</b> .....	37
<b>2.1 MATERIALI</b> .....	37
<b>2.2 STRUMENTAZIONE</b> .....	37
<b>2.3 RACCOLTA E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI</b> .....	38
<b>2.4 PREPARAZIONE DEGLI OMOGENATI TESSUTALI</b> .....	39



<b>2.5 CASISTICA CLINICA</b> .....	39
<b>2.6 TRATTAMENTO DEI CAMPIONI</b> .....	40
<b>2.7 METODO HPLC-MS-MS</b> .....	42
2.7.1 La spettrometria di massa.....	42
2.7.2 Meccanismo di Ionizzazione.....	45
2.7.3 La spettrometria di massa a triplo quadrupolo.....	47
2.7.4 Metodo di analisi.....	49
<b>2.8 ANALISI DEI CAMPIONI</b> .....	50
<b>2.9 ELABORAZIONE DATI</b> .....	51
<b>3. RISULTATI E DISCUSSIONE</b> .....	53
<b>3.1 OTTIMIZZAZIONE DELLA METODICA DI DOSAGGIO</b> .....	53
<b>3.2 APPLICAZIONE A TESSUTI DI RATTO</b> .....	59
<b>3.3 APPLICAZIONE A CAMPIONI DI SIERO UMANO</b> .....	66
<b>3.4 APPLICAZIONE A STUDI SULLA SINTESI ENDOCRINA DI T<sub>1</sub>AM</b> .....	70
<b>3.5 APPLICAZIONE A STUDI COMPORTAMENTALI</b> .....	74
<b>4. CONCLUSIONI</b> .....	83
<b>5. BIBLIOGRAFIA</b> .....	85

# 1. Introduzione

Le tironamine (TAMs) sono una nuova classe di composti endogeni. Questa classe di composti ha iniziato ad essere oggetto di studio negli anni '50. Era noto che la tiroxina (T4) fosse la principale forma circolante di ormone tiroideo, ma si ipotizzava che venisse convertita in un'altra sostanza prima di agire a livello dei tessuti periferici. Questa ipotesi nasceva da alcune evidenze sperimentali, quali ad esempio l'esistenza di un ritardo tra la somministrazione della T4 e una variazione rilevabile della velocità del metabolismo basale o una maggiore risposta alla 3,5,3'-triiodotironina [1]. Gli autori di tale studio si proponevano di sintetizzare e testare nuovi composti, analoghi della tiroxina, al fine di ottenere informazioni sulla natura della forma attiva dell'ormone e sui requisiti strutturali minimi necessari per l'attività, focalizzando l'attenzione sui composti triiodoati. Tra le classi di composti erano oggetto di studio le tironamine (diiodo-, triiodo- e tetraiodotironamina), che fornirono risultati particolarmente interessanti nei test riguardanti la metamorfosi dei girini: la triiodotironamina era in assoluto il composto più attivo. La ricerca era comunque focalizzata sull'individuazione dell'ormone tiroideo attivo e lo studio delle tironamine negli anni venne praticamente abbandonato.

Nel 2004 la ricerca venne ripresa da Thomas S. Scanlan e collaboratori che rilevarono la presenza della 3-iodotironamina (T<sub>1</sub>AM) nel cervello di ratto [2]. Si ipotizzò che la T<sub>1</sub>AM fosse un nuovo messaggero chimico, data l'interazione con specifici recettori e la produzione di significativi effetti funzionali. Questa affermazione è supportata da tre ordini di evidenze sperimentali:

- 1) la T<sub>1</sub>AM è un composto endogeno, in quanto rilevato negli organi e nel sangue di ratto [2-4];

- 2) a concentrazioni nanomolari la T<sub>1</sub>AM può attivare recettori specifici, detti TAARs (trace amine-associated receptors) e, verosimilmente, anche altri membri della stessa famiglia di recettori accoppiati a proteine G, che sono espressi in diversi tessuti [2, 3, 5];
- 3) la somministrazione di T<sub>1</sub>AM esogena è stata associata a significativi effetti biologici, quali ipotermia, ridotta contrattilità cardiaca e modulazione della secrezione di insulina e glucagone [2-7].

## 1.1 Struttura

La struttura chimica delle tironamime è mostrata in figura 1. Hanno struttura analoga a quella degli ormoni tiroidei (TH), dai quali differiscono per l'assenza del gruppo carbossilico sulla catena laterale della β-alanina. Le tironamine sono indicate in generale con T<sub>x</sub>AM, dove x rappresenta il numero di atomi di iodio.

Figura 1. Struttura delle tironamine (a) e degli ormoni tiroidei (b).

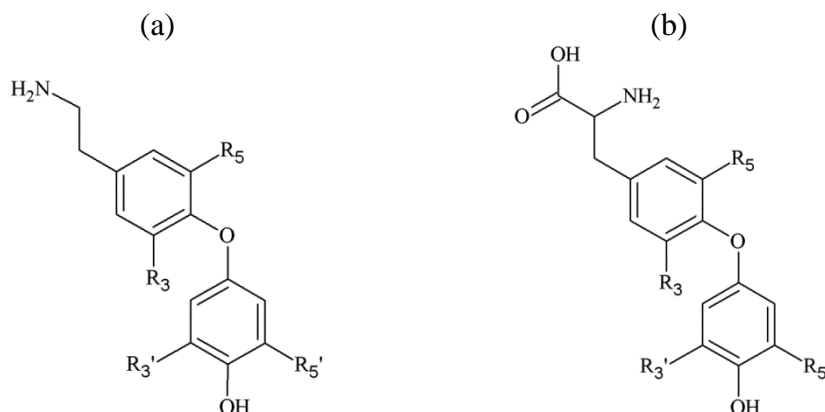


Tabella 1. Struttura e nomenclatura delle tironamine e degli ormoni tiroidei.

T <sub>x</sub> AM	R3	R5	R3'	R5'	TH
T <sub>4</sub> AM	I	I	I	I	T4
T <sub>3</sub> AM	I	I	I	H	T3
r-T <sub>3</sub> AM	I	H	I	I	r-T3
3,5-T <sub>2</sub> AM	I	I	H	H	3,5-T2
3',5'-T <sub>2</sub> AM	H	H	I	I	3',5'-T2
3,3'-T <sub>2</sub> AM	I	H	I	H	3,3'-T2
3-T <sub>1</sub> AM	I	H	H	H	3-T1
3'-T <sub>1</sub> AM	H	H	I	H	3'-T1
T <sub>0</sub> AM	H	H	H	H	T0

T<sub>x</sub>AM: generica tironamina, TH: ormone tiroideo, R: residuo variabile, I: iodio, H: idrogeno.

## 1.2 Origine e catabolismo della T<sub>1</sub>AM

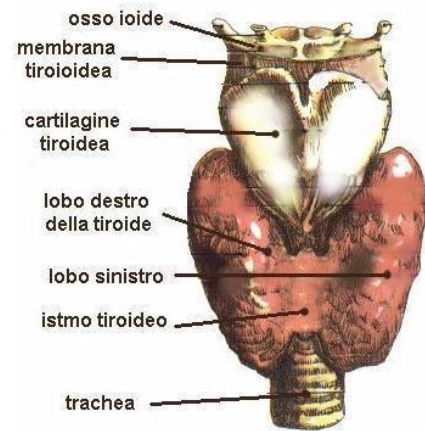
E' stato ipotizzato [2] che le tironamine siano derivati endogeni degli ormoni tiroidei, dai quali, come già detto, differiscono per l'assenza del gruppo carbossilico sulla catena laterale della β-alanina.

### 1.2.2 Ormoni tiroidei

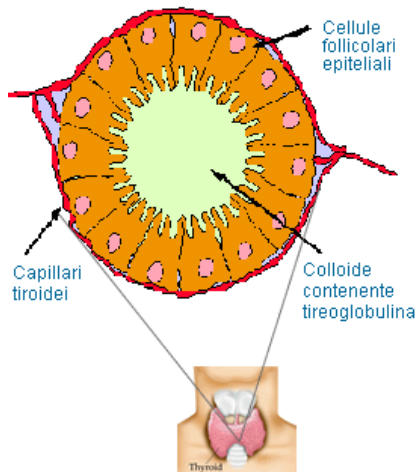
La tiroide produce e mette in circolo un importante gruppo di ormoni, appartenenti alla classe chimica dei composti aromatici iodati e noti collettivamente come iodotironine. Essi influenzano gran parte delle funzioni organiche, regolando lo sviluppo e il differenziamento di tutti i tessuti e l'intensità dei processi metabolici che vi si svolgono.

## La tiroide

La tiroide è una ghiandola endocrina composta da due lobi connessi da una sottile fascia di tessuto detta *istmo*, che le conferisce l'aspetto di una farfalla. Essa è situata nella parte anteriore del collo, davanti e lateralmente alla laringe ed ai primi anelli della trachea. In un adulto sano la ghiandola pesa mediamente 20 grammi, i lobi hanno una lunghezza di circa 5 cm ed uno spessore e

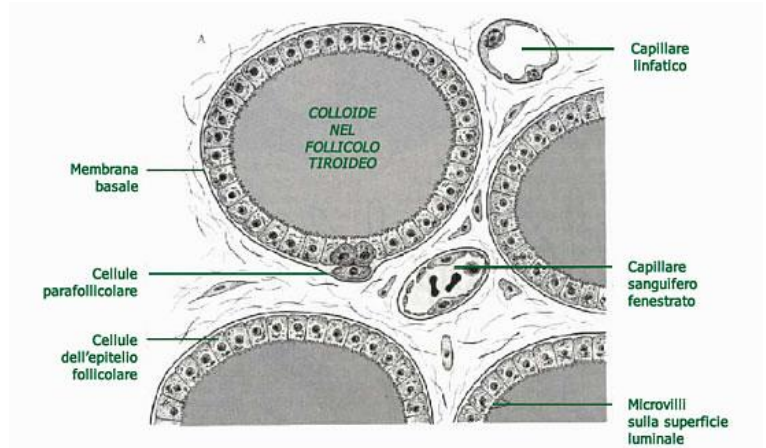


una larghezza che vanno dai 2 ai 2.5 cm, mentre l'istmo misura circa 2 cm. La tiroide è circondata da una capsula che, mediante la guaina peritiroidea, è fissata alla laringe, alla trachea, ed ai fasci nervosi/vascolari del collo. Tra la guaina peritiroidea e la capsula fibrosa propria della tiroide esiste uno spazio, generato da una introflessione della guaina stessa, in cui decorrono i vasi. Il sistema arterioso è costituito dalle arterie tiroidee superiori ed inferiori, rami della carotide esterna e della succlavia, ed è tributario delle vene giugulari interne e succlavia. Questo sistema garantisce un'elevata vascolarizzazione della ghiandola, comportando un flusso ematico pari a 5 ml/min per grammo. L'innervazione è regolata dal sistema nervoso autonomo: all'interno del fascio nervo-vascolare del collo infatti, oltre ai vasi sopracitati, si riscontra anche la presenza del nervo vago. I vasi linfatici della ghiandola confluiscono nei vasi linfatici del collo e del mediastino e una quota di ormoni tiroidei viene rilasciata anche in tali vasi (oltre che in quelli venosi). La tiroide inoltre è situata in posizione prossimale ai nervi ricorrenti (o laringei inferiori) che innervano la maggior parte dei muscoli della laringe. Anteriormente e lateralmente la tiroide è ricoperta dai muscoli sottoioidei e dai muscoli sternocleidomastoidei.



Le unità secretorie della tiroide sono i *follicoli*, che consistono in uno strato esterno di cellule epiteliali, dette cellule follicolari o tireociti. Queste cellule poggiano su una membrana basale e racchiudono un materiale amorfo detto *colloide*. La colloide è composta principalmente da *tireoglobulina*, una glicoproteina iodata che costituisce il substrato per la sintesi degli ormoni tiroidei, e da una piccola quantità di tirealbumina iodata.

La tiroide contiene anche un altro tipo di cellule, negli interstizi tra i follicoli o adiacenti esternamente alla parete follicolare, note cellule come parafollicolari o cellule C. Queste cellule producono la calcitonina, un ormone polipeptidico costituito da 32 aminoacidi. Esso è in grado di ridurre le concentrazioni



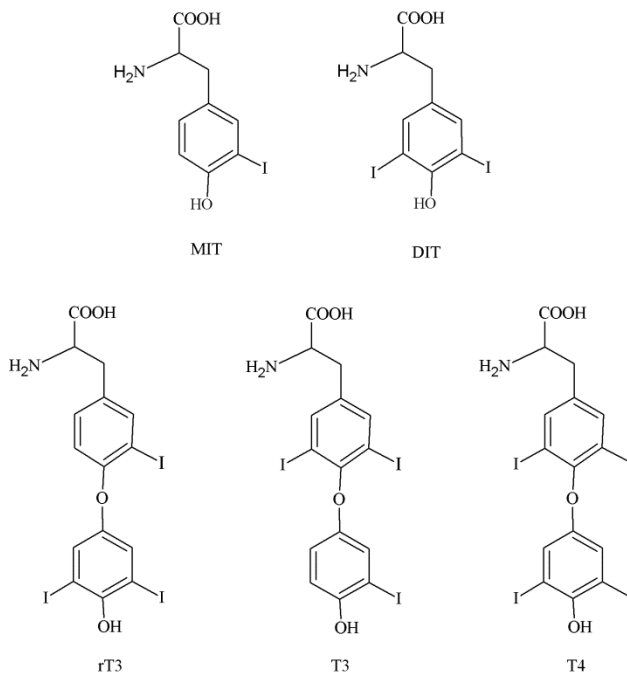
plasmatiche di calcio agendo principalmente sull'osso (bloccandone il riassorbimento da parte degli osteoclasti e accelerando l'attività osteoblastica di deposizione della matrice) e a livello renale (stimolando il riassorbimento di calcio da parte del tubulo contorto prossimale).

### *Biosintesi e secrezione degli ormoni tiroidei*

La tiroide secreta due ormoni, la tiroxina (3,5,3',5'-L-tetraiodotironina) e la triiodotironina (3,5,3'-L-triiodotironina), comunemente noti come T4 e T3 rispettivamente. Inoltre la tiroide secreta piccole quantità di 3,3',5'-L-triiodotironina (reverse T3 – rT3), la cui

funzione biologica non è ancora nota, e piccolissime quantità dei loro precursori, moniodotirosina (MIT) e diiodotirosina (DIT).

Figura 2. Struttura degli ormoni tiroidei e dei loro precursori.

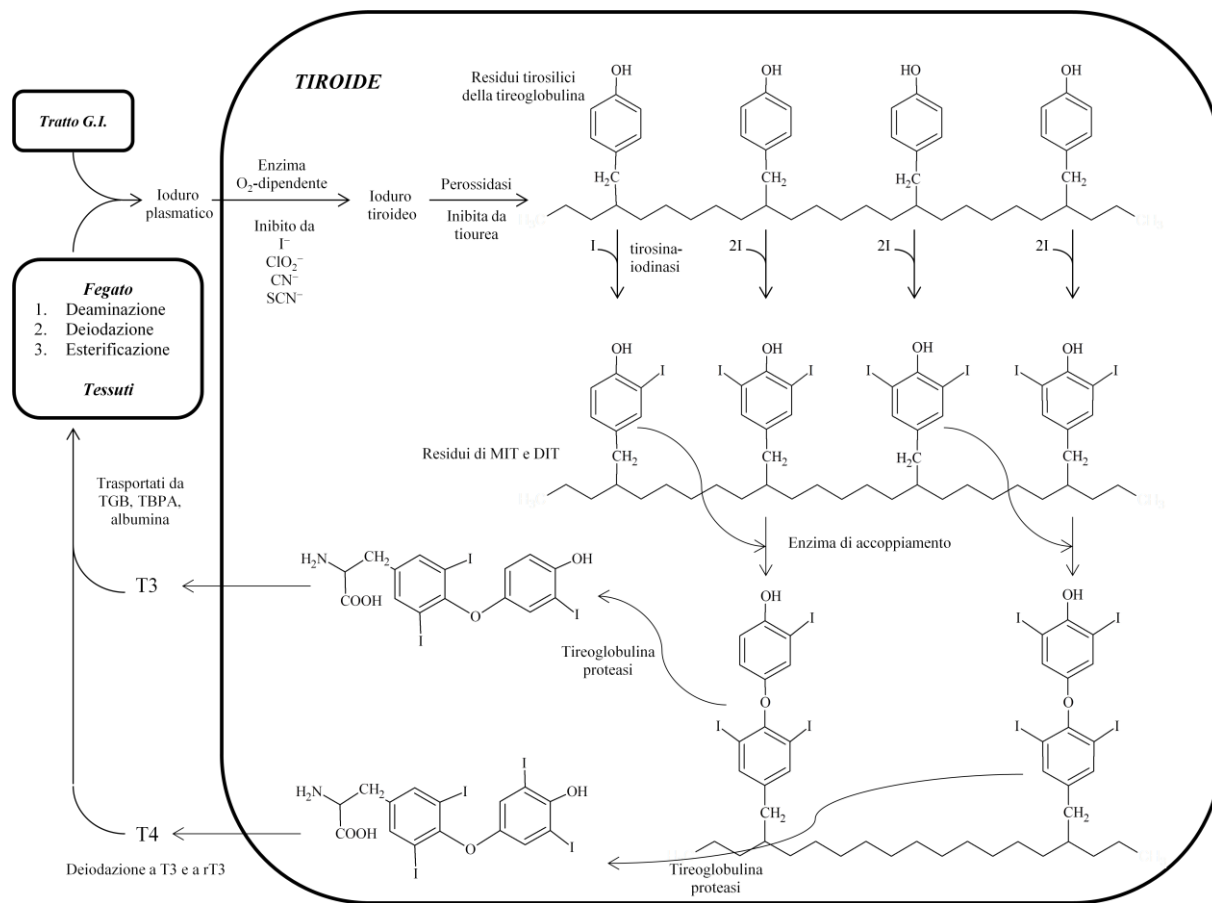


Abbreviazioni: MIT, moniodotirosina; DIT, diiodotirosina; rT3, 3,3',5'-L-triiodotironina; T3, 3,5,3'-L-triiodotironina, T4, 3,5,3',5'-L-tetraiodotironina.

Approssimativamente il 40% della T4 secreta è deiodata dal fegato e da altri tessuti periferici per dare T3, mentre il 45% è trasformato in rT3. Quindi, con una normale produzione di T4 di circa 100 nmol (80 µg) al giorno, vengono prodotti dalla deiodazione periferica approssimativamente 40 nmol (26 µg) di T3 e 45 nmol (29 µg) di rT3. La produzione giornaliera stimata sia di T3 che di rT3 è pari a 30 µg, per cui è evidente che l'85% della T3 e la totalità della rT3 deriva dalla deiodazione periferica della T4 piuttosto che dalla secrezione diretta da parte della tiroide.

La biosintesi degli ormoni tiroidei coinvolge l'accumulo dello iodio serico, l'incorporazione dello iodio nella tirosina, la coniugazione dei residui tirosilici iodati della tireoglobulina e la scissione proteolitica della tireoglobulina follicolare per rilasciare le iodotironine.

Figura 3. Schema di biosintesi degli ormoni tiroidei [8].



Un elemento importante nella sintesi degli ormoni tiroidei è lo iodio, che è normalmente reso disponibile dall'alimentazione sotto forma di ioduro. Il trasporto dello iodio all'interno dei follicoli è la prima fase del processo di sintesi e ne è anche il fattore limitante. In condizioni fisiologiche, la ghiandola tiroidea è in grado di concentrare nelle cellule follicolari lo iodio da 20 a 40 volte rispetto alla concentrazione nel plasma. Il trasporto dello iodio nella tiroide è un processo attivo che si verifica contro il gradiente elettrochimico dello iodio e che viene stimolato dal TSH (ormone tireotropico o tireotropina). Esso avviene grazie ad un meccanismo di trasporto che è mediato dalla proteina intramembrana  $Na^+/I^-$  symporter (NIS) in modo tale che l'ingresso di  $Na^+$  nella cellula sia accoppiato all'ingresso di  $I^-$ . Lo ioduro è ossidato all'interno della tiroide in una forma più reattiva di iodio, forse in radicale libero  $I^+$ , che successivamente si lega ai residui di tirosina della tireoglobulina (Tg). La



tireoglobulina è una glicoproteina sintetizzata all'interno delle cellule follicolari e poi secreta nel lume follicolare per esocitosi. L'enzima responsabile dell'ossidazione e del legame dello iodio (organizzazione) è la tiroperossidasi (TPO). La monoiodotirosina e la diiodotirosina così formate reagiscono fra loro mediante una condensazione ossidativa con rilascio di un residuo di alanina. L'accoppiamento di due DIT dà luogo alla formazione di T<sub>4</sub>, mentre la T<sub>3</sub> si forma dalla reazione fra una MIT e una DIT. La reazione di condensazione è aerobica, necessita energia ed è catalizzata anch'essa dalla TPO.

La sintesi di T<sub>3</sub>, T<sub>4</sub>, DIT e MIT sulle molecole di tireoglobulina avviene principalmente all'interfase tra cellule follicolari e colloide, ma anche all'interno della colloide stessa, dove la tireoglobulina è accumulata in concentrazioni molto elevate. Le cellule follicolari fagocitano i globuli di colloide per endocitosi; questi globuli si fondono con i lisosomi presenti nelle cellule, le proteasi lisosomiali rompono i legami peptidici della Tg e T<sub>4</sub>, T<sub>3</sub>, DIT, e MIT vengono rilasciati nel citoplasma delle cellule follicolari. Dopo la loro liberazione dalla Tg, T<sub>4</sub> e T<sub>3</sub> raggiungono la circolazione sistemica, mentre DIT e MIT vengono deiodati da un enzima microsomiale, la dealogenasi iodotirosinica. Lo ioduro libero è poi impiegato nuovamente nella sintesi degli ormoni tiroidei. Ogni passaggio della sintesi degli ormoni tiroidei è regolato dall'ormone pituitario tireotropo (TSH). Questo ormone stimola la "pompa dello ioduro", la sintesi della tireoglobulina e, legandosi ai recettori di membrana e inducendo la produzione di cAMP (che innesca la fosforilazione di una serie di proteine follicolari), catalizza il riassorbimento delle molecole di Tg iodata da parte delle cellule follicolari. Anche la velocità della proteolisi della Tg è regolata dal TSH. Inoltre il TSH induce un aumento delle dimensioni e del numero delle cellule follicolari tiroidee. Una stimolazione prolungata da parte del TSH comporta un aumento della vascolarizzazione ed un eventuale ipertrofia della ghiandola tiroidea (gozzo).

Il TSH non è l'unico agente in grado di stimolare il rilascio di T3 e T4: è stato dimostrato che anche il VIP (peptide vaso intestinale) e alcuni agonisti dei recettori  $\beta$ -adrenergici provocano lo stesso effetto attivando l'adenilato-ciclasi, con produzione di cAMP, che innesca la fosforilazione delle proteine follicolari.

### *Trasporto e metabolismo*

Il passaggio degli ormoni attraverso la membrana può avvenire, vista la loro natura lipofila, in modo spontaneo, ma è ormai dimostrato che è facilitato da trasportatori specifici [9].

Solo lo 0,004% di T4 e lo 0,4% di T3 sono liberi e sono proprio tali frazioni non legate a dar vita alle risposte biologiche. Nel circolo ematico T3 e T4 sono quasi completamente legati in maniera reversibile a una delle seguenti proteine plasmatiche di trasporto [9]:

- TBG (thyroxine-binding globulin): lega una molecola di T4 o di T3 (lega il 70% del T4 circolante e l'80% del T3 circolante). E' una glicoproteina sintetizzata nel fegato costituita da una singola catena polipeptidica con un unico sito di legame per gli ormoni tiroidei. La concentrazione di TBG aumenta in gravidanza: in particolare nella prima settimana essa raddoppia e, in risposta a tale fenomeno, la ghiandola tiroidea secreta un maggior quantitativo di T4, così da mantenere invariata la concentrazione di T4 libero.
- TTR (transthyretin) o TBPA (thyroxine-binding prealbumin): lega l'11% della T4 circolante ed il 9% della T3 circolante. E' caratterizzata da 4 subunità polipeptidiche identiche tra loro, costituite ognuna da 127 amminoacidi, per una massa complessiva di 55 kDa. Le 4 subunità formano un canale centrale che si sviluppa longitudinalmente e contiene due siti di legame per l'ormone, ma

fisiologicamente ne viene utilizzato soltanto uno , dato che il legame dell'ormone ad un sito determina una riduzione dell'affinità dell'altro sito.

- Albumina: lega il 20% della T4 circolante e l'11% della T3 circolante attraverso un legame aspecifico. La concentrazione di albumina nel sangue varia da 3.5 a 5.0 g/dl; ha un peso di 69 kDa e costituisce circa il 60% di tutte le proteine plasmatiche.

Gli ormoni tiroidei in circolo sono costituiti per la maggior parte da T4 e ciò è dovuto ad una velocità di produzione e secrezione di tale ormone che è circa 10 volte maggiore di quella della T3: in totale il quantitativo di T4 rilasciato è di 80-90 µg/dl contro gli 8 µg/dl di T3. La maggior parte della T4 circolante (circa 80%) viene convertita dal fegato, dai reni e dagli organi bersaglio nella più attiva T3 o in rT3 tramite un processo di deiodazione in posizione 5' o 5 rispettivamente.

Gli enzimi che attivano o inattivano la T4 appartengono alla classe delle deiodinasi, o desiodasi. Le deiodinasi sono costituite da 250-280 amminoacidi e contengono un residuo di selenocisteina nel sito attivo.

Ne sono noti tre tipi:

- D1. E' localizzata principalmente nel fegato, nel rene e nella tiroide; è in grado di rimuovere un atomo di iodio sia dall'anello fenolico che dall'anello tirosilico, ma presenta un'attività prevalente per la deiodinazione in posizione 5'. Essa catalizza la reazione di conversione della T4 in T3, della rT3 in 3,3'-T2 e la deiodazione dell'anello interno dei composti solfo-coniugati degli ormoni tiroidei.
- D2. E' espressa soprattutto nel muscolo scheletrico e cardiaco, nel sistema nervoso centrale, nella cute, nell'ipofisi e nella tiroide; anche la deiodinasi D2 presenta un'attività prevalente per la deiodazione in

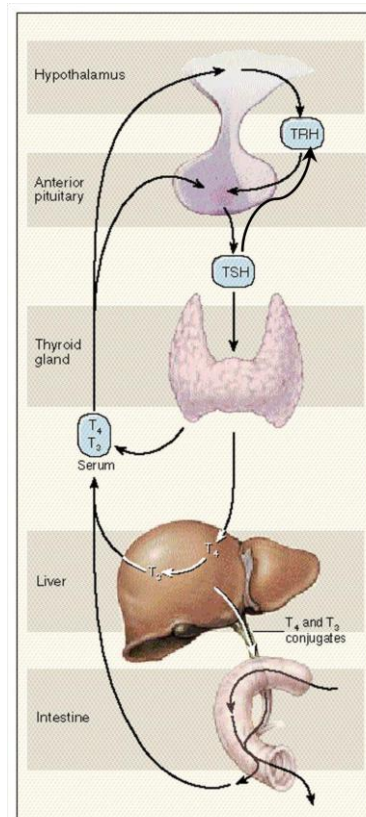
posizione 5' ed ha una maggiore affinità per la T4 rispetto alla rT3 o T3.

D3. E' espressa soprattutto in placenta, sistema nervoso centrale e fegato fetale; come la D2 ha una affinità elevata per la T4, ma è in grado di rimuovere atomi di iodio solo dall'anello tirosilico.

La formazione di T3 presuppone la rimozione di uno ioduro dall'anello fenolico, e richiede quindi l'azione di D1 o D2. Dato che la T3 si lega ai recettori degli ormoni tiroidei con affinità molto maggiore della T4 [10], la T3 è considerata l'ormone tiroideo biologicamente attivo, mentre la T4 è considerato un pro-ormone [11]. La rimozione di ioduro dall'anello tirosilico produce invece 3,3',5'-triiodotironina (rT3), che è considerata un metabolita inattivo della T4 [11]. Deiodinazioni successive producono poi ulteriori derivati (T2, T1, T0), che risultano inattivi. Le deiodinazioni della T3 possono essere interpretate quindi come reazioni di degradazione dell'ormone tiroideo attivo, piuttosto che reazioni di biosintesi di altri ormoni tiroidei. Ulteriori vie di inattivazione degli ormoni tiroidei comportano reazioni di decarbossilazione, deaminazione, transaminazione o coniugazione a solfato e glucuronato.

## Regolazione

La biosintesi degli ormoni tiroidei è finemente regolata dall'azione di altri due ormoni, il TRH (*TSH Releasing Hormone*) e il TSH (*Thyroid Stimulating Hormone, tireotropina*). Il TRH, composto da tre aminoacidi (piro-Glu-His-Pro-NH<sub>2</sub>), è il più piccolo ormone noto. È sintetizzato a livello del nucleo ipotalamico paraventricolare ed è trasportato mediante il circolo portale ipofisario all'adenipofisi, dove, legandosi ad un recettore di membrana accoppiato a proteine Gs, attiva la secrezione e la sintesi *de-novo* del TSH. L'ormone TSH è una glicoproteina eterodimerica prodotta dalle cellule tireotrope dell'adenipofisi, caratterizzata da due subunità,  $\alpha$  e  $\beta$ . Il TSH stimola la produzione e il rilascio degli



ormoni tiroidei interagendo con un recettore di membrana accoppiato a proteine G. Gli ormoni tiroidei immessi così in circolo agiscono con un feedback negativo sull'ipotalamo e sul lobo anteriore dell'ipofisi per limitare la secrezione di TRH e di TSH (la T<sub>4</sub> è molto più efficace della T<sub>3</sub> in termini di capacità inibitoria) e il TSH inibisce la biosintesi e secrezione del TRH, regolando così l'attività del cosiddetto asse ipotalamo – ipofisi – tiroide.

La produzione di ormoni tiroidei non è governata soltanto da un controllo di tipo ormonale. La quantità di iodio introdotta con la dieta è un parametro che può inibire o accelerare la produzione di T<sub>3</sub> e T<sub>4</sub>: in particolare essa agisce in fase di formazione di MIT e DIT. È stato dimostrato che in assenza di un giusto apporto di iodio, il rapporto MIT:DIT aumenta. In eccesso di iodio (e quindi di ioduro) si manifesta il cosiddetto effetto Wolf-Chaikoff, consistente nella inibizione della iodinazione della Tg: tale effetto ha nella maggior

parte dei casi una durata transitoria, in quanto è seguito dalla ripresa della sintesi di ormoni tiroidei, fenomeno denominato *escape*. Inizialmente si credeva che il fenomeno di *escape* fosse causato dalla diminuzione dell'attività del cotrasportatore di iodio NIS nella membrana basolaterale della cellula follicolare della tiroide, e dalla conseguente diminuzione della concentrazione di iodio inorganico intracellulare. Oggi si sa che alti livelli di ioduro intracellulare riducono la trascrizione degli enzimi che favoriscono il legame dello ioduro con la tireoglobulina (TPO e NADPH ossidasi).

### *Recettori nucleari*

I recettori della tiroide appartengono alla famiglia dei recettori nucleari. Esistono due tipi di recettori nucleari degli ormoni tiroidei: i TR $\alpha$  (o NR1A1) e i TR $\beta$  (o NR1A2).

I TRs, così come altri recettori nucleari, hanno una struttura modulare costituita da:

- 1) una regione N-terminale,
- 2) un dominio di legame al DNA altamente conservato costituito da due zinc-fingers,
- 3) una regione deputata al legame con i coeppressori,
- 4) un dominio responsabile del legame con il ligando, indispensabile per la costituzione di dimeri.

Ad oggi sono note 5 isoforme di tali recettori di cui due, TR $\alpha$ -2 e TR $\alpha$ -3, con scarsa affinità per l'ormone T3. Le diverse isoforme sono prodotte per splicing alternativo o per variazioni nel quadro di lettura dei geni. In linea di massima i TRs sono presenti in tutti i tessuti, anche se l'isoforma TR $\alpha$  predomina nel cuore (50%-70% dei TRs) mentre la TR $\beta$  predomina nel fegato (80% dei TRs). Entrando ancor più in dettaglio TR $\beta$ -1 è presente nella maggior parte dei tessuti, TR $\beta$ -2 solo in regioni limitate del cervello e nell'ipofisi e TR $\alpha$ -1 e TR $\alpha$ -2 quasi esclusivamente nel muscolo scheletrico e cardiaco, nel cervello e nel tessuto

adiposo bruno [9]. Di conseguenza i TR $\alpha$  regolano la frequenza cardiaca, mentre i TR $\beta$  sono responsabili della riduzione della colesterolemia e dell'inibizione della sintesi del TSH. Entrambi i recettori hanno come caratteristica essenziale quella di agire come attivatori della trascrizione legandosi al DNA in corrispondenza di particolari sequenze, dette TRE (Thyroid Response Elements) [12]. Le risposte agli ormoni tiroidei sono quindi mediate dalla sintesi di specifiche proteine, e si realizzano su una scala temporale relativamente lenta (ore o giorni). In presenza di ligando, il recettore agisce come un oloreccettore e attiva la trascrizione di geni con un TRE positivo mentre i geni con un TRE negativo vengono repressi. In assenza di ligando, il recettore agisce come un aporeccettore e reprime la trascrizione di geni contenenti un TRE positivo mentre l'opposto si verifica in geni con un TRE negativo.

In seguito al legame con il ligando, il recettore va incontro ad una modificazione conformazionale che consente l'interazione con complessi multipli di coattivatori. Alcune proteine sono importanti per il rimodellamento della cromatina, mentre altre possono interagire direttamente con la macchina trascrizionale. Inoltre, i TR possono anche modulare l'espressione genica indipendentemente dal legame al DNA. Pertanto, essi sono in grado di alterare l'espressione di geni che non contengono le sequenze TRE attraverso l'interazione con fattori di trascrizione coinvolti in altre vie di segnale, e questo fenomeno è definito *cross-talk trascrizionale*. Ad esempio, i TR possono regolare negativamente i promotori dei geni contenenti siti per l'AP-1 (Activator Protein-1) o CRE (cAMP Response Element).

Infine, i TR possono mediare rapide risposte non genomiche che non vengono bloccate da inibitori della trascrizione o della traduzione e che vengono presumibilmente mediate da recettori associati alla membrana, che si accoppiano alla via delle MAP chinasi o delle PI3 chinasi [13, 14].

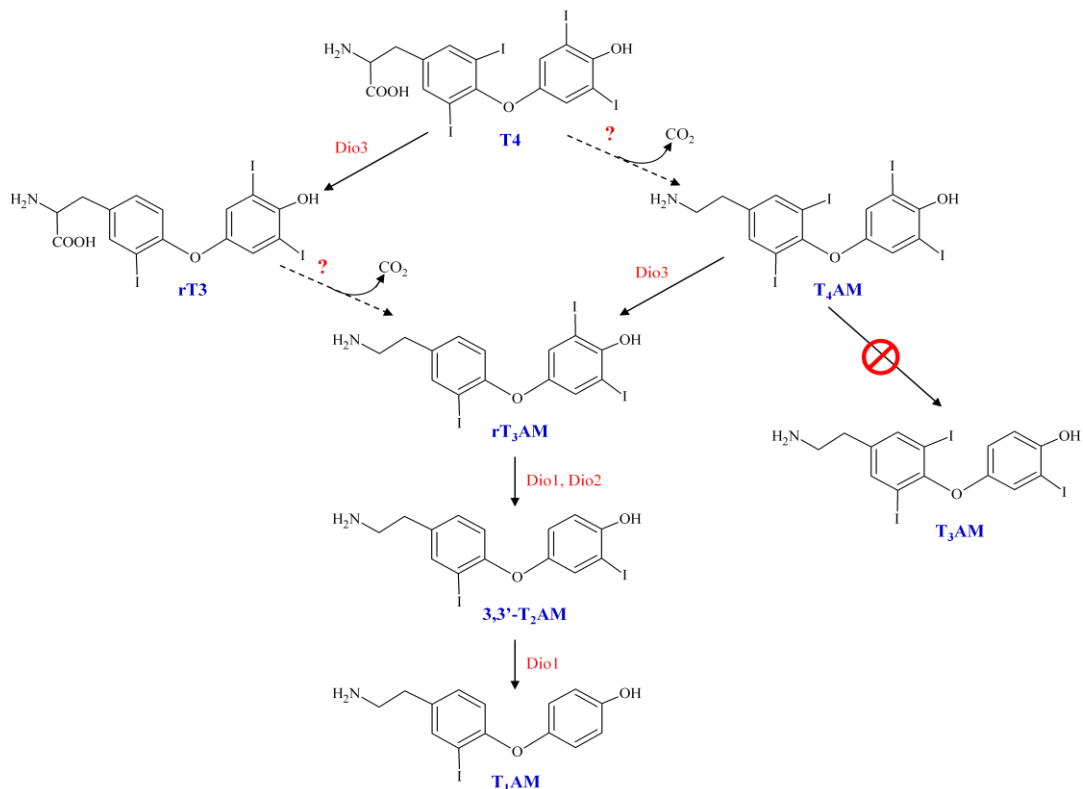
### 1.2.3 Biosintesi delle tironamine

Si ritiene comunemente che la decarbossilazione degli ormoni tiroidei avvenga dopo la rimozione del gruppo amminico, rimosso da una aminotransferasi o da un'aminossidasi, producendo quindi derivati dell'acido tiropiruvico o dell'acido tiroacetico [15]. Ciononostante non è possibile escludere che la decarbossilazione avvenga prima della deaminazione, producendo così tironamine. Si reputa usualmente che la decarbossilazione sia catalizzata dall'enzima *amino acido aromatico decarbossilasi* (AADC), vista la specificità di tale enzima verso due substrati con struttura simile all'ormone tiroideo, la L-3,4 diidrossifenilalanina (L-dopa) e il 5-idrossitriptofano [15, 16]. Recenti risultati sperimentali mettono però in discussione il ruolo dell'AADC [17].

Per completare la biosintesi delle tironamine è necessaria la rimozione di uno o più atomi di iodio. Come già detto nei paragrafi precedenti, l'eliminazione riduttiva dello iodio negli ormoni tiroidei è catalizzata da enzimi detti deiodinasi. È stato dimostrato che anche le tironamine costituiscono substrati per questi enzimi [18]. Le tironamine hanno valori di  $V_{\max}/K_M$  paragonabili a quelli delle corrispondenti tironine. È interessante osservare che la selettività delle deiodinasi per le iodotironamine è differente da quelle per le iodotironine. Infatti, mentre la tiroxina è trasformata in T3 mediante le deiodinasi di tipo 1 e 2 [19] e in rT3 mediante la deiodinasi di tipo 3 [20], la T<sub>4</sub>AM non è substrato per la D1 e la D2 e di conseguenza non può essere deiodinata a T<sub>3</sub>AM, ma è un buon substrato per la D3 e quindi può essere trasformata in rT<sub>3</sub>AM. Le deiodinasi D1 e D2 possono agire sulla rT<sub>3</sub>AM fino a dare la T<sub>1</sub>AM, delineando una possibile via di biosintesi per la 3-iodotironamina endogena, come mostrato in figura 4.



Figura 4. Ipotetica via di biosintesi della T<sub>1</sub>AM.



Abbreviazioni: Dio1: deiodinasi di tipo 1, Dio2: deiodinasi di tipo 2, Dio3: deiodinasi di tipo 3, ?: enzimi non noti, T4: tiroxina, T3: 3,5,3'-L-triiodotironina, rT3: 3,3',5'-L-triiodotironina, T<sub>4</sub>AM: 3,5,3',5'-tetraiodotironamina, T<sub>3</sub>AM: 3,5,3'-triiodotironamina, rT<sub>3</sub>AM: 3,3',5'-triiodotironamina, 3,3'-T<sub>2</sub>AM: 3,3'-diiodotironamina, T<sub>1</sub>AM: 3-iodotironamina.

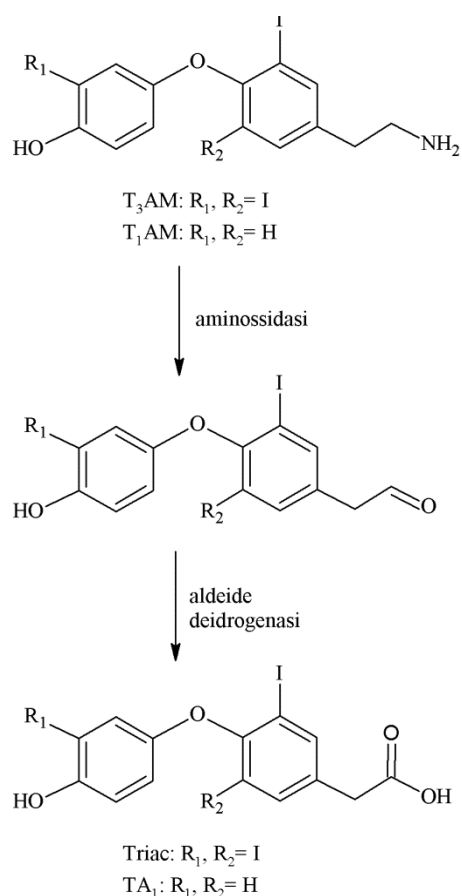
Benché il percorso sintetico appena illustrato sia molto interessante e supportato da alcuni esperimenti effettuati *in vitro*, non esistono prove dirette *in vivo* che la T<sub>1</sub>AM sia un metabolita della T4. D'altra parte al momento non sono emerse valide vie alternative per la sintesi delle tironamine.

#### 1.2.4 Metabolismo delle tironamine

Il metabolismo delle tironamine può avvenire attraverso diversi processi:

- mediante trasformazione della catena laterale etilaminica;
- mediante deiodinazione;
- mediante funzionalizzazione della molecola.

Figura 5. Trasformazione delle tironamine in acido tiroacetico.



Per analogia con gli ormoni tiroidei, si assume che il gruppo amminico possa essere ossidato da aminossidasi. In particolare è stato suggerito che la  $T_1AM$  venga metabolizzata da monoaminossidasi (MAO) o da una particolare aminossidasi semicarbazide-sensibile, la benzilaminossidasi (Bz-SSAO; EC 1.4.3.6) con formazione di aldeide, che può essere ulteriormente ossidata ad acido carbossilico da un altro enzima, la aldeide deidrogenasi (ALDH) (figura 5). MAO e SSAO sono enzimi con attività promiscua, che prediligono come substrati le amine primarie e sono noti per la capacità di catalizzare l'ossidazione di feniletilammine [21, 22]. ALDH è un enzima NAD-dipendente, che è

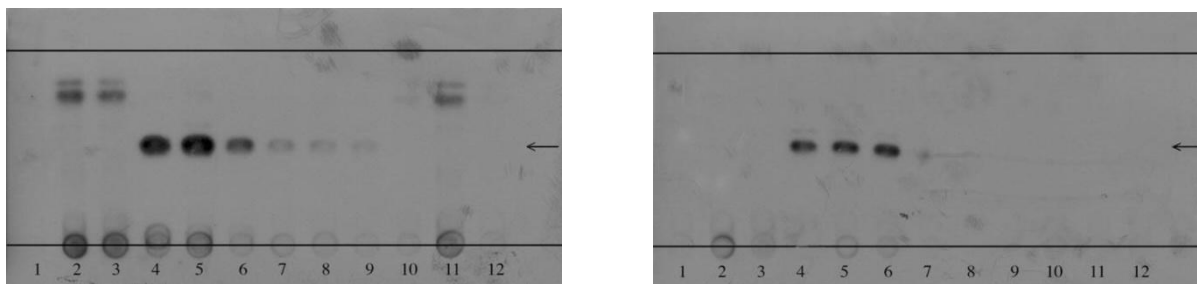
universalmente distribuito nei tessuti dei mammiferi e può ossidare un'ampia gamma di aldeidi, come ad esempio le aldeidi derivanti dalla 5-idrossitriptamina e dalla dopamina [23]. L'effetto di questi enzimi è quindi la trasformazione di tironamine in acidi tiroacetici.

A partire da queste ipotesi sono stati condotti esperimenti su cellule HepG2 (ottenute da un carcinoma epatocellulare umano), contenenti una grande quantità di enzimi MAO e ALDH, e su omogenati di tiroide di origine umana, per verificare se la tiroide fosse in grado di convertire la  $T_1AM$  in  $TA_1$  [24]. Le cellule e gli omogenati sono stati preincubati in presenza o in assenza di iproniazide 200  $\mu M$  (inibitore aspecifico delle aminossidasi) per 30 minuti e successivamente incubate per 3 ore con 3-iodiotironamina marcata [ $3-^{125}I$ ]- $T_1AM$ . La soluzione così ottenuta è stata poi acidificata, estratta, concentrata e sottoposta a cromatografia su strato sottile (TLC, *Thin Layer Chromatography*). Lo stesso esperimento

nelle due diverse modalità (in assenza o in presenza di iproniazide) è stato condotto anche in assenza di cellule (bianco) e tutti i risultati sono stati valutati tramite autoradiografia.

In figura 6 è mostrato l'autoradiogramma di uno degli esperimenti svolti con  $[3\text{-}^{125}\text{I}]\text{-T}_1\text{AM}$  su colture di cellule HepG2. Si può notare come la macchia radioattiva con il fattore di ritenzione associabile al  $\text{TA}_1$  (indicata da una freccia) sia osservabile solo in presenza di cellule HepG2 (linee 4-6) e non nel bianco (linee 1-3). Inoltre è evidente che la conversione è significativamente inibita in presenza di iproniazide (linee 7-9).

Figura 6: Autoradiogramma per la conversione di  $\text{T}_1\text{AM}$  in  $\text{TA}_1$  con colture cellulari HepG2 (a sinistra) e con omogenati di tiroide umana (a destra) [24].



Linee 1-3: pozzetti privi di cellule contenente mezzo di coltura incubato con DMSO

Linee 4-6: pozzetti contenenti cellule HepG2 (a sinistra), omogenato di tiroide umana (a destra) preincubate con DMSO

Linee 7-9: pozzetti contenenti cellule HepG2 (a sinistra), omogenato di tiroide umana (a destra) preincubate con iproniazide

Linee 10-12: pozzetti privi di cellule (a sinistra), di omogenato (a destra) contenente mezzo di coltura preincubato con iproniazide

Analogamente nella figura a destra è mostrato quanto accade nel caso dell'omogenato di tiroide.

Anche in questo caso la macchia radioattiva tipica della  $\text{TA}_1$  è stata riscontrata solo in presenza degli omogenati di tiroide (linee 4-6) e non nel relativo bianco. Ancora una volta la conversione in  $\text{TA}_1$  è fortemente inibita da iproniazide (linee 7-9).

Sono stati condotti anche esperimenti volti a verificare se la produzione di  $\text{TA}_1$  a partire da  $\text{T}_1\text{AM}$  avvenisse in vivo, utilizzando siero e tessuti umani e di roditori. Tramite analisi LC-MS-MS sono stati confrontati i picchi di abbondanza relativa di  $\text{TA}_1$  e di  $\text{d}_4\text{-TA}_1$  ( $\text{TA}_1$  marcato con quattro atomi di deuterio usato come standard interno), determinando

concentrazioni di TA<sub>1</sub> dell'ordine del nanomolare per il siero umano (<0.1 nM) e dell'ordine del micromolare nel il siero di ratto (range 3-12 µM) prelevato dopo 60, 90, 120 minuti dalla somministrazione intraperitoneale di una soluzione 20 mg/kg di T<sub>1</sub>AM. Tali esperimenti hanno dimostrato come il TA<sub>1</sub> sia un catabolita della T<sub>1</sub>AM.

Le tironamine possono essere inoltre catabolizzate mediante deiodinazione catalizzata dalle deiodinasi, come già discusso in precedenza [18].

È stato ipotizzato che il metabolismo delle tironamine possa avvenire anche mediante funzionalizzazione della molecola. Le reazioni di coniugazione accoppiano la specie di interesse con piccole biomolecole ionizzabili o altamente idrofile, come l'acido glucuronico o l'acido solforico, allo scopo di inattivarla o renderla nettamente idrofila per una migliore eliminazione renale; oppure con bioreagenti apolari, come nel caso delle metilazioni e acilazioni, per inattivare e/o aumentarne il peso molecolare e facilitare l'eliminazione biliare. Nel caso della T<sub>1</sub>AM è stato dimostrato che questa molecola è un substrato della sulfotrasferasi epatica SULT1A3 [25].

### **1.3 Recettori delle tironamine**

I recettori delle tironamine non sono ancora stati identificati in modo inequivocabile. Una serie di esperimenti condotti negli ultimi anni ha portato ad escludere alcuni tipi di recettore e a focalizzare l'attenzione su altri, che potrebbero mediarne il segnale.

Data la similarità strutturale delle tironamine con gli ormoni tiroidei e le ammine biogene si poteva ipotizzare che interagissero con i recettori nucleari degli ormoni tiroidei e con quelli delle ammine biogene. Il legame delle tironamine con i recettori degli ormoni tiroidei è stato escluso con esperimenti specifici [2]. L'ipotesi che le tironamine si possano legare a recettori di membrana accoppiati a proteine G è stata proposta per la prima volta da

Meyer e Hesch [26], che hanno determinato l'influenza di alcune iodotironamine sul legame del [<sup>3</sup>H]-diidroalprenololo, uno specifico ligando dei recettori β-adrenergici, negli eritrociti di tacchino. La T<sub>3</sub>AM spiazza il diidroalprenololo con K<sub>i</sub> nell'ordine di 5 μM, mentre 3,5-T<sub>2</sub>AM e T<sub>0</sub>AM mostrano una bassa affinità. T<sub>3</sub>AM, 3,5-T<sub>2</sub>AM e T<sub>0</sub>AM si legano ai recettori β-adrenergici, ma non attivano la via di trasduzione del segnale basata su cAMP; prevengono invece la produzione di cAMP indotta dal [<sup>3</sup>H]-diidroalprenololo. Peraltro gli effetti funzionali di queste interazioni sono dubbi, in quanto in cellule HEK293, che esprimono stabilmente o i recettori dopaminici D1 o i recettori β2-adrenergici, non è stato prodotto alcun cambiamento nella concentrazione di cAMP da T<sub>0</sub>AM o T<sub>1</sub>AM usate a concentrazioni superiori a 10 μM [2].

Una scoperta cruciale è stata osservare che la T<sub>1</sub>AM è in grado di interagire con affinità nanomolare con il recettore noto come TAAR1 (*trace amine-associated receptor-1*). Tale recettore fu identificato attraverso tecniche di biologia molecolare che si avvalevano di oligonucleotidi, le cui sequenze caratteristiche furono scelte basandosi sulla struttura dei recettori specifici per serotonina e dopamina [27, 28].

Il TAAR1, espresso in cellule eterologhe, induce la produzione di cAMP dopo esposizione prolungata a p-tiramina e β-fenilettilamina e non invece alle classiche ammine biogeniche. Dato che p-tiramina e β-fenilettilamina sono presenti in bassissime concentrazioni nelle cellule dei vertebrati ed appartengono ad una classe di composti denominate oligoammine ("*trace amines*") il nuovo recettore fu originariamente denominato "*trace amine receptor*". Esperimenti successivi dimostrarono come il genoma di ratto, topo, scimpanzé ed uomo include diversi geni apparentati al TAAR1 che codificano per proteine caratterizzate da una sequenza polipeptidica unica (NSXXNPXX[YH]XXX[YF]XWF). Poiché una chiara risposta ad oligoamine è stata dimostrata solo per due recettori, il nome è stato modificato in "*trace amine-associated receptors*". Nel genoma sia umano che dello

scimpanzé sono presenti 9 sottotipi di TAARs (TAAR1-TAAR9) [29], che sono espressi sia nel sistema nervoso centrale che in organi periferici [5, 29, 30], anche se alcuni di questi sono pseudogeni, cioè geni che non contengono un quadro di lettura valido, in seguito probabilmente a mutazioni verificatesi nel corso del processo evolutivo (3 per gli uomini e 6 per gli scimpanzé). Nel genoma di ratto e di topo sono state identificate forme aggiuntive di TAARs (geni paraloghi) che sono varianti dei 9 sottotipi base, distinte con lettere minuscole (ad es. TAAR8a, TAAR8b, ecc), portando il totale a 19 e 16 recettori rispettivamente [29] (tabella 2).

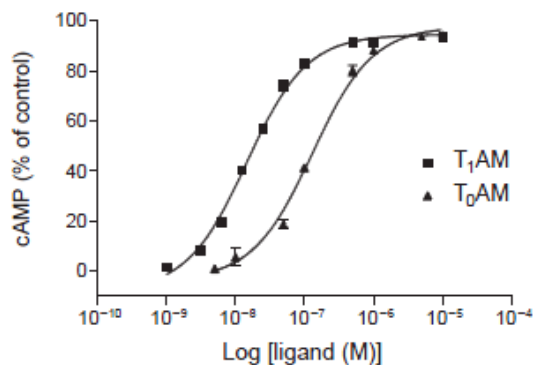
Tabella 2: TAARs nel genoma umano, di ratto, di topo e di scimpanzé.

Uomo	Scimpanzé	Ratto	Topo
TAAR1	TAAR1	TAAR1	TAAR1
TAAR2	(TAAR2)	TAAR2	TAAR2
(TAAR3)	(TAAR3)	TAAR3	TAAR3
(TAAR4)	(TAAR4)	TAAR4	TAAR4
TAAR5	TAAR5	TAAR5	TAAR5
TAAR6	TAAR6	TAAR6	TAAR6
(TAAR7)	(TAAR7)	TAAR7a	TAAR7a
		TAAR7b	(TAAR7b)
		TAAR7c	TAAR7c
		TAAR7d	TAAR7d
		TAAR7e	TAAR7e
		(TAAR7f)	TAAR7f
		TAAR7g	
		TAAR7h	
		(TAAR7i)	
TAAR8	(TAAR8)	TAAR8a	TAAR8a
		TAAR8b	TAAR8b
		TAAR8c	TAAR8c
TAAR9	(TAAR9)	TAAR9	TAAR9

Tra parentesi sono indicati i pseudogeni.

E' stata soprattutto la similarità strutturale tra iodotironamine e oligoammine a suggerire lo studio di una eventuale attivazione del TAAR1 da parte di alcune T<sub>x</sub>AM [5]. In un modello di espressione eterologa del TAAR1 di ratto in cellule HEK293 molte iodotironamine hanno indotto un aumento della concentrazione di AMP ciclico (figura 7).

Figura 7. Accumulo cAMP a seguito di attivazione di T<sub>1</sub>AM: prova indiretta dell'avvenuto legame della iodiotironamina in questione con il recettore TAAR1 [2].



Costruendo opportune curve dose-risposta, la T<sub>1</sub>AM è risultata essere il substrato con maggiore attività (EC<sub>50</sub>=14 nM), seguita da T<sub>2</sub>AM (EC<sub>50</sub>=41 nM), T<sub>3</sub>AM (EC<sub>50</sub>=56 nM) e T<sub>0</sub>AM (EC<sub>50</sub>=131 nM) (tabella 3). Esperimenti ripetuti condotti con il TAAR1 di topo hanno prodotto risultati simili, anche se la risposta è stata ottenuta a concentrazioni maggiori di T<sub>1</sub>AM (EC<sub>50</sub>=112nM) e T<sub>2</sub>AM (EC<sub>50</sub>=371nM), mentre T<sub>3</sub>AM e T<sub>4</sub>AM sono risultate inefficaci.

Tabella 3. Accumulo dose-dipendente di cAMP indotto da tironamine per cellule HEK-293 [2].

Tironamina	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	EC <sub>50</sub> (nM)	
					<i>rTAR1</i>	<i>mTAR1</i>
3-T <sub>1</sub> AM	I	H	H	H	14	112
3,3'-T <sub>2</sub> AM	I	H	I	H	41	> 1,000
3,5-T <sub>2</sub> AM	I	I	H	H	56	371
T <sub>3</sub> AM	I	I	I	H	87	> 1,000
T <sub>0</sub> AM	H	H	H	H	131	> 1,000
3'-T <sub>1</sub> AM	H	H	I	H	> 1,000	> 1,000
3',5'-T <sub>1</sub> AM	H	H	I	I	> 1,000	> 1,000
rT <sub>3</sub> AM	H	I	I	I	> 1,000	> 1,000
T <sub>4</sub> AM	I	I	I	I	> 1,000	> 1,000

La necessità di dimostrare l'esistenza del legame T<sub>1</sub>AM-recettore attraverso l'osservazione di un effetto funzionale quale l'accumulo di cAMP è dovuta al fatto che non sono ancora disponibili agonisti o antagonisti recettoriali specifici da utilizzare in esperimenti di legame.

Un secondo recettore che potrebbe mediare alcuni effetti della T<sub>1</sub>AM è il recettore adrenergico  $\alpha_{2A}$  (Adra<sub>2A</sub>), recettore accoppiato alla proteina G<sub>ai</sub>, espresso in molti tipi di cellule incluse le  $\beta$ -cellule pancreatiche [6]. In particolare la somministrazione concomitante dell'antagonista  $\alpha_{2A}$  yohimbina con la 3-T<sub>1</sub>AM a topi di tipo *wild-type* inibisce gli effetti iperglicemici indotti dalla T<sub>1</sub>AM stessa. Inoltre, la 3-T<sub>1</sub>AM non ha effetto sui livelli della glicemia e dell'insulina in topi knockout per il recettore Adra<sub>2A</sub> [6].

## 1.4 Trasporto intracellulare

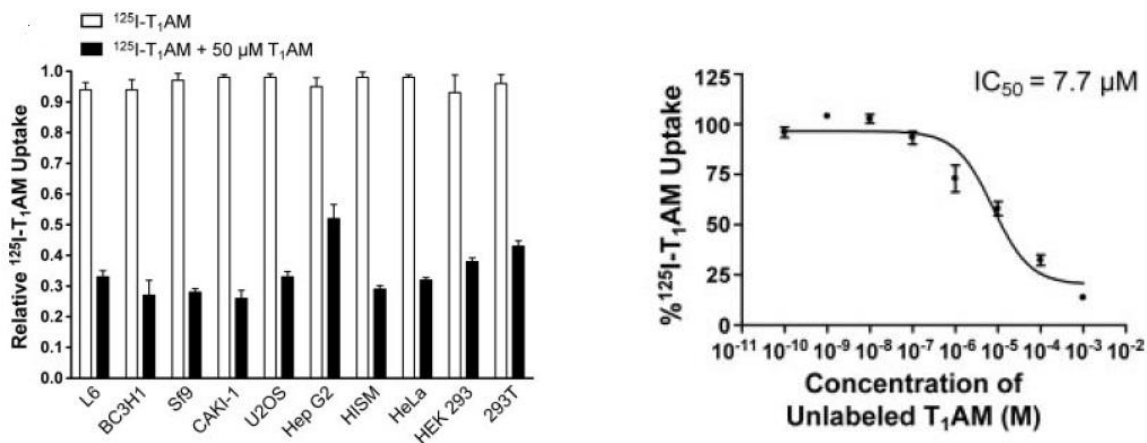
Recentemente è stato riscontrato che la 3-T<sub>1</sub>AM può essere trasportata all'interno di diversi tipi di cellule mediante un meccanismo di trasporto specifico e saturabile (classica cinetica Michaelis-Menten) [31]. Per identificare i presunti trasportatori della T<sub>1</sub>AM è stata eseguita un'analisi di screening su larga scala sulla famiglia dei vettori di trasporto. Da questo screening non sono stati identificati singoli trasportatori specifici per le tironamine, ma è stato possibile ipotizzare che del trasporto di questi composti siano responsabili molteplici trasportatori, otto dei quali sono stati caratterizzati più nel dettaglio.

Per caratterizzare l'uptake della T<sub>1</sub>AM in culture cellulari sono state analizzate diverse linee cellulari: linee di roditori di tipo L6 (cellule di muscolo scheletrico) e BC3H1 (cellule tumorali cerebrali); cellule di insetti di tipo Sf9 (bozzolo tessuto ovarico); linee cellulari umane di tipo CAKI-1 (rene), U2OS (ossa), HePG2 (fegato), HISM (intestino), HeLa (cervice uterina), HEK293 e HEK293T (rene). Le cellule sono state incubate sia con il solo composto



radiomarcato,  $^{125}\text{I-T}_1\text{AM}$  [32], che in co-presenza del composto marcato con un eccesso di  $\text{T}_1\text{AM}$  non marcata. L'inibizione dell'uptake da parte di  $\text{T}_1\text{AM}$  non marcata suggerisce naturalmente l'esistenza di un trasporto specifico (fig. 8 a sinistra).

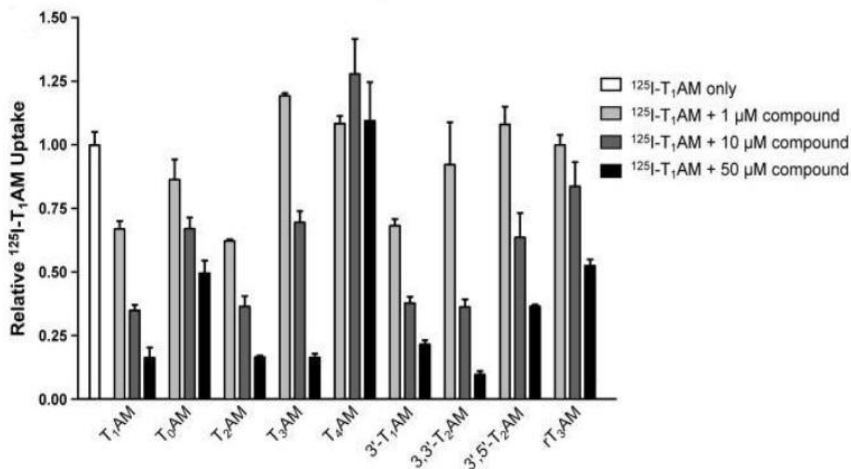
Figura 8. A sinistra: abbattimento uptake di  $^{125}\text{I-T}_1\text{AM}$  in presenza di  $\text{T}_1\text{AM}$  dovuto a specificità del trasporto di  $\text{T}_1\text{AM}$  attraverso membrana; a destra: inibizione dose-dipendente uptake di  $^{125}\text{I-T}_1\text{AM}$  in presenza di  $\text{T}_1\text{AM}$  non marcato [31].



Variando la concentrazione di  $\text{T}_1\text{AM}$  non marcata si nota una inibizione dose-dipendente dell'uptake di  $^{125}\text{I-T}_1\text{AM}$  con un valore di  $\text{IC}_{50}$  pari a 7.7  $\mu\text{M}$  (fig. 8 a destra). I dati derivanti dai due grafici suggeriscono come il trasporto di  $\text{T}_1\text{AM}$  attraverso membrana possa essere considerato a tutti gli effetti un trasporto facilitato.

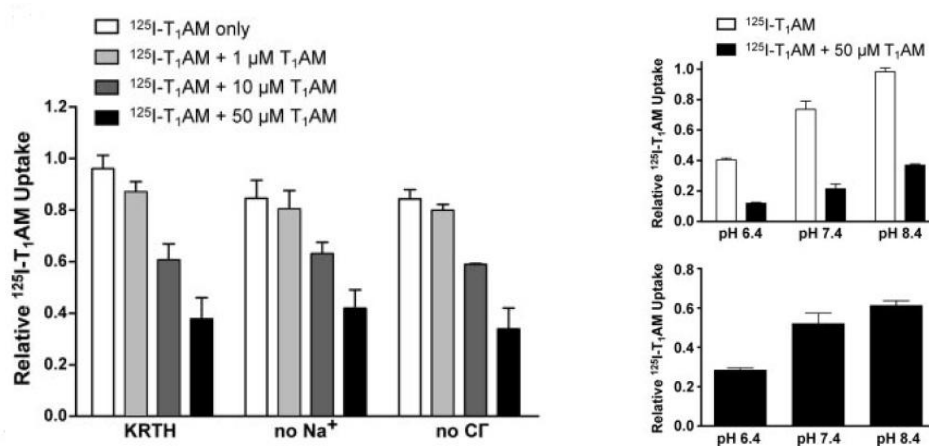
Sono stati inoltre svolti esperimenti per determinare gli effetti delle altre tironamine sull'uptake della  $\text{T}_1\text{AM}$ . Ad eccezione della  $\text{T}_4\text{AM}$ , si è riscontrato un calo dose-dipendente nell'uptake della  $\text{T}_1\text{AM}$  in presenza di altre iodotironamine. Le iodotironamine che hanno una efficacia minore in questo senso sono  $\text{rT}_3\text{AM}$ ,  $\text{T}_0\text{AM}$  e  $3',5'\text{-T}_2\text{AM}$ , mentre la  $3,3'\text{-T}_2\text{AM}$  sembra ridurre l'uptake di  $\text{T}_1\text{AM}$  radiomarcata in misura comparabile alla  $\text{T}_1\text{AM}$  non marcata (fig. 9).

Figura 9: Competizione delle tironamine sull'uptake di T<sub>1</sub>AM [31].



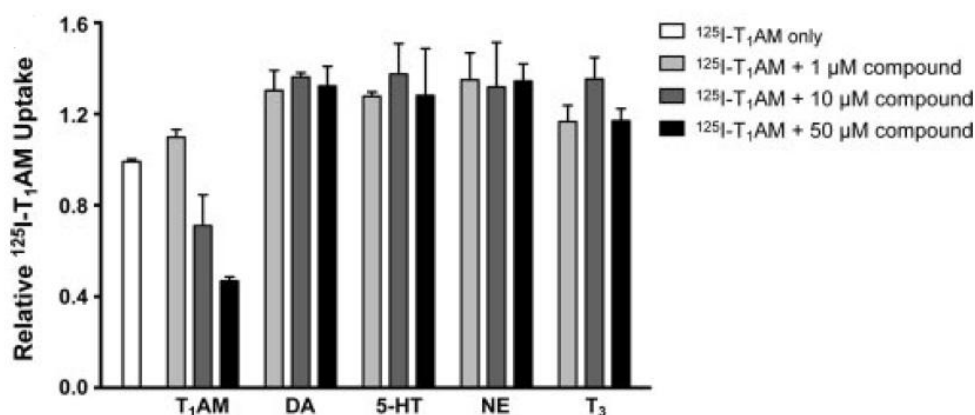
Per determinare se la captazione della tironamina dipendesse da dagli ioni sodio e cloruro sono stati svolti esperimenti con tamponi privi di questi ioni. I livelli di assorbimento osservati sono rimasti praticamente invariati, mostrando che il trasporto è sodio/cloruro indipendente (fig. 10, sinistra). È stato indagato anche l'effetto del pH ed è stato osservato che si ha un netto aumento dell'uptake di T<sub>1</sub>AM radiomarcata con l'aumentare del pH (fig. 10, destra). Ciò suggerisce che la captazione della T<sub>1</sub>AM sia governata da un flusso protonico dall'interno all'esterno (o analogamente da un flusso di ossidrili diretto dall'esterno all'interno), osservazione che rafforza l'ipotesi di un probabile trasporto passivo.

Figura 10: A sinistra, indipendenza del trasporto di T<sub>1</sub>AM da sodio/cloruro: a fare le veci del sodio in sua assenza è la colina, a sostituire il Cl<sup>-</sup> è invece il gluconato; a destra, dipendenza dell'uptake di T<sub>1</sub>AM da pH: all'aumentare del pH aumenta uptake sia di T<sub>1</sub>AM radiomarcata sia di T<sub>1</sub>AM radio marcata + T<sub>1</sub>AM.



Al fine di identificare i trasportatori di membrana responsabili della captazione della T<sub>1</sub>AM sono stati effettuati esperimenti di competizione utilizzando substrati tipici per le maggiori classi di trasportatori. Non si sono notati effetti inibitori né in presenza di dopamina, serotonina, norepinefrina, né in presenza di triiodotironina (fig. 11), suggerendo che la T<sub>1</sub>AM non sia captata all'interno della cellula attraverso lo stesso meccanismo di questi composti.

Figura 11. L'uptake della T<sub>1</sub>AM non è inibito da presenza di monoamine neurotrasmettitoriche come la dopamina (DA), la serotonina (5-HT), la norepinefrina (NE) o di ormoni tiroidei (nello specifico T<sub>3</sub>).



Ulteriori esperimenti realizzati aggiungendo inibitori della classe di trasportatori cationici/anionici organici (OCTs/OATs) e della classe di trasportatori nucleosidici (ENTs: che include il PMAT o ENT4) hanno dato esiti negativi anche a valori di concentrazioni elevati, superiori addirittura alle loro costanti di Michaelis Menten: si possono quindi escludere come probabili trasportatori anche quelli appena citati.

Visti gli scarsi risultati raggiunti nel testare i trasportatori potenzialmente candidati per l'uptake della T<sub>1</sub>AM, sono state applicate anche tecniche di RNA interference. Per gli esperimenti in questione sono stati utilizzati un totale di 1209 siRNAs (3 diversi siRNAs per target) contro 403 trasportatori di membrana (tutte le 46 famiglie di SLC, pseudogeni e trasportatori orfani compresi). I frammenti di dsRNA sono stati trasfettati in cellule HeLa uno alla volta, e dopo un periodo di 48 ore si è misurato l'uptake di T<sub>1</sub>AM classificando come probabili trasportatori tutti quelli che mostrassero, per almeno due dei tre siRNAs a loro

associati, una riduzione dell'uptake di T<sub>1</sub>AM pari o superiore al 30%: con questo criterio sono stati individuati inizialmente 34 candidati (tab. 4).

Tabella 4: 34 possibili trasportatori individuati tramite RNAi screening (riduzione uptake T<sub>1</sub>AM del 30%) [31].

Preliminary transporter candidates resulting from siRNA screening			
SLC6A18	Neurotransmitter transporter	SLC06A1	Organic anion transporter
<b>SLC7A1</b>	<b>Cationic amino acid transporter</b>	SLC26A11	Anion exchanger
SLC7A2	Cationic amino acid transporter	SLC27A1	Fatty acid transporter
SLC7A14	Cationic amino acid transporter	SLC28A3	Concentrative Na <sup>+</sup> -nucleoside transporter
SLC9A4	Sodium/hydrogen exchanger	<b>SLC29A2</b>	<b>Equilibrative nucleoside transporter</b>
SLC9A5	Sodium/hydrogen exchanger	SLC30A8	Zinc transporter
SLC9A6	Sodium/hydrogen exchanger	SLC30A10	Zinc transporter
SLC9A7	Sodium/hydrogen exchanger	<b>SLC31A1</b>	<b>Copper transporter</b>
SLC9A8	Sodium/hydrogen exchanger	SLC35C2	Ovarian cancer overexpressed 1
SLC9A9	Sodium/hydrogen exchanger	SLC35D2	UDP-N-acetylglucosamine transporter
<b>SLC16A7</b>	<b>Monocarboxylate transporter</b>	SLC37A1	Glycerol-3-phosphate transporter
<b>SLC17A5</b>	<b>Anion/sugar transporter</b>	SLC42A2	Rhesus blood group, B glycoprotein
SLCO1A2	Organic anion transporter	SLC42A3	Rhesus blood group, C glycoprotein
<b>SLCO3A1</b>	<b>Organic anion transporter</b>	<b>SLC43A3</b>	<b>System L-like amino acid transporter</b>
<b>SLCO4A1</b>	<b>Organic anion transporter</b>	SLC45A2	Putative sugar transporter
SLCO4C1	Organic anion transporter	SLC45A4	Putative sugar transporter
SLCO5A1	Organic anion transporter	SLC46A1	Heme transporter

Dei 34 trasportatori sopra identificati, ne sono stati scartati 22 perché non presenti in cellule HeLa. Dei 12 trasportatori rimasti, (SLC7A1, SLC16A7, SLC17A5, SLCO3A1, SLCO4A1, SLC29A2, SLC31A1, SLC43A3, SLC9A6, SLC9A9, SLC35C2, SLC35D2\_ Genomics Institute of The Novartis Foundation) ne sono stati poi scartati altri 4 perché presenti solo all'interno della cellula e non a livello della membrana plasmatica (SLC9A6, SLC9A9, SLC35C2, SLC35D2). Gli 8 candidati rimasti (evidenziati in tab. 5 in grassetto) includono carriers di natura diversa: si va da trasportatori ionici organici (SLC7A1, SLCO3A1, SLCO4A1) fino a trasportatori orfani (SLC43), passando per trasportatori di monocarbossilati (SLC16A7), nucleosidi (SLC9A2), composti amminoacidici (SLC43A3) e trasportatori non convenzionali come quello specifico per il rame (SLC31A1). La riduzione di uptake di T<sub>1</sub>AM misurata è stata, per tutti gli 8 trasportatori, di circa il 50-60%.

## 1.5 Effetti sistemici e locali delle tironamine

Le tironamine, ed in particolare la T<sub>1</sub>AM, producono diversi effetti funzionali, anche se il loro ruolo fisiologico non è ancora noto.

Fra gli effetti ascritti alla T<sub>1</sub>AM vanno ricordati:

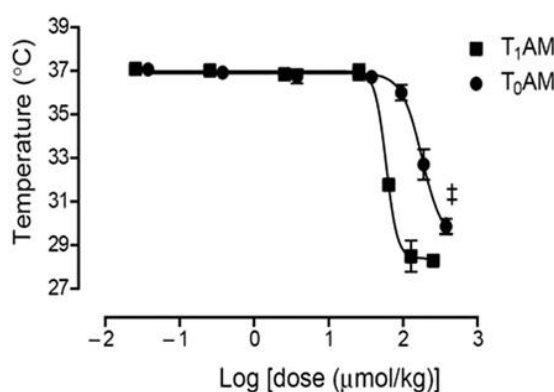
- riduzione della temperatura corporea;
- effetti cardiaci;
- effetti endocrini e metabolici quali la modulazione della secrezione di insulina, l'inibizione del riassorbimento delle catecolamine a livello neurale e l'aumento del metabolismo dei lipidi a spese di quello dei carboidrati.

### 1.5.1 Effetti sulla temperatura corporea

La prima osservazione sperimentale degli effetti funzionali della T<sub>1</sub>AM fu la profonda ipotermia indotta da una somministrazione intraperitoneale nel topo (20-50 mg/kg). Entro 30 minuti dall'iniezione si ha una riduzione della temperatura corporea di circa 8°C per un lasso di tempo compreso tra le 6 e le 12 ore. I topi diventano inattivi, ma i riflessi vengono conservati e l'abbassamento della temperatura corporea non è associata a risposte omeostatiche compensatorie quali il brivido e la piloerezione [2].

La T<sub>0</sub>AM produce effetti simili, sebbene abbia circa un decimo della efficacia della T<sub>1</sub>AM. Le dosi di T<sub>1</sub>AM e T<sub>0</sub>AM richieste per ottenere un effetto pari al 50% della stimolazione massimale sono 59 e 178 µmol/kg, rispettivamente (fig. 12). Quindi la loro potenza relativa è simile a quella mostrata nell'attivazione del TAAR1.

Figura 12. Effetti farmacologici di 3-T<sub>1</sub>AM e T<sub>0</sub>AM sulla temperatura corporea del topo [2].



### 1.5.2 Effetti metabolici ed endocrini

In alcuni mammiferi di piccola taglia, l'ipotermia può essere associata all'abbassamento del metabolismo, producendo uno stato noto come torpore. Per questa ragione è sembrato interessante studiare gli effetti metabolici della T<sub>1</sub>AM [4]. Sia nel topo che nel criceto, la T<sub>1</sub>AM produce come già detto, entro alcuni minuti, una sostanziale diminuzione della temperatura corporea. Questo effetto è associato alla diminuzione del consumo di ossigeno ed a una riduzione del quoziente respiratorio. Quest'ultimo, dato dal rapporto tra CO<sub>2</sub> prodotta e O<sub>2</sub> consumato, riflette il rapporto tra ossidazione del glucosio e ossidazione degli acidi grassi. La diminuzione del quoziente respiratorio è un indice dell'aumentata ossidazione di acidi grassi, che comporta un quoziente respiratorio di circa 0.7, rispetto a quella del glucosio, che comporta un quoziente respiratorio di circa 0.9. Quindi la T<sub>1</sub>AM produce uno spostamento dai carboidrati agli acidi grassi come sorgente metabolica preferenziale. Altre conseguenze del trattamento con la T<sub>1</sub>AM sono l'insorgenza di chetonuria e una significativa perdita di massa grassa. Gli effetti metabolici sono più prolungati rispetto agli effetti ipotermici dato che il quoziente respiratorio è ancora soppresso dopo 24 ore.

E' stato riportato recentemente che la T<sub>1</sub>AM modula la secrezione dell'insulina. Nei topi l'iniezione intraperitoneale di T<sub>1</sub>AM (50 mg/kg) porta ad un incremento del livello di glucosio nel sangue e diminuisce i livelli di insulina. Questa azione può essere attribuita alla stimolazione di recettori adrenergici  $\alpha_{2A}$  accoppiati a proteine G<sub>i</sub>, dato che è inibita dalla yohimbina, antagonista per gli  $\alpha_{2A}$ , ed è assente in topi transgenici con delezione dei recettori  $\alpha_{2A}$  o in seguito ad espressione selettiva nelle cellule  $\beta_2$  di subunità catalitiche della tossina della pertosse, un noto inibitore del segnale delle proteine G<sub>i/O</sub>. Al contrario, in linee cellulari di insulinoma con una sovraespressione del gene del TAAR1, il trattamento con T<sub>1</sub>AM aumenta la secrezione di insulina. Queste evidenze hanno portato alla conclusione che il

T<sub>1</sub>AM stimola la segregazione di insulina via TAAR1 e inibisce la secrezione di insulina via recettori  $\alpha_{2A}$ .

Un altro effetto endocrino esercitato dalle tironamine fu osservato nel 1984 quando fu descritto che il T<sub>3</sub>AM inibisce la secrezione di prolattina nelle colture di cellule pituitarie [33]. A quel tempo l'effetto fu attribuito all'interferenza con il sistema adrenergico, ma non sono state testate altre iodotironamine e la loro interazione con i TAARs, che sono espressi nella ghiandola pituitaria.

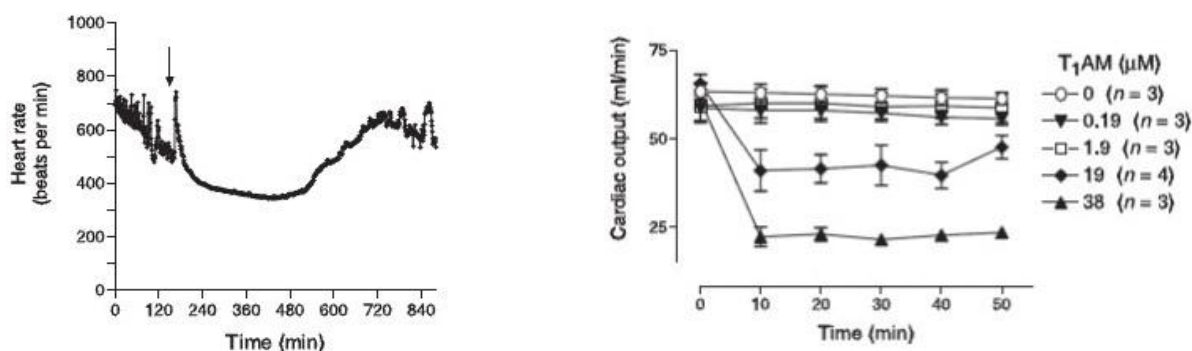
Alla T<sub>1</sub>AM è stato riconosciuto il ruolo di neuromodulatore: è in grado infatti di inibire i trasportatori di dopamina e norepinefrina, impedendo così il riassorbimento neurale di tali neurotrasmettitori. Anche a livello neuronale è stata dimostrata un'interazione fra tironamine e i trasportatori delle monoamine. [34]. In sistemi di espressione eterologhi, tutte le tironamine tranne la rT<sub>3</sub>AM inibiscono l'attività del trasportatore della dopamina (DAT). Analogamente, tutte le tironamine tranne la T<sub>4</sub>AM inibiscono il trasportatore vescicolare delle monoamine 2 di ratto (VMAT2), che non è localizzato nella membrana plasmatica, ma nella membrana vescicolare intracellulare. Per contro, il trasportatore della serotonina (SERT) è inibito esclusivamente dalla 3,3'-T<sub>2</sub>AM, ma non è influenzato dalle altre tironamine. Inoltre, il trasportatore della noradrenalina (NET) della membrana plasmatica umana ha mostrato un comportamento misto, venendo attivato da alcune tironamine e inibito da altre, tra cui la T<sub>1</sub>AM. In questi sistemi di espressione eterologa, la T<sub>1</sub>AM inibisce DAT, VMAT2, e NET a valori di IC<sub>50</sub> nell'intervallo del micromolare, o in modo competitivo o con una modalità di inibizione mista. Sia nel sistema di espressione eterologo che in preparazioni di vescicole cerebrali sinaptiche o di sinaptosoma di ratto, la T<sub>1</sub>AM agisce come inibitore di DAT, VMAT2 e NET, senza esserne un substrato. Pertanto, la T<sub>1</sub>AM è l'unica feniletilamina endogena nota fino ad oggi che inibisce VMAT2. L'interferenza con questi sistemi aminergici potrebbe avere rilevanza fisiologica [35].

### 1.5.3 Effetti cardiaci

L'ipotermia e gli effetti metabolici causati da un'iniezione intraperitoneale di T<sub>1</sub>AM somministrata a topi wild-type C57BL/6 sono accompagnati da bradicardia reversibile [2].

In linea di massima gli effetti cardiaci della T<sub>1</sub>AM sono opposti a quelli prodotti dagli ormoni tiroidei. La T<sub>1</sub>AM produce infatti una risposta inotropica e cronotropa negativa, cioè una riduzione della contrattilità e della frequenza cardiaca. In topi adulti C57BL/6J, ad esempio, l'iniezione di 50 mg/kg di T<sub>1</sub>AM determina un calo immediato della frequenza cardiaca che di solito persiste per circa 6-8 ore (fig. 13, sinistra): i risultati mostrati in figura fanno riferimento ad esperimenti svolti su 5 cavie. La bradicardia è stata valutata con dispositivi radio telemetrici, che consentono il monitoraggio continuo senza dover ricorrere ad anestesia [2, 27].

Figura 13. A sinistra, condizione di bradicardia associata a somministrazione di T<sub>1</sub>AM in topi adulti C57BL/6J; a destra, riduzione della gittata cardiaca in presenza di T<sub>1</sub>AM.



In ratti anestetizzati l'iniezione intravenosa di T<sub>1</sub>AM (0,5 mg/kg) causa una diminuzione transitoria della pressione aortica e della frequenza cardiaca entro un minuto.

La T<sub>1</sub>AM è stata studiata anche *ex-vivo* grazie ad esperimenti condotti su cuore di ratto isolato e perfuso con la tecnica del cuore lavorante. La somministrazione di T<sub>1</sub>AM o T<sub>0</sub>AM produce entro 30 secondi una diminuzione dose-dipendente della gittata cardiaca, associata ad una riduzione del flusso aortico, della pressione sviluppata e della frequenza cardiaca, mentre il flusso coronarico non cambia. Dosi di T<sub>1</sub>AM comprese tra i 20 μM e i 38 μM comportano



una riduzione nella gittata cardiaca di circa il 63% dopo 10 min dall'introduzione della T<sub>1</sub>AM (fig. 13, destra), e una diminuzione della frequenza cardiaca del 50%. L'effetto persiste per almeno 50 minuti ed è reversibile. E' stato concluso che la T<sub>1</sub>AM e la T<sub>0</sub>AM producono entrambe un'azione inotropica e cronotropica negativa. La prima è indipendente dalla seconda, dato che è stata osservata sia in cuori sottoposti a pacing che in cardiomiociti isolati. Il valore di IC<sub>50</sub> si colloca nel range micromolare: per quanto riguarda l'effetto sulla gittata cardiaca è pari a 27 µM per T<sub>1</sub>AM e 94 µM per T<sub>0</sub>AM [3].

Il coinvolgimento dei TAARs in questi effetti cardiaci è confermato dall'osservazione che azioni simili sono prodotte da alcune oligoamine, secondo il seguente ordine di efficacia: T<sub>1</sub>AM > octopamina = β-fenilettilamina > triptamina, mentre la p-tiramina è virtualmente inattiva [35]. Questo ordine di efficacia è diverso da quello osservato in cellule eterologhe che esprimono il TAAR1, nelle quali la p-tiramina e β-fenilettilamina sono molto più efficaci delle altre oligoamine [30, 36]. Inoltre esperimenti condotti con radioligandi mostrano la presenza di siti di legame specifici e saturabili per [<sup>3</sup>H]-p-tiramina e [<sup>125</sup>I]-T<sub>1</sub>AM, ma [<sup>125</sup>I]-T<sub>1</sub>AM non è spiazzato dalla p-tiramina, mentre [<sup>3</sup>H]-p-tiramina è spiazzata dalla T<sub>1</sub>AM [35]. Dato che nel cuore di ratto sono espressi almeno 5 sottotipi di TAARs [3], sembra plausibile che gli effetti cardiaci non siano mediati da TAAR1 ma piuttosto da un diverso sottotipo. Il candidato più probabile sembra essere TAAR8a, che mostra i più elevati livelli di espressione, circa 100 volte del superiori a quelli del TAAR1.

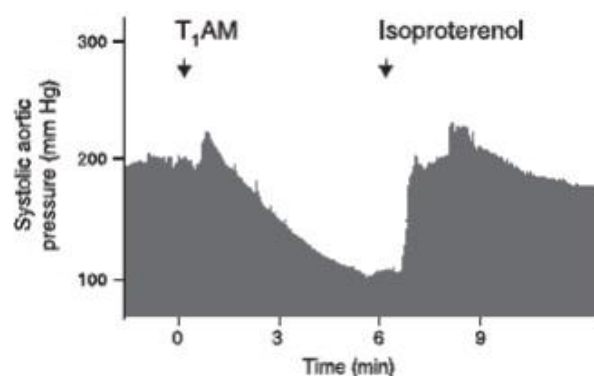
In presenza di T<sub>1</sub>AM i livelli cardiaci di cAMP restano invariati e la risposta funzionale alla T<sub>1</sub>AM non è influenzata dalla tossina della pertosse, escludendo il coinvolgimento delle proteine G<sub>s</sub> e G<sub>i</sub>. Inibitori della proteina chinasi C, della proteina chinasi calcio-calmodulina dipendente, delle MAP chinasi, e della fosfatidilinositolo-3-chinasi sono inefficaci, mentre i cambiamenti emodinamici sono drammaticamente potenziati dalla genisteina, un inibitore delle tirosina chinasi, ed attenuati dal vanadato, un inibitore delle

tirosina fosfatasi. E' stato quindi ipotizzato che la T<sub>1</sub>AM moduli lo stato di fosforilazione di residui di tirosina, ed esperimenti Western Blot con anticorpi antifosfotirosina confermano la defosforilazione di alcune proteine nelle frazioni microsomiali e citosoliche [3]. L'identità di queste proteine è ancora sconosciuta.

Mentre la T<sub>1</sub>AM è stata scoperta solo recentemente la T<sub>0</sub>AM è nota da diverso tempo e in letteratura sono presenti articoli che descrivono i suoi effetti cardiovascolari [37, 38, 39]. Nei cani anestetizzati la somministrazione di T<sub>0</sub>AM (8-16 mg/kg) produce un aumento della frequenza cardiaca e dello stato inotropico. La risposta è fortemente ridotta o abolita dal blocco adrenergico, ed è stato suggerito che la T<sub>0</sub>AM induca il rilascio di catecolamine. Dopo deplezione delle catecolamine e blocco adrenergico, l'infusione di T<sub>0</sub>AM produce un immediato effetto inotropo negativo, che è in accordo con i risultati ottenuti nel cuore isolato.

La T<sub>1</sub>AM non sembra interferire con il sistema adrenergico, in quanto la co-somministrazione di isoproterenolo, un agonista beta-adrenergico, è in grado di aumentare la gittata e la frequenza cardiaca (figura 14).

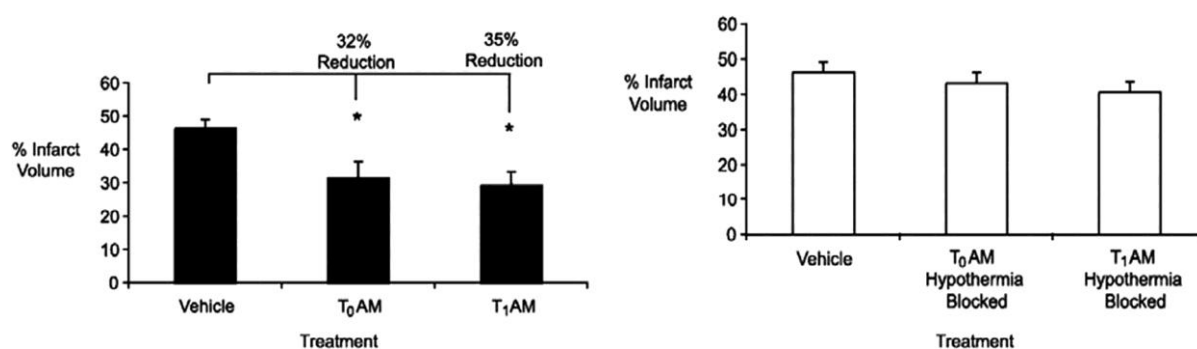
Figura 14. Cuori di ratto isolati pretrattati con T<sub>1</sub>AM e sottoposti poi ad azione di un agonista non selettivo dei recettori  $\beta$  [2].



## 1.6 Proprietà farmacologiche

Nonostante la loro funzione fisiologica rimanga elusiva, sia la iodotironamina e che la tironamina hanno rivelato un promettente potenziale terapeutico. T<sub>1</sub>AM e T<sub>0</sub>AM sono state utilizzate con successo per il trattamento di ictus indotto sperimentalmente (fig. 15) [40]. In topi C57BL/6 ai quali è stata somministrata per iniezione intraperitoneale T<sub>1</sub>AM o T<sub>0</sub>AM (50 mg/kg), un'ora dopo o due giorni prima dell'induzione sperimentale dell'ictus, i volumi dell'infarto sono risultati ridotti. L'effetto è stato soppresso quando i topi trattati con le tironamine sono stati posti su un tappetino termico, indicando che la neuroprotezione è legata all'induzione di ipotermia. Questo studio è stato il primo a usare composti endogeni per indurre ipotermia nel trattamento dell'ictus [40].

Figura 15. Volume dell'infarto (percentuale dell'emisfero omolaterale) dopo il trattamento con T<sub>1</sub>AM e T<sub>0</sub>AM dopo occlusione dell'arteria cerebrale media (a sinistra) e in condizioni di ipotermia bloccata (n = 8 per gruppo). Le barre di errore rappresentano il SEM. \*, P < 0.05 rispetto ai veicoli iniettati [40].

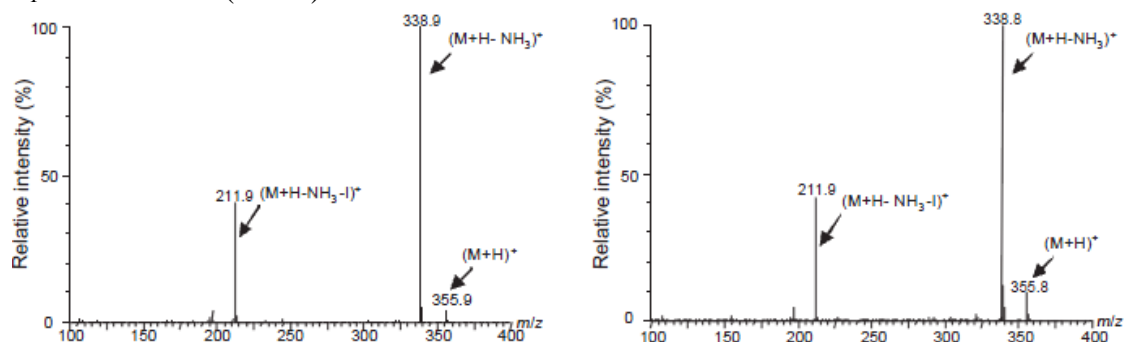


## 1.7 Concentrazioni endogene

Dalla scoperta che la 3-iodotironamina è un composto endogeno, uno dei punti cruciali della ricerca è stato quello di determinare la sua concentrazione nel sangue e nei tessuti. Tale conoscenza è essenziale per comprendere il ruolo fisiologico di questa sostanza. I primi tentativi di dosaggio sono stati effettuati utilizzando la cromatografia liquida accoppiata

alla spettrometria di massa (LC-MS-MS), tecnica con la quale la molecola è stata identificata da estratti di tessuti di ratto. La corretta identificazione della T<sub>1</sub>AM endogena si basa sul confronto con il corrispondente composto sintetico contenente quattro atomi di deuterio sulla catena laterale etilamminica, che viene usato come standard interno.

Figura 16. Paragone tra lo spettro di massa-massa della T<sub>1</sub>AM endogena (sinistra) e della T<sub>1</sub>AM deuterata (destra).



Massa dello ione precursore (a m/z 356 Da) e primo ione prodotto (a m/z 339 Da), a partire dal quale si può generare anche un secondo ione a m/z 212 Da [2].

I primi dati relativi alle concentrazioni di T<sub>1</sub>AM risalgono al 2004, quando è stata segnalata la presenza di T<sub>1</sub>AM nel cervello di ratto [2]. Indicazioni della presenza di T<sub>1</sub>AM endogeno sono state ottenute anche sul sangue di criceto [4] e sul tessuto cardiaco di ratto [3]. Una serie di problemi tecnici legati soprattutto alla preparazione del campione ha però reso impossibile allestire un dosaggio quantitativo.

## **1.8 Scopo della tesi**

Lo scopo di questo lavoro di tesi è sviluppare una metodica per il dosaggio quantitativo di T<sub>1</sub>AM. In particolare ci siamo proposti di identificare metodiche per la preparazione del campione, ottimizzati per vari tipi di matrici (siero e tessuti), in grado di estrarre con buona efficienza la T<sub>1</sub>AM e consentirne il dosaggio accurato mediante tecniche di spettrometria di massa accoppiata a HPLC. Tale metodica è stata quindi applicata a diverse tematiche biologiche, quali lo studio del metabolismo della T<sub>1</sub>AM e dei suoi effetti neurologici e comportamentali.

## 2. MATERIALI E METODI

### 2.1 Materiali

Le tironamine T<sub>1</sub>AM, T<sub>0</sub>AM, gli acidi tiroacetici TA<sub>1</sub>, TA<sub>0</sub>, i corrispondenti composti deuterati e la 3,5-T2 marcata, tutti sottoforma di sali cloridrati, sono stati gentilmente forniti dal Prof. Thomas S. Scanlan (Departments of Physiology and Pharmacology and Cell and Developmental Biology, Oregon Health and Science University, Portland, Oregon).

Gli ormoni tiroidei, T<sub>4</sub> e T<sub>3</sub>, e la 3,5-diiodotironina (3,5-T2) sono stati acquistati da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), mentre i composti marcati, <sup>13</sup>C<sub>6</sub>-T<sub>4</sub> (L-tiroxina [<sup>13</sup>C<sub>6</sub>] HCl) e <sup>13</sup>C<sub>6</sub>-T<sub>3</sub> (3,5,3-triiodotironina-[<sup>13</sup>C<sub>6</sub>]·HCl), dalla Isoscience (King of Prussia, PA).

Salvo diversamente specificato, tutti gli altri reagenti sono stati acquistati da Sigma-Aldrich. I solventi impiegati nella procedura di estrazione e per le misure in HPLC-MS/MS sono di grado HPLC, le altre sostanze chimiche sono di grado reagente.

L'acqua deionizzata per la preparazione delle soluzioni tampone è stata purificata con il dispositivo Millipore Direct Q3.

Le cartucce per l'estrazione in fase solida SPE Bond Elut Certify® a resina mista C-8/scambio cationico da 130 e 300 mg (particle size 40µm) di fase stazionaria sono state acquistate dalla Varian (Middelburg, Paesi Bassi).

Tutti gli oggetti impiegati in laboratorio sono in plastica (polistirene, polietilene) o, quando di vetro, del tipo usa e getta.

### 2.2 Strumentazione

Per la concentrazione dei campioni nella fase di pre-trattamento è stato impiegato un concentratore ad aghi con flusso di azoto, mentre per l'essiccamento finale del campione

ottenuto dall'eluizione in colonna SPE è stato impiegato il concentratore SpeedVac 5301 (Eppendorf).

Lo spettrometro di massa utilizzato è l'Applied Biosystems/Sciex (Concord, ON, Canada) API 4000 a triplo quadrupolo, equipaggiato con sorgente IonSpray/APCI. Il sistema HPLC è il Perkin Elmer (Boston, MA, USA) Serie 200 Micro, costituito da autocampionatore termostato, due pompe monosolvente per microflussi e forno per colonne. Il controllo del sistema HPLC-MS-MS e l'acquisizione dati sono stati effettuati per mezzo del software di gestione Applied Biosystems/Sciex Analyst (rev. 1.4.2).

La separazione analitica è stata ottenuta utilizzando una colonna Phenomenex® (Torrance, CA, USA) Gemini C18 (2 x 50mm, 3 $\mu$ m,) , preceduta da una precolonna Phenomenex Gemini C18 (4 x 2 mm).

### **2.3 Raccolta e conservazione dei campioni**

I campioni di sangue umano sono stati raccolti per prelievo in provette Vacutest contenenti attivatore della formazione del coagulo. I sieri sono stati ottenuti per centrifugazione a 3500 g per 5 minuti e quindi separati e conservati in provette di polipropilene a -20°C. In ciascun caso è stato ottenuto il consenso informato ed la ricerca è stata approvata dal comitato etico istituzionale.

Gli organi di ratto, maschio del ceppo Wistar (peso 270-300g) alimentato con dieta standard, sono stati prelevati dopo anestesia con miscela di etere e aria (nel rispetto della Dichiarazione di Helsinki). Ogni organo è stato pesato e successivamente omogenato o conservato a -80°C.

I tessuti di topo sono stati forniti da altri gruppi di ricerca; il trasporto è stato effettuato in ghiaccio secco, ed è stato verificato che i campioni biologici conservati a  $-80^{\circ}\text{C}$  sono stabili per un periodo di tempo superiore ai tre mesi.

## **2.4 Preparazione degli omogenati tessutali**

Un grammo di tessuto è stato omogenato in circa 1 ml di tampone fosfato (154 mM NaCl, 10 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pH 7,4) in un omogenizzatore Potter-Elvehjem con pestello in politetrafluoroetilene (PTFE) mantenuto a  $4^{\circ}\text{C}$ . L'omogenato è stato centrifugato per 10 minuti a 6500 g e il sovranatante è stato separato e trattato o conservato a  $-80^{\circ}\text{C}$  fino al momento del successivo trattamento.

I tessuti cerebrali invece sono stati trattati in maniera differente a causa dell'elevato contenuto di lipidi che non consentivano l'estrazione mediante tecnica SPE. Essi sono stati omogenati mediante macinazione con mortaio in presenza di azoto liquido. La polvere così ottenuta è stata raccolta in una provetta di polipropilene tipo Falcon e trattata o conservata a  $-80^{\circ}\text{C}$  fino al momento del successivo trattamento.

## **2.5 Casistica clinica**

La serie di soggetti da cui è stato raccolto il siero per la presente sperimentazione include 42 persone, di cui 20 maschi e 22 femmine, con un'età media di  $58.1 \pm 1.6$  anni. Di questi uno era un volontario sano, 24 erano pazienti ammessi al reparto di cardiologia dell'Ospedale di Massa e 17 pazienti con sospetta tireopatia seguiti presso l'Istituto di Fisiologia Clinica del CNR di Pisa. All'interno di questa casistica 7 pazienti sono risultati



affetti da diabete di tipo 2 e 6 hanno mostrato all'esame ecocardiografico una disfunzione ventricolare sinistra.

## 2.6 Trattamento dei campioni

La procedura di estrazione in fase solida mediante colonne SPE è stata applicata ai campioni di siero e ai sovrinatanti ottenuti dagli omogenati dei tessuti, ad eccezione degli omogenati di cervello che sono stati sottoposti ad una estrazione di tipo liquido-liquido.

Ad ogni campione (circa 1 ml), posto in una provetta di polipropilene da 10 ml, sono stati aggiunti 10 µL di una miscela di standard marcati, solitamente costituita da d<sub>4</sub>-T<sub>1</sub>AM, <sup>13</sup>C<sub>6</sub>-T3 e <sup>13</sup>C<sub>6</sub>-T4. Quando richiesto dalla finalità della ricerca, alla miscela di standard sono stati aggiunti altri composti marcati come ad esempio 3,5-T2, TA<sub>1</sub>, TA<sub>0</sub>. L'impiego degli standard marcati all'inizio del trattamento del campione consente un tracciamento degli analiti per l'intero processo di estrazione e analisi. Tale tecnica è detta *diluizione isotopica*.

I campioni sono stati agitati estensivamente su vortex per consentire alla miscela di standard di distribuirsi omogeneamente nella matrice del campione.

Sono state effettuate varie prove al fine di testare i tipi di denaturanti più comuni, sia fisici che chimici, quali il calore, gli ultrasuoni, soluzioni di acidi forti (acido cloridrico, acido tricloroacetico), soluzioni concentrate di sali inorganici od organici (cloruro di sodio, urea, cloruro di guanidinio).

Per la scelta dell'agente precipitante necessario per la deproteinizzazione del campione sono stati presi in esame solventi quali l'acido tricloroacetico, il metanolo, l'acetonitrile e l'acetone.

Dopo centrifugazione, eseguita al fine di agevolare la separazione della soluzione di interesse dalla parte solida costituita dalle proteine, il campione è stato sottoposto ad estrazione mediante l'impiego di cartucce SPE.

Le cartucce impiegate erano di varia natura: a base di silice, le Bond Elut Certify a resina mista C-8/scambio cationico (Varian), o con un adsorbente in fase inversa costituito da materiale polimerico, quali le MCX e le WCX a scambio cationico in modalità mista, le MAX e le WAX a scambio anionico in modalità mista (Waters).

Ad ogni campione è stata aggiunta una soluzione tampone al fine di creare le condizioni di pH più idonee per creare l'interazione con la fase solida adsorbente della colonna SPE usata per l'estrazione.

In generale il protocollo di estrazione prevede 5 fasi: condizionamento e lavaggio della cartuccia, caricamento del campione, lavaggi della cartuccia, eluizione del campione.

L'eluato è stato portato a secco mediante concentratore SpeedVac a 30°C e conservato a -20°C fino al momento dell'analisi mediante HPLC-MS-MS.

Infine il campione è stato ricostituito con una miscela HCl 0,1M/metanolo (50:50) e analizzato mediante HPLC-MS-MS.

Nel caso del cervello è stata effettuata un'estrazione liquido-liquido, eseguita come segue.

I tessuti (corteccia, materia bianca, cervelletto o cervello intero) sono stati estratti dall'animale, lavati con soluzione salina, pesati, e polverizzati in un mortaio in presenza di azoto liquido. La polvere così ottenuta è stata sospesa in una miscela acetone/acido formico (85:15). Ad ogni campione sono state aggiunte 6 pmol di d<sub>4</sub>-T<sub>1</sub>AM come standard interno. Dopo aver agitato estensivamente i campioni su vortex, ogni sospensione è stata lavata per cinque volte con una miscela ottano/cloroformio (8:1) al fine di rimuovere i lipidi. Lo strato

acquoso è stato completamente essiccato mediante speedvack a 30°C e conservato a -20°C fino al momento dell'analisi mediante HPLC-MS-MS.

Anche in questo caso il campione è stato ricostituito con una miscela HCl 0,1M/metanolo (50:50) e analizzato mediante HPLC-MS-MS.

## **2.7 Metodo HPLC-MS-MS**

Questa tecnica combina la cromatografia ad alte prestazioni con la sensibilità e specificità che sono tipiche della spettrometria di massa. Con l'aiuto di questi strumenti è possibile misurare concentrazioni nell'ordine dei pg/ml in matrici biologiche. Lo strumento tipo consiste in una pompa HPLC, un autocampionatore, una colonna cromatografica ed un rivelatore, che nel nostro caso è costituito da uno spettrometro di massa a triplo quadrupolo. Con quest'ultimo è possibile misurare la massa delle molecole di interesse e quella dei frammenti da esse originati, purchè siano in forma ionica. L'elevata specificità offerta dalla tecnica consente il dosaggio degli analiti di interesse con una buona accuratezza, evitando che altre specie presenti in matrice possano interferire con il risultato finale dell'analisi.

### **2.7.1 La spettrometria di massa**

La spettrometria di massa è una tecnica analitica largamente diffusa poiché è in grado di fornire informazioni riguardanti la composizione qualitativa e quantitativa di una vasta gamma di analiti di natura sia organica che inorganica, in miscele complesse, con buone caratteristiche di sensibilità [41].

Con la spettrometria di massa è anche possibile misurare la massa accurata di un particolare isotopo o di un composto contenente un insieme di isotopi, ed è un requisito degli

spettrometri ad alto potere di risoluzione saper distinguere valori di massa con più cifre decimali significative.

Si definisce massa accurata la massa misurata sperimentalmente, mentre per massa esatta si intende la massa calcolata, ottenuta dalla somma delle masse dei singoli isotopi che costituiscono uno ione, un radicale o una molecola, avendo come riferimento la massa unitaria, pari a 1/12 della massa dell'isotopo del carbonio più abbondante in natura.

Lo spettro di massa di un campione viene ottenuto trasformando le molecole degli analiti in ioni gassosi di elevata mobilità per poi separarli in base al loro rapporto massa/carica.

Poiché l'ordinaria spettrometria di massa è piuttosto limitata nell'analisi di miscele di composti, sono stati sviluppati accoppiamenti tra spettrometri di massa ed efficienti dispositivi di separazione, come la cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC).

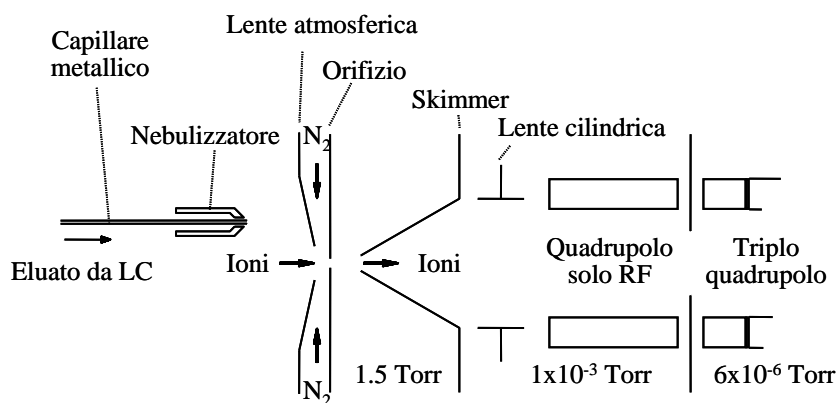
In particolare, l'accoppiamento tra HPLC e spettrometria di massa è stato reso possibile dallo sviluppo di opportune interfacce in grado di ionizzare molecole in fase acquosa, a pressione atmosferica, e di trasmettere gli ioni così generati in zone di alto vuoto dello spettrometro di massa dove vengono analizzati. Le interfacce più diffuse tra quelle attualmente disponibili si basano sul principio della ionizzazione elettrospray (*Electro Spray Ionization*, ESI), della ionizzazione chimica a pressione atmosferica (*Atmospheric Pressure Chemical Ionization*, APCI) e della fotoionizzazione a pressione atmosferica (*Atmospheric Pressure PhotoIonization*, APPI).

Nell'ambito di questo lavoro di tesi la tecnica di ionizzazione più idonea è risultata l'ESI. Una breve descrizione dei suoi principi di funzionamento è pertanto indispensabile per una migliore comprensione del lavoro svolto.

La tecnica ESI sfrutta l'emissione di ioni in fase gassosa a partire da goccioline cariche prodotte per nebulizzazione di una soluzione dell'analita in un solvente polare, in

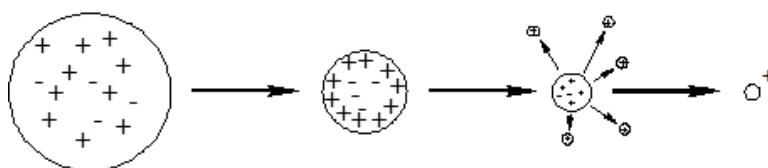
presenza di un elevato potenziale elettrostatico e di un opportuno flusso di gas inerte. La figura 17 riporta lo schema di una sorgente ESI.

Figura 17. Sorgente per elettro-nebulizzazione.



Il principio di funzionamento di questa sorgente si basa su una nebulizzazione elettrostatica dell'analita direttamente nella fase liquida. In pratica il solvente HPLC contenente l'analita viene fatto fluire attraverso un capillare in acciaio sottoposto ad elevata differenza di potenziale (5 kV c.a.), con lo scopo di generare nebulizzazione elettrostatica. Un flusso di aria, coassiale a quello dell'eluato in uscita dal capillare, ha il compito di assistere la nebulizzazione elettrostatica e incrementarne l'efficienza.

Figura 18. Principio di funzionamento l'evaporazione ionica.



Le goccioline cariche che vengono a formarsi hanno una netta prevalenza di un tipo di carica (positivo per applicazione di un potenziale positivo e negativo per applicazione di un potenziale negativo) e al loro interno gli ioni presenti in eccesso tendono a disporsi sulla superficie delle goccioline, al fine di minimizzare la repulsione elettrostatica coulombiana. Essi sono trattenuti dalla tensione superficiale del solvente. In seguito all'evaporazione del

solvente, e al conseguente aumento del campo elettrico dovuto a una diminuzione di volume (e quindi di superficie) delle goccioline, si raggiunge una situazione limite in cui gli ioni vincono la tensione superficiale e vengono espulsi nella fase gassosa. Tale fenomeno prende il nome di “Evaporazione Ionica”. Nelle sorgenti più moderne si fa uso anche un flusso addizionale di aria riscaldata che aumenta la velocità di evaporazione del solvente, migliorando la resa ionica e consentendo fra l’altro di operare a flussi liquidi più elevati.

La sorgente ESI tradizionale (senza riscaldamento) ha una risposta proporzionale alla concentrazione dell’analita. Esiste, però, un valore limite di concentrazione oltre il quale non si ha più guadagno di segnale. Questo valore, noto come limite di saturazione, è dovuto al fatto che una concentrazione molto alta induce un minor grado di ionizzazione. Eccedendo il limite di saturazione, si ha perdita di segnale, in quanto gli ioni presenti tendono ad ostacolarsi a causa di fenomeni di carica spaziale. Nel caso di sorgenti con flusso di aria riscaldata, sebbene la risposta sia generalmente proporzionale alla quantità assoluta di analita, si ha sempre un valore limite di saturazione oltre il quale il guadagno di segnale non è direttamente proporzionale all’incremento della quantità di analita.

### **2.7.2 Meccanismo di Ionizzazione**

La ionizzazione avviene tramite meccanismi acido-base, analoghi a quelli della ionizzazione chimica. Applicando un voltaggio positivo, si ha generalmente la protonazione dell’analita, con formazione di uno ione quasi-molecolare protonato,  $[M+H]^+$ . Frequentemente vengono prodotti anche addotti con  $Na^+$ ,  $K^+$ , e  $NH_4^+$  che sono ioni praticamente ubiquitari, presenti anche nei solventi di eluizione e in quelli utilizzati per la preparazione dei campioni.

La formazione di questi addotti e la loro eventuale prevalenza rispetto allo ione protonato dipendono dal valore di affinità protonica ( $P_M$ ) dell'analita.

La ionizzazione negativa, invece, avviene per perdita di un protone dall'analita, con formazione di uno ione quasi-molecolare deprotonato,  $[M-H]^-$ , e/o per formazione di addotti con vari anioni presenti in soluzione, quali  $CH_3COO^-$ ,  $Cl^-$ ,  $HCOO^-$ , etc.

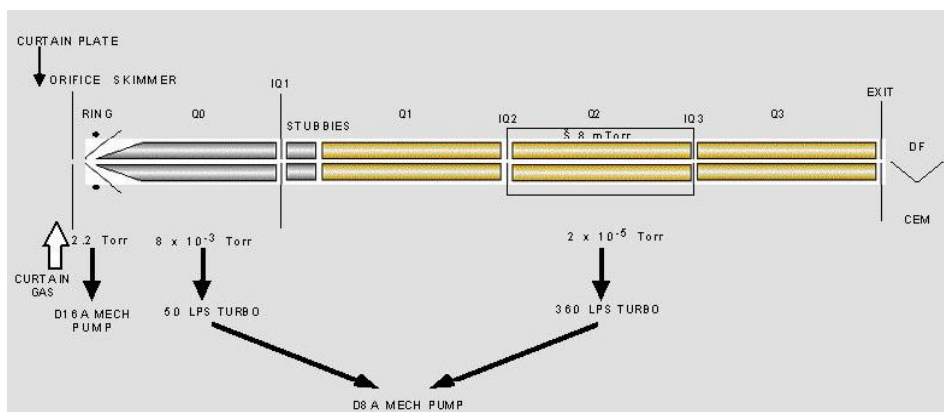
In alcune circostanze la sorgente di ionizzazione può dar luogo a formazione di prodotti di ossidazione dell'analita in modalità ioni positivi oppure di riduzione in modalità ioni negativi. Il capillare metallico e il suo controlettrodo (in molti casi nominato Curtain plate), infatti, costituiscono una vera e propria cella elettrochimica, nella quale si possono avere reazioni elettrolitiche .

Perché la ionizzazione possa avvenire, l'analita deve essere piuttosto polare, avere una maggior basicità (nel caso della modalità ioni positivi) o acidità (in modalità ioni negativi) del solvente o della miscela di solventi, ed un'energia di desolvatazione non eccessiva. L'uso di solventi aventi elevata tensione superficiale come l'acqua, o la presenza di tensioattivi, limita la desolvatazione degli ioni. Una massiccia presenza di sostanze ioniche (tamponi o sali), invece, peggiora l'efficienza di ionizzazione dell'analita, causando competizione per il desorbimento dalla superficie delle goccioline, con conseguente perdita di segnale dell'analita.

### **2.7.3 La spettrometria di massa a triplo quadrupolo**

Lo spettrometro di massa utilizzato per questo lavoro di tesi è del tipo a triplo quadrupolo. Esso è dotato di 3 selettori quadrupolari nella zona di alto vuoto (Q1, Q2, Q3), preceduti da uno ulteriore (Q0) nella zona di vuoto intermedio (fig.19).

Figura 19. Analizzatore a triplo quadrupolo: schema del cammino ottico



Una volta generato in sorgente, il flusso degli ioni viene accelerato da un potenziale di declustering e desolvato dalle residue molecole neutre di solvente mediante urti con una cortina di gas inerte (curtain gas). Il flusso ionico dopo esser passato dalla zona a pressione atmosferica ad una con vuoto di circa 2 Torr, attraversa uno skimmer (una lente avente forma tronco conica con il vertice rivolto verso il flusso ionico) dove viene separato dalle molecole del curtain gas, che a causa della loro natura di molecole neutre subiscono dispersione verso il sistema di vuoto. Il flusso ionico giunge quindi al quadrupolo Q0, dove il vuoto ha un valore di circa  $10^{-2}$  Torr. Il Q0, costituito da quattro barre di metallo soggette a differenza di potenziale alternata, ha la funzione di imprimere moto armonico agli ioni entranti e favorisce la definitiva declusterizzazione degli ioni stessi. Dal Q0 gli ioni passano al Q1, il primo vero e proprio analizzatore di massa, alle cui barre oltre ad applicare un potenziale in radiofrequenza si applica anche un potenziale continuo: tale combinazione permette la separazione degli ioni in base al loro rapporto massa/carica, la cui rivelazione fornisce un vero e proprio spettro di massa singola delle specie ioniche provenienti dalla sorgente.

Un analizzatore a multiplo quadrupolo, quale quello utilizzato durante il presente lavoro di tesi, rende possibile l'indagine della natura degli ioni prodotti in sorgente, in termini sia qualitativi che quantitativi, grazie alla possibilità di studiarne la frammentazione. Tale frammentazione viene infatti realizzata nel successivo quadrupolo del cammino ottico, Q2,



che, se riempito con un opportuno gas inerte, opera come cella di collisione. Qui uno ione selezionato nel Q1 viene sottoposto a collisione con un'energia regolabile dall'operatore (energia di collisione) in modo tale da determinarne la frammentazione con formazione di ioni prodotto. L'indagine sulla natura delle specie prodotte per frammentazione viene poi effettuata con il quadrupolo successivo, Q3, che fornisce informazioni che possono essere utilizzate anche per studi strutturali di molecole organiche di natura incognita.

Al fine di condurre indagini strutturali qualitative si possono utilizzare tre diversi metodi di analisi MS-MS: il *Product Ion Scan*, il *Precursor Ion Scan* ed il *Neutral Loss*.

Il *Product Ion Scan* consiste nel monitoraggio di tutti gli ioni frammento provenienti da uno specifico ione quasi-molecolare. In questa tecnica di analisi il quadrupolo Q1 seleziona uno specifico ione da frammentare e il Q3 effettua la scansione su un range di massa determinato, mostrando uno spettro contenente tutti i frammenti ottenuti.

Il *Precursor Ion Scan* si usa ad esempio nell'identificazione dei metaboliti di farmaci. Tale tecnica consiste nel monitoraggio di tutti gli ioni quasi-molecolari che danno origine ad uno specifico frammento. In questo caso il Q3 è impostato sul frammento interessato, mentre il Q1 opera la scansione su un range di massa determinato, rivelando quali ioni quasi-molecolari originano il frammento analizzato. In questo modo si possono riconoscere famiglie di composti caratterizzati da una sottostruttura comune, carica.

Il *Neutral Loss* è una tecnica che permette di indagare se durante la frammentazione vi è perdita di specie molecolari neutre (che ovviamente non sono rivelabili dallo strumento). In questo caso entrambi i quadrupoli Q1 e Q3 operano la scansione su range di massa sfalsati di un certo valore, rivelando così tutte le specie che hanno avuto una perdita di molecole neutre con massa pari a questa differenza. In questo modo si possono riconoscere famiglie di composti caratterizzati da una sottostruttura comune, neutra.

La rivelazione del segnale rappresenta l'ultimo stadio del processo. Gli ioni che fuoriescono dal cammino ottico entrano in un elettromoltiplicatore, che ha il compito di trasformare il segnale ionico in un segnale elettrico che può essere registrato ed elaborato.

#### **2.7.4 Metodo di analisi**

E' possibile che specie di differente natura producano ioni indistinguibili durante il meccanismo di ionizzazione (ioni isobari, cioè aventi stesso rapporto massa/carica). Al fine di discriminarli si può agire in due modi:

- misurare la massa atomica esatta;
- indurre una successiva frammentazione dello ione ottenuto e monitorare i frammenti (SRM, *Selected Reaction Monitoring*).

Il primo metodo necessita di una strumentazione con ottica e selettore di ioni in grado di consentire una risoluzione fino alla quinta cifra decimale (cosa non permessa dal quadrupolo, che può arrivare solo alla prima cifra decimale). Tale metodo di identificazione discrimina specie con formula bruta differente, ma non isomeri aventi la stessa formula bruta.

Il secondo metodo, lo SRM, consiste nel selezionare il singolo ione quasi-molecolare dell'analita con il Q1, indurre la sua frammentazione tramite il Q2 e monitorare un numero opportunamente scelto di frammenti diagnostici tramite il Q3. Un suo corretto uso richiede che la scelta degli ioni frammento venga effettuata non solo in base all'intensità del loro segnale, ma anche della loro specificità. Bisogna tener presente che difficilmente specie chimiche di natura diversa, ma con ioni quasi-molecolari indistinguibili, sono soggette allo stesso tipo di frammentazione. In particolare alcuni tra i prodotti di frammentazione sono caratteristici della molecola di interesse e pertanto il loro monitoraggio conferisce al metodo analitico una elevata specificità. Dal punto di vista quantitativo, una determinazione accurata

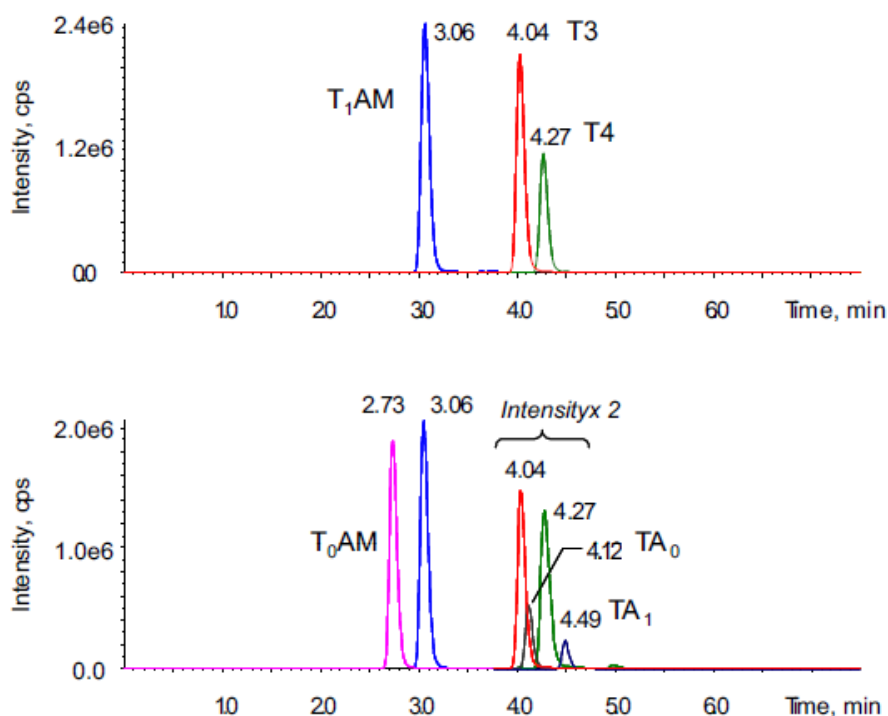
richiede la costruzione di una curva di calibrazione che correli il segnale con la concentrazione.

## 2.8 Analisi dei campioni

Sono stati sviluppati metodi HPLC-MS-MS per la quantificazione simultanea di T3, T4, T<sub>1</sub>AM, ed eventualmente dei suoi metaboliti putativi, ossia T<sub>0</sub>AM, TA<sub>0</sub>, e TA<sub>1</sub>.

In particolare il metodo 1 è stato ottimizzato per ottenere la massima sensibilità su T<sub>1</sub>AM, T3 e T4, mentre il metodo 2 ha consentito il simultaneo rilevamento di T<sub>0</sub>AM, T<sub>1</sub>AM, TA<sub>0</sub>, TA<sub>1</sub>, T3, e T4 (fig.20).

Figura 20. Cromatogrammi HPLC-MS-MS rappresentativi del metodo 1 (sopra) e del metodo 2 (sotto).



I picchi a 2.73, 3.06, 4.04, 4.12, 4.27 e 4.49 minuti corrispondono a T<sub>0</sub>AM, T<sub>1</sub>AM, T3, TA<sub>0</sub>, T4, e TA<sub>1</sub>, rispettivamente. Concentrazioni: TA<sub>0</sub>, TA<sub>1</sub>, T3, e T4 1 μM, T<sub>0</sub>AM e T<sub>1</sub>AM 200 nM.

Sono riportati di seguito i parametri strumentali dei due metodi.

Metodo 1: modalità in ioni positivi: tensione IonSpray (IS), 5,25 kV; gas di nebulizzazione 1, 70 unità arbitrarie; gas ausiliario, 55 unità arbitrarie; temperatura di sorgente, 650°C; potenziale d'ingresso (EP), 10 V; pressione del gas di collisione collisione, 5,7 mPa.

Metodo 2: il rilevamento di T<sub>0</sub>AM e T<sub>1</sub>AM avviene in modalità ioni positivi con IS 5,25 kV e EP 10 V, mentre quello di TA<sub>0</sub>, TA<sub>1</sub>, T3, T4 viene effettuato in modalità in ioni negativi con IS 4,20 kV e EP -10 V. Gli altri parametri sono analoghi a quelli del metodo 1.

Le transizioni SRM e i parametri correlati per i diversi analiti sono mostrati nelle tabelle 5 e 6.

Le analisi HPLC sono state effettuate con un flusso di 400 µL/min, facendo uso dei seguenti eluenti: solvente A, acqua contenente 0,1% di acido formico; solvente B, metanolo/acetonitrile 1:4, contenente 0,1% di acido formico. Le condizioni del gradiente impiegato relativamente al solvente A sono le seguenti: in 4.5 minuti viene portato dal 5 al 90%, dove viene mantenuto per 0,5 minuti e successivamente la sua percentuale viene portata dal 90 al 100% in 2,5 minuti.

Tabella 5. Analisi in spettrometria di tandem massa: metodo 1

Modalità ioni positivi									
Analita	Parametri operativi				Analita	Parametri operativi			
	Transizione SRM	DP	CE	CXP		Transizione SRM	DP	CE	CXP
T <sub>1</sub> AM	356→165	50	57	14	d <sub>4</sub> -T <sub>1</sub> AM	360→169	50	57	14
	356→195		36	16		360→199		36	16
	356→212		26	18		360→216		26	18
	356→339		16	10		360→343		16	10
T3	652→197	103	89	12	<sup>13</sup> C <sub>6</sub> -T3	658→203	103	89	12
	652→479		47	14		658→485		47	14
	652→508		29	15		658→514		29	15
	652→606		29	17		658→612		29	17
T4	778→351	106	62	10	<sup>13</sup> C <sub>6</sub> -T4	784→357	106	62	10
	778→605		51	16		784→611		51	16
	778→634		34	18		784→640		34	18
	778→732		33	20		784→738		33	20

DP, Declustering potential; CE, collision energy; CXP, collision exit potential.

Tabella 6. Analisi in spettrometria di tandem massa: metodo 2

Modalità ioni negtivi									
Analita	Parametri operativi				Analita	Parametri operativi			
	Transizione SRM	DP	CE	CXP		Transizione SRM	DP	CE	CXP
T <sub>0</sub> AM	230→81	41	48	7	T3	650→72	-84	-49	-12
	230→91		38	8		650→127		-45	-10
	230→109		32	9		650→449		-38	-10
	230→213		15	12		650→633		-28	-16
T <sub>1</sub> AM	356→165	50	57	14	T4	776→127	-70	-70	-11
	356→195		36	16		776→575		-42	-13
	356→212		26	18		776→605		-29	-16
	356→339		16	10		778→759		-33	-19
d <sub>4</sub> -T <sub>1</sub> AM	360→169	50	57	14	TA <sub>0</sub>	243→93	-32	-27	-7
	360→199		36	16		243→106		-26	-10
	360→216		26	18		243→199		-13	-12
	360→343		16	10		TA <sub>1</sub>		369→127	-28
							-13	-11	
							-8	-8	

DP, Declustering potential; CE, collision energy; CXP, collision exit potential.

## 2.9 Elaborazione dati

I risultati relativi ai tessuti sono stati espressi come media  $\pm$  SEM. Le differenze tra i gruppi sono state valutate mediante analisi della varianza ad un criterio di classificazione (ANOVA). Quando appropriato, le stime ottenute in diverse condizioni sperimentali sono state paragonate mediante ANOVA applicata alla regressione non lineare (F test).

Nel caso dei sieri umani, i risultati relativi sono stati espressi come media  $\pm$  SEM. Le differenze tra i gruppi sono state valutate mediante il t test per dati non accoppiati. Le correlazioni tra le variabili sono state valutate mediante analisi di regressione lineare. La soglia di significatività statistica è stato fissata a  $P = 0.05$ .

Per l'elaborazione dei dati e l'analisi statistica è stato utilizzato il software GraphPad Prism version 4.1 per Windows (GraphPad Software, San Diego, CA).

### **3. RISULTATI E DISCUSSIONE**

#### **3.1 Ottimizzazione della metodica di dosaggio**

La prima fase di questo lavoro di tesi ha comportato la messa a punto del metodo di estrazione dei campioni, che si è rivelato come lo stadio più delicato della metodica per la determinazione delle tironamine su campioni ematici o tissutali.

I punti più critici sono stati la scelta dell'agente denaturante, dell'agente precipitante e del tipo di colonna SPE.

Per analogia con gli ormoni tiroidei, dai quali si suppone le iodotironamine derivino, si ipotizza che nel circolo ematico solo una piccola frazione di T<sub>1</sub>AM sia libera, mentre la maggior parte sia legata in maniera reversibile a proteine plasmatiche di trasporto. Si è reso quindi necessario l'impiego di un agente atto a promuovere una denaturazione delle proteine stesse in modo da indebolire l'interazione proteina-T<sub>1</sub>AM prima della loro precipitazione.

Sono state eseguite prove con gli agenti denaturanti più comuni, quali il calore, gli ultrasuoni, soluzioni di acidi forti (acido cloridrico, acido tricloroacetico), soluzioni concentrate di sali inorganici ed organici (cloruro di sodio, urea, cloruro di guanidinio). I vari denaturanti chimici sono stati impiegati sia singolarmente che combinati con quelli di tipo fisico. In particolare sono stati aggiunti al campione, lasciato riposare a temperatura ambiente, urea 8M, cloruro di guanidinio 6M, acido tricloroacetico al 10%, acido cloridrico 1M, cloruro di sodio; in parallelo sono stati condotti esperimenti con lo stesso tipo e quantità di denaturante, ma mettendo il campione in un bagno ad ultrasuoni, o ad incubare a 37 e a 60°C.

Come agenti precipitanti sono stati provati l'acido tricloroacetico, il metanolo, l'acetonitrile, l'acetone. I risultati migliori sono stati forniti dall'acetone, che promuove la

precipitazione di una maggiore quantità di proteine, permettendo di lavorare in condizioni più blande rispetto ad altri agenti, quali l'acido tricloroacetico.

La combinazione agente denaturante/agente precipitante che ha fornito i risultati migliori in termini di pulizia del campione, intensità del segnale e recupero è quella descritta in letteratura per la determinazione della T3 totale in siero umano [42]: cloruro di sodio a temperatura ambiente seguito da precipitazione mediante aggiunta di acetone in un bagno di ghiaccio ed acqua.

L'altra criticità del processo estrattivo è il tipo di colonna SPE impiegato. La scelta iniziale, in base ai dati trovati in letteratura [42], è ricaduta sulle colonne Bond Elute Certify a resina mista C-8/scambio cationico da 130mg, nel caso il volume iniziale del campione sia di circa 1 mL, da 300mg nel caso il volume sia maggiore (particle size 40 $\mu$ m, Varian). La massa adsorbente di queste cartucce è costituita da silice funzionalizzata con catene C8 che terminano con scambiatori cationici forti, costituiti da acido benzensolfonico. Il meccanismo primario di estrazione si basa quindi su interazioni non polari e di scambio cationico; ma, dato che il materiale di base è silice, anche se funzionalizzata, non possono essere completamente escluse interazioni di tipo polare. Di conseguenza questo tipo di colonne sono particolarmente adatte all'estrazione delle tironamine da matrici biologiche. Infatti esse sono trattenute in colonna sia per interazioni di tipo non polare con la loro parte aromatica, che per interazioni ioniche/polari con il gruppo amminico presente sulla catena laterale.

Questo tipo di colonne presenta qualche criticità. Il limite maggiore è la stabilità. Dato che la matrice è costituita da silice, il pH delle soluzioni che entrano in colonna deve essere compreso tra 2 e 8. Inoltre è indispensabile che la colonna resti sempre solvatata nel corso del processo di estrazione perché in caso contrario si andrebbe a compromettere la struttura della fase adsorbente e quindi la purificazione del campione. Per ovviare a questi limiti sono state provate varie colonne SPE con caratteristiche di interazione simili, ma con fase adsorbente

costituita da materiali polimerici differenti, più resistenti a valori di pH estremi e meno sensibili a condizioni che inducano variazioni di struttura. Rispetto alle colonne a base di silice, colonne di questo tipo a parità di massa adsorbente hanno un'area superficiale più estesa e un volume dei pori maggiore e più regolare, consentono una maggiore capacità di carico e sostengono flussi maggiori, rendendo così l'analisi più veloce.

Gli esperimenti comparativi tra le SPE fornite da diversi produttori sono stati eseguiti con soluzioni acquose contenenti quantità di T<sub>1</sub>AM, T3 e T4 simili a quelle presenti in campioni reali. I risultati sono stati in ogni caso interessanti, ma le differenze più significative sono emerse con il campione reale, che ha messo in evidenza la migliore capacità estrattiva delle SPE a base di silice.

Un altro tentativo fatto per implementare il metodo è stato quello di cambiare i solventi impiegati nelle fasi di condizionamento/equilibrio dell'adsorbente, caricamento del campione, lavaggio dell'adsorbente, eluizione dell'analita target.

Brevemente il protocollo prevede:

- condizionamento: 2 ml di diclorometano/isopropanolo (75:25),  
2 ml di metanolo,
- equilibratura: 2 ml di tampone acetato 0,1M pH = 4,
- caricamento: campione (precedentemente trattato) diluito con tampone acetato 0,1M pH = 4,
- lavaggio: 3,5 ml di acqua,  
1,6 ml di acido cloridrico 0,1 M,  
7 ml di metanolo,  
3,5 ml di diclorometano/isopropanolo (75:25),
- eluizione: 2 ml di diclorometano/isopropanolo/idrossido di ammonio



(70:26,5:3,5).

I solventi organici usati nella fase di condizionamento della colonna servono per tenere “bagnata” la fase stazionaria, mentre il tampone impiegato nella fase di equilibratura la solvata e la rende disponibile all’interazione con gli analiti. Si è provato ad usare il solo metanolo, escludendo la miscela diclorometano/isopropanolo, sia in questo stadio che in quelli successivi; questo metodo è stato abbandonato perché comportava una riduzione del recupero dell’analita.

Nella fase di caricamento il campione è stato diluito con lo stesso tampone con cui è stata riequilibrata la colonna. Questa aggiunta ha un duplice scopo: acidificare il campione di modo tale che il gruppo amminico delle tironamine sia protonato e quindi disponibile all’interazione acido-base con i gruppi solfonici della colonna; diluire il campione affinché non si crei competitività tra le molecole di analita stesso per l’interazione con i siti della fase adsorbente. Sempre al fine di permettere all’analita di legarsi alla fase adsorbente, il flusso in questo stadio deve essere lento (1-2 mL/min).

La fase di lavaggio è necessaria per purificare il campione: con l’acqua si eluiscono tutte le specie saline, con l’acido diluito si intensifica ulteriormente il legame analita/fase adsorbente, con il metanolo e la miscela diclorometano/isopropanolo si eliminano tutte le sostanze organiche trattenute in colonna unicamente da interazioni polari e apolari. In alcuni esperimenti è stato omissa il lavaggio con acqua, lasciando solo quello con acido cloridrico, ma questo metodo è stato abbandonato perché comportava un aumento del rumore di fondo.

E’ stato inoltre osservato che è opportuno mantenere un flusso di eluizione basso (2 mL/min), per dar modo alla miscela di solventi di diffondere il più possibile e recuperare tutto l’analita.

Sono stati, quindi, determinati i parametri caratterizzanti il metodo analitico in HPLC-MS-MS sviluppato: il limite di rilevabilità (LOD), il limite di quantificazione (LOQ), la

linearità, il recupero dell'analita dal processo di estrazione in fase solida, ed è stata stimata l'influenza dell'effetto matrice (la soppressione ionica) sulla risposta.

Sebbene sia stata confermata una significativa influenza della composizione della matrice del campione sul segnale, l'impiego di analoghi marcati degli analiti in qualità di standard interni ha consentito la costruzione delle rette di calibrazione a partire da soluzioni a concentrazione nota degli analiti in acqua.

La curva di calibrazione (fig. 21), costruita facendo uso di varie soluzioni a concentrazione nota (1000, 500, 200, 100, 50, 20, 10, 5, 2, 1, 0.5, 0.2, 0.1 ng/ml), è lineare ( $y = 2.93x - 0.27$ ) tra 100 pg/mL e 500 ng/mL con  $r = 0.997$  e un fattore di peso  $1/x$ . Può essere sempre considerata lineare ( $y = 2.68x - 0.14$ ) tra 100 pg/mL e 1000 ng/mL con  $r=0.995$  e un fattore di peso  $1/x$ , sebbene in questo secondo caso la curva che descrive meglio l'andamento sia quadratica ( $y = -0.00108x^2 + 3.05x - 0.322$ ) con  $r = 0.998$  e un fattore di peso  $1/x$  (fig. 22). Ciò evidenzia la comparsa di moderati effetti di saturazione del segnale al valore di concentrazione più elevato.

Figura 21. A sinistra andamento lineare tra 100 pg/ml e 500 ng/ml , a destra andamento lineare tra 100 pg/ml e 1000 ng/ml.

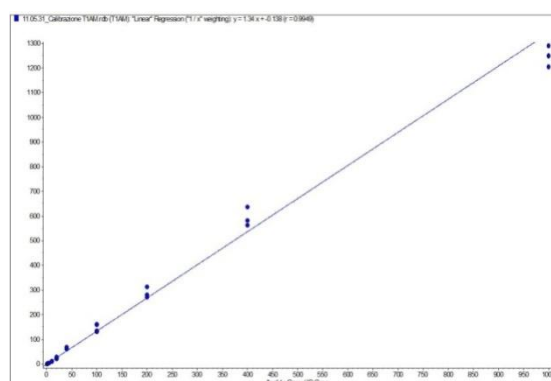
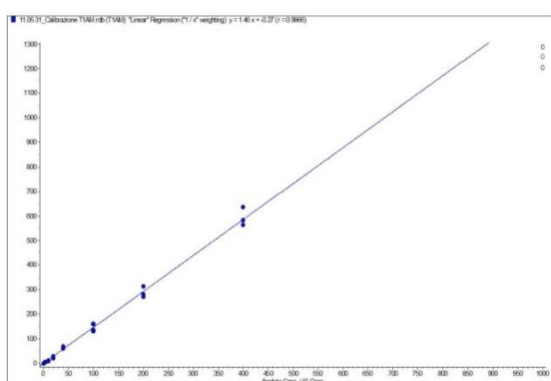
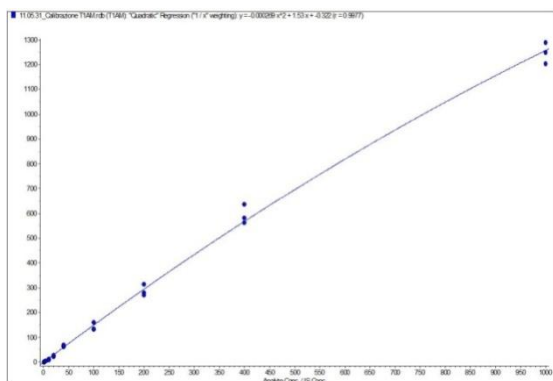


Figura 22. Andamento quadratico tra 100 pg/ml e 1000 ng/ml.



Le soluzioni 1000 ng/ml e 2000 ng/ml hanno dato una forte saturazione del segnale e non sono state quindi utilizzate per la curva di calibrazione.

Il LOD e il LOQ relativi a ogni analita sono stati valutati in matrice biologica, calcolandoli sui tracciati cromatografici. LOD e LOQ, definiti come 3 e 10 volte la deviazione standard del bianco ( $3 \times SD$  e  $10 \times SD$ ), sono rispettivamente pari a 3 e 10 volte il rapporto segnale/rumore (S/N).

Il LOD del T<sub>1</sub>AM è 20 pg/ml (56 fmol/ml, 56 pM), valore per il quale il rapporto segnale rumore è S/N 5.6 con SD = 3, determinato con algoritmo “peak to peak”. Da notare che un simile studio ha fornito per T<sub>3</sub> un LOD attorno a 500 pg/ml (768 fmol/ml, 768 pM), S/N 6 con SD = 3, mentre per T<sub>4</sub> il LOD è 20 ng/ml (26 pmol/ml, 26 nM), S/N 5.6 con SD = 3.

Il recupero dell’analita dall’estrazione in fase solida è stato calcolato attraverso il confronto delle soluzioni di standard chimico in fase mobile estratte e non estratte, ognuna analizzata in triplicato. E’ stato stimato un recupero del T<sub>1</sub>AM esogeno, aggiunto sia ai campioni ematici che agli omogenati, superiore al 90%, dato che conferma la validità del metodo analitico.

## 3.2 Applicazione a tessuti di ratto

Una volta appurato che il metodo di estrazione fosse idoneo allo scopo prefissato, e che quindi i metodi HPLC-MS-MS usati permettessero una valutazione quantitativa del T<sub>1</sub>AM nel sangue e negli omogenati di organi, e la contemporanea rilevazione degli ormoni tiroidei e/o degli eventuali cataboliti del T<sub>1</sub>AM, sono stati svolti esperimenti al fine di determinare la distribuzione della 3-iodotironamina in tessuti animali.

I risultati delle prove eseguite sui diversi tessuti di ratto [43] sono mostrati nelle figure 23 - 27 e riassunti in tabella 7.

Tabella 7. Concentrazioni della T<sub>1</sub>AM nel siero e nei tessuti di ratto.

Tessuto	T <sub>1</sub> AM pmol/g	T <sub>0</sub> AM pmol/g	T3 pmol/g	T4 pmol/g
Cuore	6.60±1.36	ND	0.54±0.10	0.68±0.17
Fegato	92.92±28.46	20.68±0.25	4.71±0.82	14.47±2.98
Rene	36.08±10.42	6.01±1.00	7.14±0.89	13.02±2.81
Tess. muscolare	25.02±6.95	0.27±0.16	0.82±0.16	1.81±0.44
Stomaco	15.46±6.93	ND	3.26±0.69	15.99±9.17
Polmone	5.61±1.53	ND	4.44±1.48	24.80±12.22
Siero	0.30±0.03	0.04±0.03	1.40±0.07	49.57±4.77

I dati sono rappresentati come media±SEM di 5 campioni per gruppo. Le concentrazioni nel siero sono espresse come pmol/ml. ND, not detectable

Figura 23. T<sub>1</sub>AM (m/z 356 → 212) e D<sub>4</sub>-T<sub>1</sub>AM (IS, m/z 360 → 216) in siero e omogenati di tessuto derivanti dallo stesso ratto: A, siero; B, polmone; C, rene; D, stomaco; E, fegato; F, cuore; G, massa muscolare.

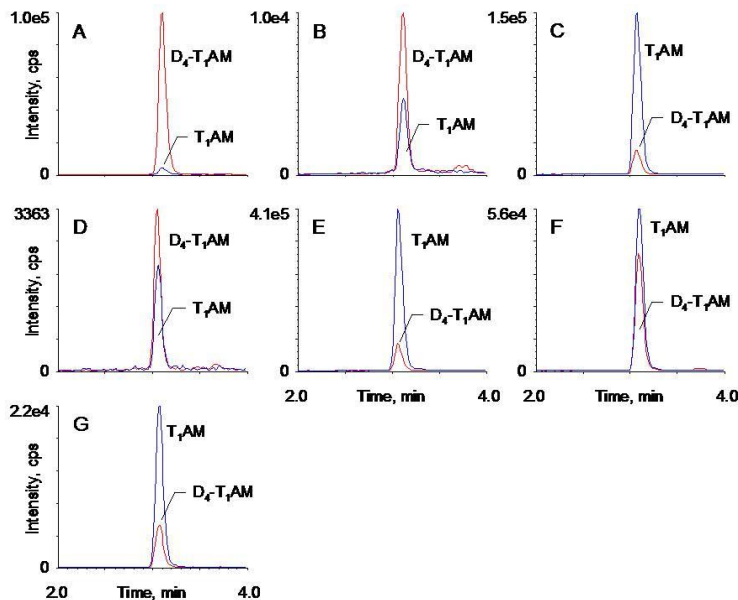
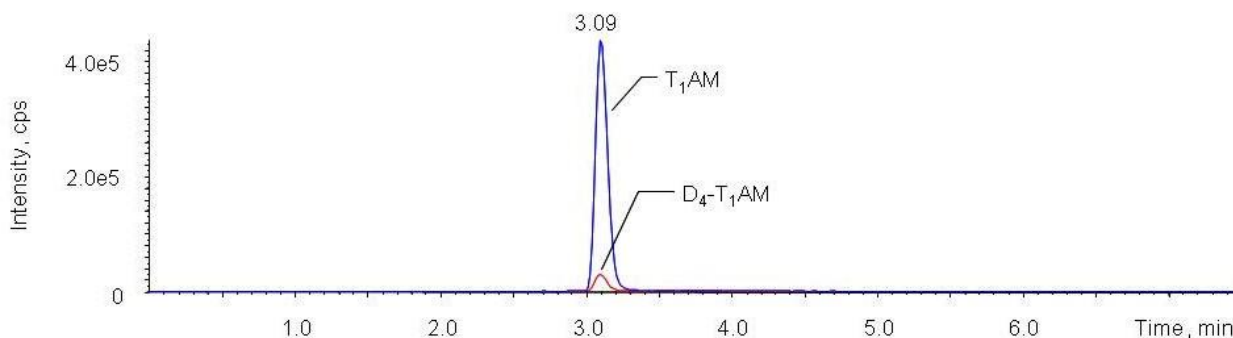


Figura 24. Cromatogramma relativo al T<sub>1</sub>AM nell'omogenato di fegato



La concentrazione media della T<sub>1</sub>AM nel siero è di  $0.30 \pm 0.03$  pmol/ml, che è circa 5 volte più bassa dei livelli di T<sub>3</sub> e 100 volte più bassa di quella della T<sub>4</sub>. E' interessante osservare il fatto che la T<sub>1</sub>AM sia stata rilevata in tutti i tessuti analizzati (fig. 23) e che la sua concentrazione sia molto maggiore di quella nel siero, raggiungendo valori molto elevati nel caso di fegato (fig. 24) e rene ( $92.92 \pm 28.46$  e  $36.08 \pm 10.42$  pmol/g, rispettivamente). In molti tessuti il livello di T<sub>1</sub>AM è addirittura superiore a quello di T<sub>3</sub> e T<sub>4</sub>.

Figura 25. Distribuzione della T<sub>1</sub>AM in siero e omogenati di tessuto derivanti dagli esperimenti condotti su cinque diversi ratti.

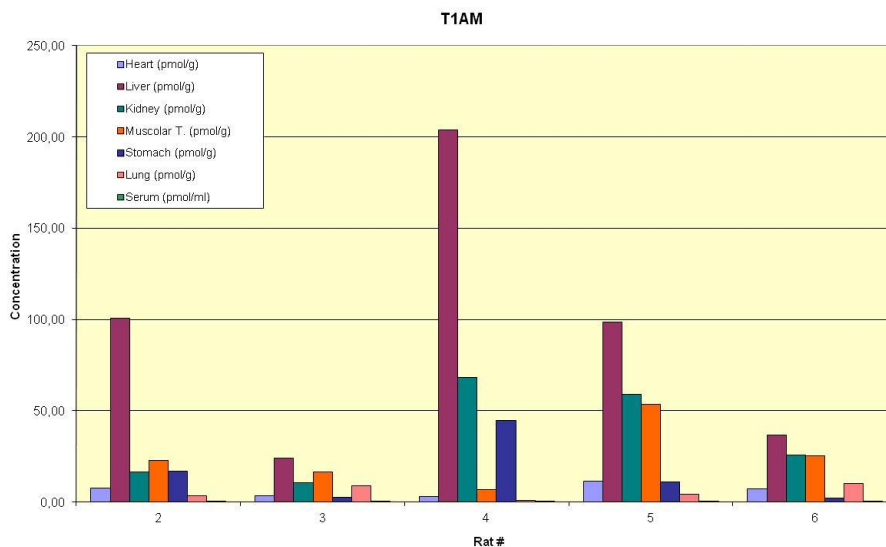
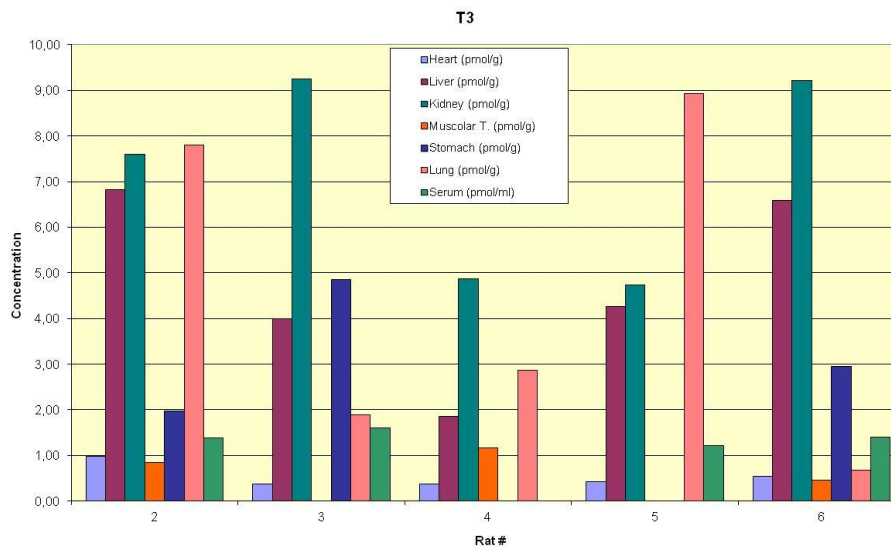
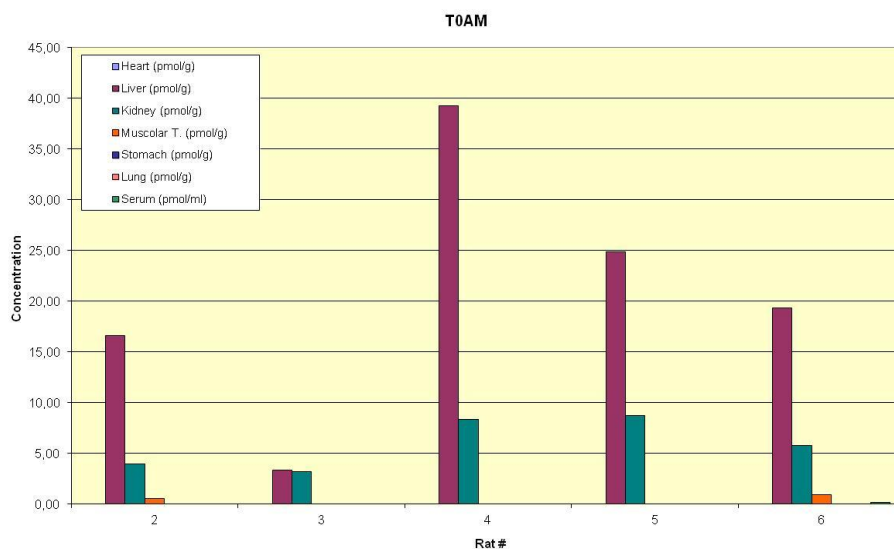


Figura 26. Distribuzione della T<sub>3</sub> in siero e omogenati di tessuto derivanti dagli esperimenti condotti su cinque diversi ratti.



Nel siero e negli omogenati di fegato, rene e tessuto muscolare è stato rilevato anche la T<sub>0</sub>AM ed il suo contenuto è inferiore a quello di T<sub>1</sub>AM di uno - due ordini di grandezza (fig. 27). Non è stato rilevato alcun segnale relativo a TA<sub>1</sub> e TA<sub>0</sub>, le cui concentrazione sono verosimilmente inferiori al limite di rilevazione del metodo (LOD).

Figura 26. Distribuzione della T<sub>0</sub>AM in siero e omogenati di tessuto derivanti dagli esperimenti condotti su cinque diversi ratti.



Nel caso del cervello non è stato possibile applicare la stessa procedura impiegata per gli altri organi a causa dell'elevato livello di lipidi. In questo caso è stata effettuata un'estrazione liquido-liquido [44], eseguita come segue. I tessuti (corteccia, materia bianca, cervelletto) sono stati estratti dall'animale, lavati con soluzione salina, pesati, e polverizzati in un mortaio usando azoto liquido. La polvere così ottenuta è stata sospesa in una miscela acetone/acido formico (85:15) e alla miscela così ottenuta sono state aggiunte 6 pmol di D<sub>4</sub>-T<sub>1</sub>AM come standard interno. Dopo aver agitato estensivamente i campioni su vortex, ogni sospensione è stata lavata per quattro volte con una miscela ottano/cloroformio (8:1) al fine di rimuovere i lipidi. Lo strato acquoso è stato completamente seccato mediante speedvack a 30°C e conservato a -20°C fino al momento dell'analisi mediante HPLC-MS-MS.

Il contenuto medio di T<sub>1</sub>AM è risultato di 60.4 pmol/g nella corteccia, 20.9 pmol/g nella materia bianca e 23.2 pmol/g nel cervelletto.

Questi risultati confermano che la T<sub>1</sub>AM è un composto endogeno con un'ampia distribuzione tissutale. La sua concentrazione serica è simile a quella della T<sub>3</sub> ed è più bassa

di quella della T<sub>4</sub> di circa due ordini di grandezza, mentre la concentrazione tissutale è simile o anche maggiore dei livelli tissutali di T<sub>3</sub> e T<sub>4</sub>.

L'osservazione che il contenuto della T<sub>1</sub>AM nei tessuti sia circa 50 volte maggiore della concentrazione serica suggerisce che essa sia o captata e legata dai tessuti periferici, o che sia prodotta all'interno di tali tessuti.

Il rilevamento della T<sub>0</sub>AM nel siero e nei tessuti con maggiore contenuto di T<sub>1</sub>AM suggerisce che abbia luogo la conversione da T<sub>1</sub>AM a T<sub>0</sub>AM mediante deiodinazione enzimatica [18].

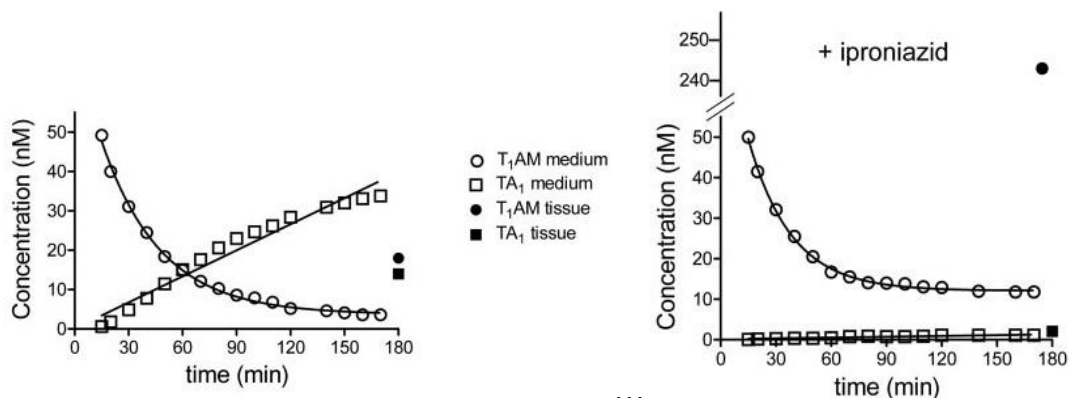
Dato che è stato osservato che la T<sub>1</sub>AM ha significativi effetti cardiaci, sono stati effettuati ulteriori esperimenti su cuori isolati di ratto per investigare l'uptake e il metabolismo della T<sub>1</sub>AM in questo tessuto.

La perfusione del cuore con una soluzione di T<sub>1</sub>AM 50 nM non ha comportato effetti emodinamici significativi. I campioni di perfusato, raccolti ogni 10 minuti su un periodo complessivo di 170 minuti e analizzati in HPLC-MS-MS hanno mostrato che la concentrazione della T<sub>1</sub>AM diminuiva esponenzialmente, con una costante cinetica di  $0.023 \pm 0.01 \text{ min}^{-1}$  ( $r=0.992$ ), che corrisponde ad un tempo di emivita di 30 min. In corrispondenza a tale diminuzione si è stato osservato un accumulo di TA<sub>1</sub>, mentre non è stata rilevata la presenza di T<sub>0</sub>AM e TA<sub>0</sub>. L'aumento della concentrazione del TA<sub>1</sub> ha un andamento lineare con una velocità media di  $221 \pm 12 \text{ pmol/litro} \cdot \text{min}$  ( $r = 0.979$ ). Dopo 170 minuti la concentrazione di TA<sub>1</sub> superava quella della T<sub>1</sub>AM di circa un fattore 10 (TA<sub>1</sub> 33.8 nM, T<sub>1</sub>AM 3,6 nM, dati mostrati in figura 28).

Il cuore è stato omogenato dopo 180 minuti di perfusione e sottoposto ad estrazione e successiva analisi mediante HPLC-MS-MS per determinare le concentrazioni tissutali di T<sub>1</sub>AM e dei suoi metaboliti.



Figura 28. A sinistra, risultati ottenuti in cuore isolato perfuso in presenza di T<sub>1</sub>AM 50 nM; a destra risultati di un esperimento simile condotto in presenza di iproniazide 100 μM.



Dopo 180 minuti la concentrazione della T<sub>1</sub>AM nel perfusato era 1 nM, mentre il suo contenuto nel tessuto era pari a 21 pmol/g. Assumendo che la T<sub>1</sub>AM sia confinata nella fase acquosa, che corrisponde a circa l'85% della massa del tessuto, la sua concentrazione stimata sarebbe 24.5 nM. La concentrazione del TA<sub>1</sub> era 48 nM nel perfusato e il suo contenuto nel tessuto era 17 pmol/g (corrispondente a una concentrazione stimata di circa 20 nM). Il recupero totale ha superato il 98% e dopo 180 minuti la concentrazione di T<sub>1</sub>AM era sostanzialmente più alta nell'omogenato rispetto al perfusato, mentre nel caso del TA<sub>1</sub> avveniva il contrario.

Da studi svolti precedentemente su cellule cardiache H9c2 era emerso che il catabolismo della T<sub>1</sub>AM è fortemente inibito dall'iproniazide, inibitore non specifico delle aminoossidasi. Sono stati quindi svolti esperimenti di perfusione in presenza di iproniazide 100 μM. In queste condizioni la concentrazione di T<sub>1</sub>AM nel perfusato era in media di 14 nM e il suo contenuto nel tessuto era 287 pmol/g (corrispondente a una concentrazione stimata di circa 338 nM), mentre la concentrazione di TA<sub>1</sub> nel perfusato era in media di 2 nM e il suo contenuto nel tessuto era 2 pmol/g (corrispondente a una concentrazione stimata di circa 2.5 nM). Il recupero totale è stato nell'ordine del 35% e, come già osservato negli esperimenti eseguiti in assenza di iproniazide, la concentrazione di T<sub>1</sub>AM era 20 volte più alta nell'omogenato rispetto al perfusato (figura 28).

Il fatto che la concentrazione di  $TA_1$  fosse maggiore nel perfusato che nell'omogenato suggerisce che esso sia prodotto principalmente in sede extracellulare e/o in un limitato sottogruppo di cellule cardiache. Tali ipotesi è confermata dalla riduzione della sua concentrazione in presenza di iproniazide: è noto da dati presenti in letteratura che l'attività dell'enzima SSAO cardiaco è maggiore nelle cellule di tipo non-miocitario e che la massima attività è presente in particolare nella parete vascolare.

In questi esperimenti non sono stati rilevati né  $T_0AM$  né  $TA_0$ , confermando che, nonostante la presenza di deiodinasi di tipo 1 e di tipo 3 nel tessuto cardiaco, la loro attività enzimatica in condizioni fisiologiche è estremamente bassa.

Il fatto che il recupero complessivo della  $T_1AM$  e dei suoi cataboliti fosse quasi il 100% negli esperimenti condotti in assenza di iproniazide e si riducesse al 35% in presenza dell'inibitore, suggerisce che ad elevate concentrazioni di  $T_1AM$  possano aver luogo altri processi, come ad esempio il legame della molecola a siti subcellulari dai quali non viene staccata e recuperata mediante la procedura di estrazione.

Nel tentativo di comprendere se la  $T_1AM$  possa essere prodotta nel cuore a partire dagli ormoni tiroidei presenti nel circolo sanguigno, sono stati svolti esperimenti nei quali il cuore è stato perfuso con tamponi contenenti  $T_4$  50 nM. Dopo 180 minuti di perfusione il cuore è stato omogenato, estratto ed analizzato mediante HPLC-MS-MS. La concentrazione media di  $T_4$ ,  $T_3$  e  $T_1AM$  relativa a due esperimenti era 425.08, 4.44, 0.35 pmol/g rispettivamente. La  $T_1AM$  non è stata rilevata nel tampone di perfusione. Sono stati condotti esperimenti di controllo nei quali il cuore è stato perfuso per 180 minuti con il tampone standard e la concentrazione di  $T_1AM$  nell'omogenato è risultata 0.34 pmol/g ( $T_4$  e  $T_3 < 0.3$  pmol/g); ciò lascia supporre che la  $T_1AM$  trovata nei precedenti esperimenti non derivi dagli ormoni tiroidei, bensì sia di origine endogena. Quindi si può concludere che il tessuto cardiaco sia in grado di accumulare  $T_4$  esogena e convertirne un 1% circa in  $T_3$ , ma non di

produrre T<sub>1</sub>AM. Presumibilmente la produzione locale di T<sub>1</sub>AM può essere maggiore in tessuti con maggiore attività deiodinastica, quali fegato, rene, sistema nervoso centrale. Questa conclusione è coerente con i risultati ottenuti dagli omogenati di questi organi, che mostrano i livelli più alti di T<sub>1</sub>AM.

### 3.3 Applicazione a campioni di siero umano

E' stato effettuato uno studio per rilevare e quantificare la T<sub>1</sub>AM nel sangue di pazienti umani [45]. Sono stati analizzati T<sub>1</sub>AM, T<sub>3</sub> e T<sub>4</sub> totali in campioni di siero mediante spettrometria HPLC-MS-MS, con il metodo già validato nella ricerca sugli organi di ratto [44], e i risultati sono stati correlati con alcune variabili cliniche e di laboratorio che risultavano disponibili (tabella 8).

Come indicato nei metodi, la casistica includeva complessivamente 42 pazienti.

La T<sub>1</sub>AM è stata rilevata in tutti i campioni e la sua concentrazione media è risultata  $0.219 \pm 0.012$  pmol/ml (fig. 29).

Figura 29. Tracciato rappresentativo del segnale del T<sub>1</sub>AM nel siero umano.

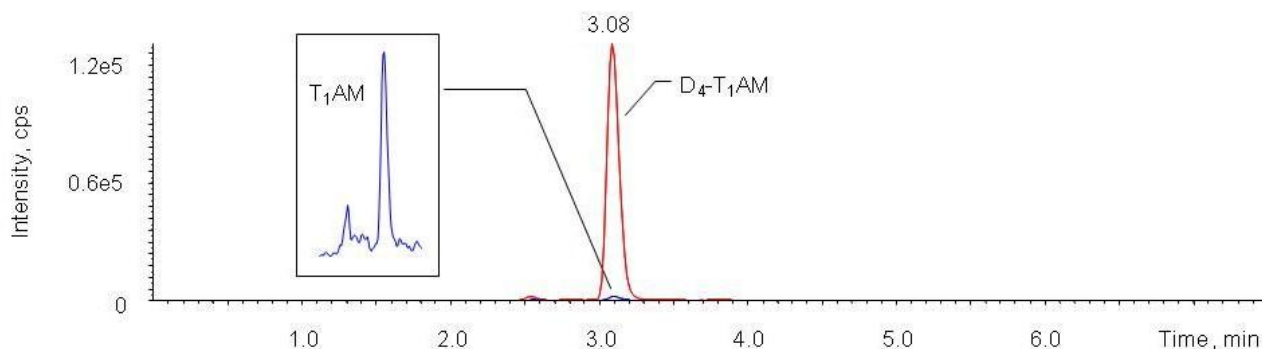


Tabella 8. Variabili cliniche e di laboratorio.

Variable	Mean $\pm$ SEM	Correlation coefficient vs. T1AM	P value
T <sub>1</sub> AM (pmol/ml)	0.219 $\pm$ 0.012	1	<0.001
T3 (pmol/ml)	1.52 $\pm$ 0.11	0.705	<0.001
T4 (pmol/ml)	142.32 $\pm$ 16.20	0.654	<0.001
fT3 (fmol/ml)	3.18 $\pm$ 0.26	0.550	<0.001
fT4 (fmol/ml)	13.46 $\pm$ 0.96	0.339	0.037
TSH ( $\mu$ IU/ml)	6.65 $\pm$ 2.88	0.049	NS
Età (anni)	58 $\pm$ 2	0.013	NS
Peso (kg)	78 $\pm$ 4	0.152	NS
Altezza (cm)	169 $\pm$ 2	0.183	NS
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	27.4 $\pm$ 1.3	0.050	NS
BSA (m <sup>2</sup> )	1.89 $\pm$ 0.04	0.172	NS
Hb (g/dl)	13.1 $\pm$ 0.4	0.216	NS
Hct (%)	38.9 $\pm$ 1.7	0.270	NS
Glucosio (mg/dl)	119 $\pm$ 7	0.198	NS
HbA1c (%)	6.00 $\pm$ 0.2	0.508	0.013
Creatinina (mg/dl)	1.00 $\pm$ 0.06	0.079	NS
Urea (mg/dl)	44.1 $\pm$ 4.1	0.029	NS
Uricemia (mg/dl)	5.2 $\pm$ 0.3	0.023	NS
Albumina (g/dl)	3.7 $\pm$ 0.1	0.020	NS
Proteine (g/dl)	6.7 $\pm$ 0.1	0.135	NS
BNP (ng/ml)	122 $\pm$ 26	0.543	0.016
AST (IU/ml)	18 $\pm$ 1	0.138	NS
ALT (IU/ml)	16 $\pm$ 2	0.008	NS
GT (IU/ml)	31 $\pm$ 5	0.675	<0.001
ALP (IU/ml)	67 $\pm$ 5	0.121	NS
CK (IU/ml)	104 $\pm$ 12	0.194	NS
Fibrinogeno (mg/dl)	297 $\pm$ 14	0.337	0.115
Colesterolo (mg/dl)	175 $\pm$ 6	0.186	NS
HDL colesterolo (mg/dl)	54 $\pm$ 2	0.039	NS
LDL colesterolo (mg/dl)	101 $\pm$ 6	0.227	NS
Trigliceridi (mg/dl)	97 $\pm$ 6	0.172	NS
Frequenza cardiaca (battiti/min)	70 $\pm$ 3	0.173	NS
Pressione arteriosa sistolica (mm Hg)	129 $\pm$ 4	0.148	NS
Pressione arteriosa diastolica (mm Hg)	75 $\pm$ 2	0.249	NS
Ventricolo sinistro EDV (ml)	127 $\pm$ 9	0.051	NS
Ventricolo sinistro EF (%)	54 $\pm$ 2	0.082	NS
Massa ventricolo sinistro (g)	225 $\pm$ 11	0.084	NS

I dati rappresentano il valore medio  $\pm$  SEM di 42 pazienti (gruppo A + gruppo B) per quanto riguarda T<sub>1</sub>AM, T3, T4, fT3, fT4, TSH, ed età e di 25 pazienti (gruppo A) per le altre variabili. Per alcuni pazienti non sono disponibili tutte le variabili; i valori mancanti sono dieci nel caso di EDV, sei per il BNP, cinque per la massa del ventricolo sinistro, e tre o meno negli altri casi. Valori di  $P \geq 0.200$  non sono mostrati. Diversi pazienti erano sottoposti a trattamento farmacologico cronico. I farmaci assunti includono furosemide, diuretici tiazidici, nitrati, ezetimibe, inibitori della pompa protonica, digossina, cetirizina, allopurinolo, aliskiren, monoxidine, trimetazidina, eparina a basso peso molecolare, sulfonilurea, e metformina. Cinque pazienti stavano assumendo levotiroxina. BMI, indice di massa corporea; BSA, superficie corporea; Hb, emoglobina; Hct, ematocrito; AST, aspartato aminotransferasi; ALT, alanina aminotransferasi; ALP, fosfatasi alcalina; CK, creatinechinasi; HDL, lipoproteine ad alta densità; LDL, lipoproteine a bassa densità; AP, pressione aortica; EDV, volume telediastolico; EF, frazione di eiezione; NS, non significativo.

La concentrazione della T<sub>1</sub>AM è significativamente correlata a quella di T<sub>4</sub> totale (r=0.654, P<0.001), T<sub>3</sub> totale (r=0.705, P<0,001), emoglobina glicata (r=0,508, P=0,013), peptide natriuretico cerebrale (r=0.543, P<0.016) e  $\gamma$ -glutamyl transpeptidasi (r=0.675, P<0,001).

Poiché l'HbA<sub>1c</sub> è ampiamente usata come indice di iperglicemia persistente, si è cercato di comprendere se il diabete può essere associato a differenze nei livelli T<sub>1</sub>AM. Ad una parte dei pazienti facenti parte del gruppo su cui è stato svolto questo studio era stato eseguito uno screening completo per il diabete, e a sette pazienti era stato diagnosticato un diabete di tipo 2 in base ai criteri clinici standard, cioè glicemia a digiuno pari a 126 mg/dl o maggiore e/o anormale risposta al test da carico di glucosio. La concentrazione di T<sub>1</sub>AM era significativamente più alta in questi pazienti rispetto agli altri, non diabetici (0.232±0.014 vs 0,203±0,006 pmol/ml, P=0.044).

Sei pazienti hanno mostrato alla valutazione ecocardiografica una disfunzione cardiaca dovuta a una frazione di eiezione ventricolare sinistra inferiore del 50%. I dati clinici dei pazienti con disfunzione cardiaca sono stati confrontati con quelli degli altri soggetti: essi avevano valori più elevati di frequenza cardiaca (91±5 vs 63±2 battiti al minuto, P<0.001), di volume telediastolico del ventricolo sinistro (183±14 vs 103±6 ml, P<0.001), di frazione di eiezione del ventricolo sinistro (41,5±3,3 vs 58,7±0,7%, P<0.001), e di massa ventricolare sinistra (264±23 vs 207±11 g, P<0,021), ma non è stata osservata alcuna differenza significativa per tutte le altre variabili, inclusa la concentrazione di T<sub>1</sub>AM (0,209±0,021 vs 0,212±0,005 pmol/ml). Tuttavia, nei pazienti con ridotta funzionalità cardiaca, la correlazione tra la concentrazione T<sub>1</sub>AM e BNP divenne molto stretta (r=0,925, P=0.027). Come è noto, il BNP è utilizzato come marker endocrino di insufficienza cardiaca e il progressivo aumento del BNP è considerato un indice dell'avanzamento dell'insufficienza cardiaca.

Con questo metodo, il recupero di T<sub>1</sub>AM, T<sub>3</sub>, o T<sub>4</sub> marcati aggiunti come standard interni ai campioni di sangue umano (o agli omogenati di tessuto di ratto) è stato superiore al 90% [45], ed i valori di T<sub>3</sub> e T<sub>4</sub> misurati erano simili ai valori totali T<sub>3</sub> e T<sub>4</sub> che di solito si ottengono con tecniche convenzionali. Pertanto, crediamo che la nostra analisi fornisca una misura delle concentrazioni totali di T<sub>3</sub> e T<sub>4</sub> e si può ipotizzare che lo stesso possa accadere per T<sub>1</sub>AM.

Hoefig e collaboratori hanno recentemente messo a punto un metodo per la determinazione della 3-iodotironamina basato sull'immunodosaggio chemiluminescente [46]. Questi autori hanno creato un composto coniugato legando la T<sub>1</sub>AM a una proteina immunogenica che fungeva da vettore costituita in particolare da sieralbumina bovina (BSA) e emocianina di patella (KLH). Hanno poi prodotto ibridomi da splenociti isolati da topi che erano stati sottoposti ad un programma di immunizzazione usando il composto coniugato. Fra le varie linee di cellule, ne è stata isolata una che produce un anticorpo con elevata affinità e selettività per la T<sub>1</sub>AM, che è stata quindi utilizzata per sviluppare un dosaggio immunometrico quantitativo.

Questa ricerca ha confermato la presenza di T<sub>1</sub>AM endogena nel sangue umano, ma i suoi livelli sono risultati notevolmente superiori a quelli determinati con la nostra tecnica ( $66 \pm 26$  nM versus  $0.219 \pm 0.012$  nM) e non è stata osservata alcuna correlazione con i livelli di T<sub>3</sub> e T<sub>4</sub>.

Diverse ragioni potrebbero spiegare la differenza fra questi risultati:

1. è possibile che l'estrazione effettuata con la nostra tecnica sia incompleta, e pertanto che i nostri risultati sottostimino la quantità totale di T<sub>1</sub>AM presente nel siero;
2. d'altro lato un aspetto critico delle metodiche immunologiche è la specificità dell'anticorpo; mentre l'anticorpo non ha mostrato affinità per le tironine o le

altre tironamine, resta da valutare se esso reagisca con derivati della T<sub>1</sub>AM quali la forma solfatata o acetilata o glucuronata [47];

3. è stato recentemente dimostrato che la T<sub>1</sub>AM si lega con elevata affinità alla apolipoproteina B-100 [48], presente fisiologicamente nel plasma umano; dato che la metodica immunologica si basa su un test di competizione ed è stata calibrata con sistemi poveri di lipoproteine, la presenza di ApoB-100 nei campioni testati produce probabilmente una sovrastima dei livelli di T<sub>1</sub>AM endogena.

### **3.4 Applicazione a studi sulla sintesi endogena di T<sub>1</sub>AM**

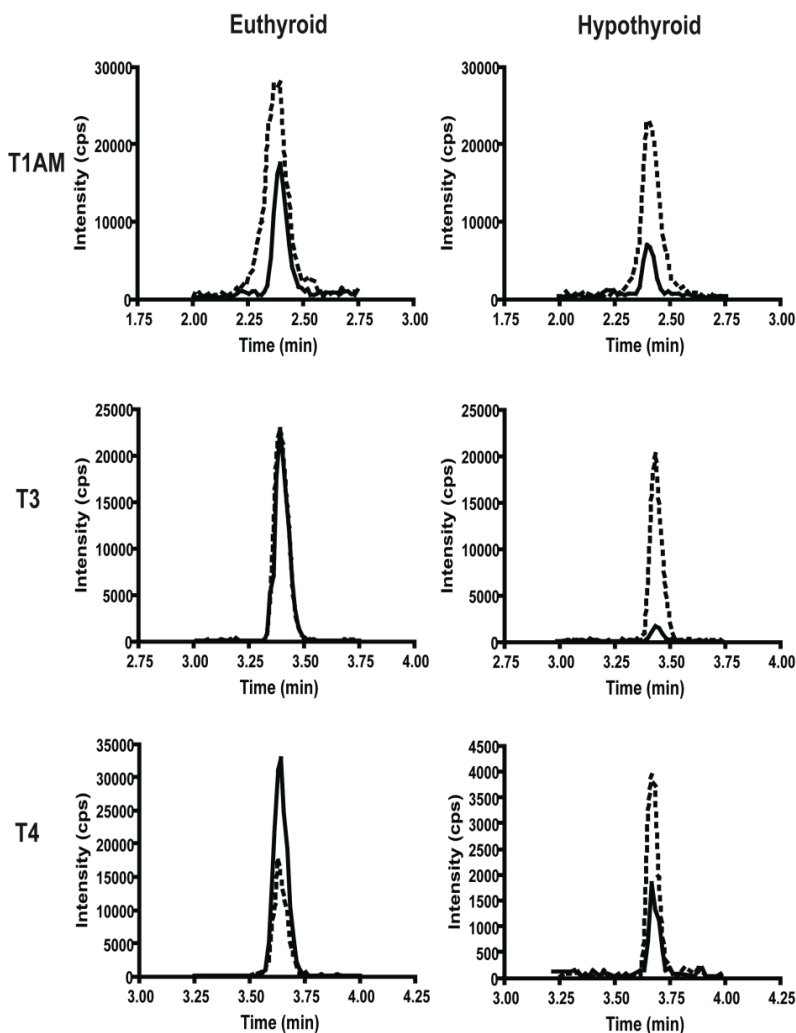
In collaborazione con il gruppo di ricerca diretto dal Prof. Thomas S. Scanlan sono stati effettuati dosaggi su siero e organi di topo al fine di verificare l'ipotesi che la T<sub>1</sub>AM sia un metabolita della T<sub>4</sub>. A tale scopo è stato sintetizzato un isotopo non radioattivo della T<sub>4</sub>, <sup>13</sup>C<sub>9</sub>-<sup>15</sup>N-T<sub>4</sub> ("heavy-T<sub>4</sub>", H-T<sub>4</sub>) [49]. Questa molecola rispetto alla tiroxina endogena e alla T<sub>4</sub> marcata usata come standard interno ha 10 u.m.a. e 3 u.m.a. in più, consentendo di distinguere H-T<sub>4</sub> e i suoi metaboliti dai composti endogeni e dagli standard mediante analisi in spettrometria di massa.

Lo studio è stato condotto su 4 gruppi di topi (maschi C57BI/6I, età 6-8 settimane): un gruppo di controllo e tre gruppi ai quali è stato indotto ipotiroidismo mediante trattamento con mercaptoimidazolo 0,1% (MMI) e perclorato di potassio 0,2% (KClO<sub>4</sub>) somministrati mediante l'acqua. Dopo due settimane di tale trattamento, due dei gruppi ipotiroidei sono stati trattati rispettivamente con T<sub>4</sub> (100ng/g/die) e H-T<sub>4</sub> (200ng/g/die) per 3 settimane, mantenendo il trattamento con MMI e KClO<sub>4</sub> per inibire la sintesi endogena degli ormoni tiroidei. Al termine delle tre settimane, tempo necessario affinché si ristabiliscano i normali

livelli serici degli ormoni a seguito della somministrazione di T4 e H-T4, tutti gli esemplari dei 4 gruppi sono stati sacrificati e sono stati raccolti siero ed organi (cuore, cervello, fegato e reni), che sono stati conservati a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Dato che le maggiori concentrazioni di T<sub>1</sub>AM endogeno sono state rilevate nel fegato, l'attenzione è stata focalizzata su questo organo. Come atteso, i livelli di T4, T3 e T<sub>1</sub>AM sono fortemente diminuiti dopo l'induzione dell'ipotiroidismo (fig. 30).

Figura 30. Cromatogrammi LC-MS-MS relativi a T<sub>1</sub>AM (m/z 356→339), T3 (m/z 652→606) e T4, (m/z 778→732) in omogenato di fegato di topi eutiroidei (sinistra) ed ipotiroidici (destra).

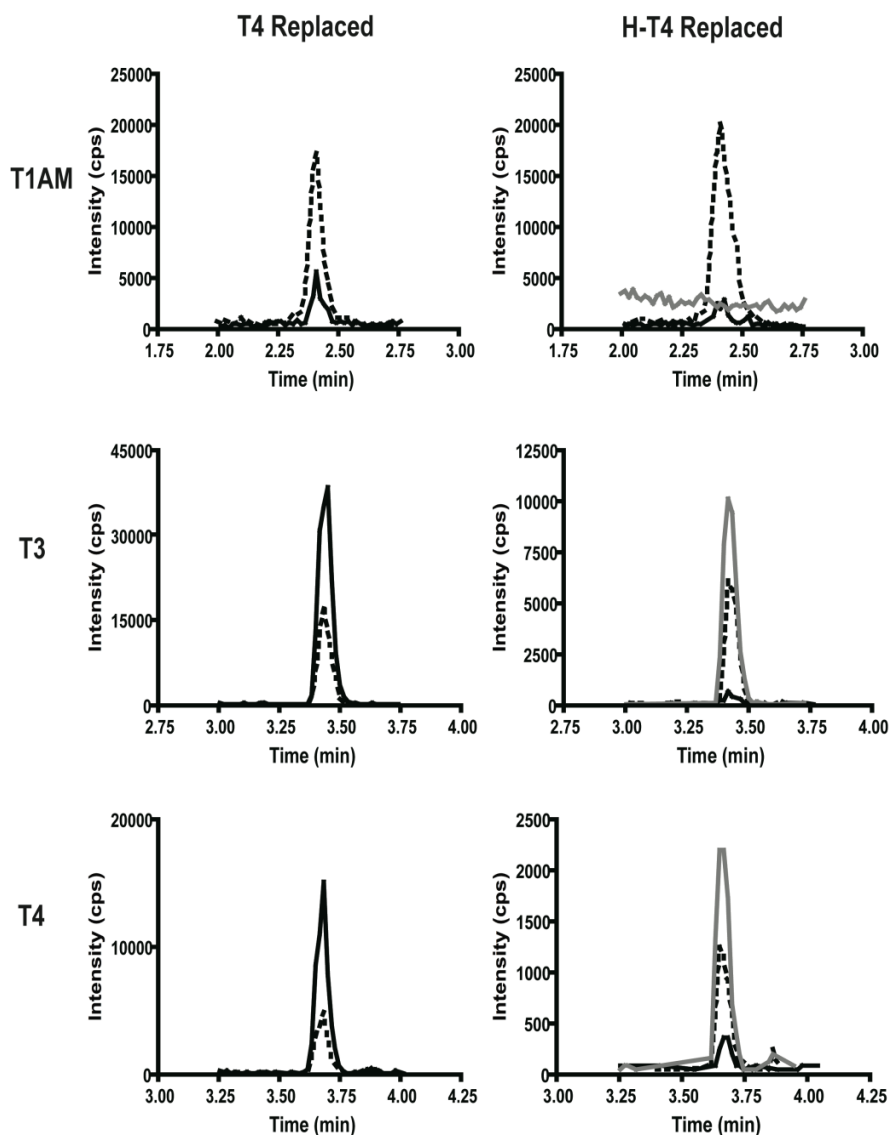


Linea continua, analita endogeno; linea tratteggiata, standard interno ( $\text{d}_4\text{-T}_1\text{AM}$ , m/z 360→343;  $^{13}\text{C}_6\text{-T}_3$ , m/z 658→612;  $^{13}\text{C}_6\text{-T}_4$ , 784→738).



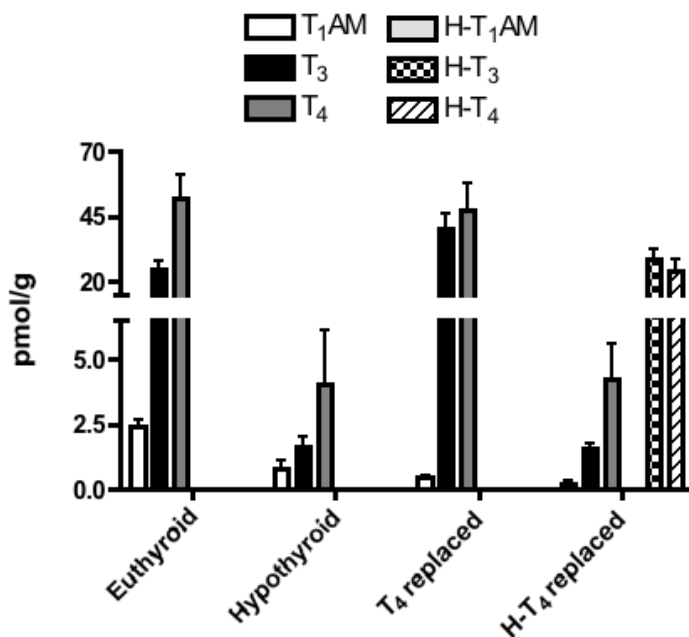
Come mostrato in figura 31 e 32, la somministrazione di T4 ristabilisce i livelli serici di T4 e comporta un aumento di T3 rispetto ai valori eutiroidei, ma non induce nessun effetto sui livelli di T<sub>1</sub>AM che rimangono pressoché invariati rispetto a quelli riscontrati nei topi ai quali è stato indotto l'ipotiroidismo. Il trattamento con H-T4 comporta il rilevamento di H-T4 e H-T3 a livelli fisiologici, mentre nei topi a cui è stato somministrato l'ormone marcato non vengono ristabiliti i normali livelli di T<sub>1</sub>AM, né viene rilevato H-T<sub>1</sub>AM.

Figura 31. Cromatogrammi LC-MS-MS relativi a T<sub>1</sub>AM (m/z 356→339), T3 (m/z 652→606) e T4, (m/z 778→732) in omogenato di fegato di topi ipotiroidici a cui è stata somministrata T4 (sinistra) e H-T4 (destra).



Linea continua, analita endogeno; linea tratteggiata, standard interno ( $d_4$ -T<sub>1</sub>AM, m/z 360→343;  $^{13}C_6$ -T3, m/z 658→612;  $^{13}C_6$ -T4, 784→738); linea grigia, metaboliti derivanti da H-T4 (H-T<sub>1</sub>AM, m/z 365→347; H-T3, m/z 662→615; T4, m/z 788→741).

Figure 32. Livelli nel fegato di T<sub>4</sub>, T<sub>3</sub>, T<sub>1</sub>AM e H-T<sub>4</sub>, H-T<sub>3</sub> and H-T<sub>1</sub>AM in topi eutiroidi, ipotiroidi ed ipotiroidi trattati con T<sub>4</sub> o H-T<sub>4</sub>.



Questi risultati mostrano che la concentrazione endogena T<sub>1</sub>AM nel fegato diminuisce significativamente in topi ipotiroidi rispetto agli eutiroidi, confermando la necessità di una ghiandola tiroidea funzionante per la normale sintesi di T<sub>1</sub>AM. Tuttavia, il trattamento dei topi ipotiroidi con H-T<sub>4</sub> non genera livelli rilevabili di H-T<sub>1</sub>AM.

Nel complesso, questi risultati indicano che la biosintesi T<sub>1</sub>AM può essere inibita dai farmaci antitiroidei MMI e KClO<sub>4</sub>, che hanno come bersaglio la ghiandola tiroidea inibendo la TPO e il NIS rispettivamente [50, 51], ma non sembra possibile ottenere T<sub>1</sub>AM in vivo attraverso la deiodinazione e la decarbossilazione extratiroidea di T<sub>4</sub>.

Ne consegue che, come la T<sub>4</sub>, la T<sub>1</sub>AM o è un prodotto diretto della tiroide, o un prodotto di un'altra popolazione di cellule che esprime NIS e TPO o loro omologhi.

### 3.5 Applicazione a studi comportamentali

In collaborazione con il gruppo di ricerca della Prof. Raimondi presso l'Università di Firenze, sono stati dosati i livelli di T<sub>1</sub>AM nel siero e nel cervello di topi a cui la tironamina è stata somministrata mediante iniezione intracerebroventricolare (i.c.v.). L'iniezione era effettuata lentamente (20 sec) in un ventricolo laterale, utilizzando un volume totale di 10 µL. L'efficacia della tecnica è stata confermata iniettando allo stesso modo un colorante e verificando poi con l'esame macroscopico del cervello che il 95% delle iniezioni fossero corrette. Lo scopo dello studio era valutare gli effetti sull'assunzione di cibo, sulla glicemia, sui livelli di T3 libero [52], sulle capacità mnestiche e sulla soglia del dolore [53]. È stato inoltre verificato se la risposta sia modificata dopo trattamento con clorgilina, un inibitore delle monoamino ossidasi, che è stata somministrata per via endovenosa alla dose di 2.5 mg/Kg di peso 30 minuti prima dell'iniezione di T<sub>1</sub>AM.

In esperimenti paralleli alcuni animali sono stati sacrificati mediante decapitazione 30 minuti dopo l'iniezione di T<sub>1</sub>AM o del veicolo (DMSO). Il cervello è stato isolato e congelato a -80°C. T<sub>1</sub>AM, T4 e T3 sono stati estratti e i loro livelli misurati mediante la metodica precedentemente descritta (dati mostrati in tabella 9). Si è confermato che la T<sub>1</sub>AM è un composto endogeno, in quanto la concentrazione cerebrale media risultava  $0.39 \pm 0.10$  pmol/g. Questo valore è inferiore a quanto precedentemente osservato nel ratto. La differenza può essere ascritta sia alla diversa specie animale impiegata, sia al fatto che in questo caso è stato omogenato l'encefalo *in toto*, senza selezionare specifiche aree cerebrali. È interessante osservare che la somministrazione di T<sub>1</sub>AM esogeno ha prodotto un aumento dei livelli encefalici circa 33 volte. Si tratta quindi di un aumento di poco superiore ad un ordine di grandezza, che non è associato a variazioni significative della concentrazione di T3 e T4.

Tabella 9. Livelli degli ormoni tiroidei e di T<sub>1</sub>AM nel cervello di topi trattati con 1.32 µg/kg di T<sub>1</sub>AM.

Trattamento	T <sub>1</sub> AM (pmol/g)	T3 (ng/g)	T4 (ng/g)
<i>Veicolo</i>	0.390 ± 0.102	2.28 ± 0.80	3.32 ± 1.60
<i>T<sub>1</sub>AM (231 pmol/g di cervello)*</i>	13.10 ± 0.10	2.31 ± 0.12	2.60 ± 0.35

\* Calcolato considerando il peso medio del cervello pari a 0.432 ± 0.05 g. Valori espressi come media ± SEM di sei campioni per gruppo

Va rilevato che dopo somministrazione di T<sub>1</sub>AM mediante iniezione i.c.v. è stato osservato un aumento della concentrazione del composto nel sangue, suggerendo un passaggio dal sistema nervoso centrale alla circolazione sistemica. Come mostrato nella tabella 10, la percentuale di T<sub>1</sub>AM presente nel plasma era circa lo 0,2% della quantità iniettata ad entrambi i dosaggi utilizzati (1.3 e 20 mg/kg rispettivamente).

Tabella 10. Livelli di T<sub>1</sub>AM nel sangue.

T <sub>1</sub> AM (µg/kg)	pmol/mL	pmol	%
–	ND		
1.3	0.19	0.28	0.215
20	1.5	2.25	0.15
clorgilina	0.05	0.082	0.082
1.3 + clorgilina	0.35	0.52	0.52
20 + clorgilina	57.05	85.58	5.7

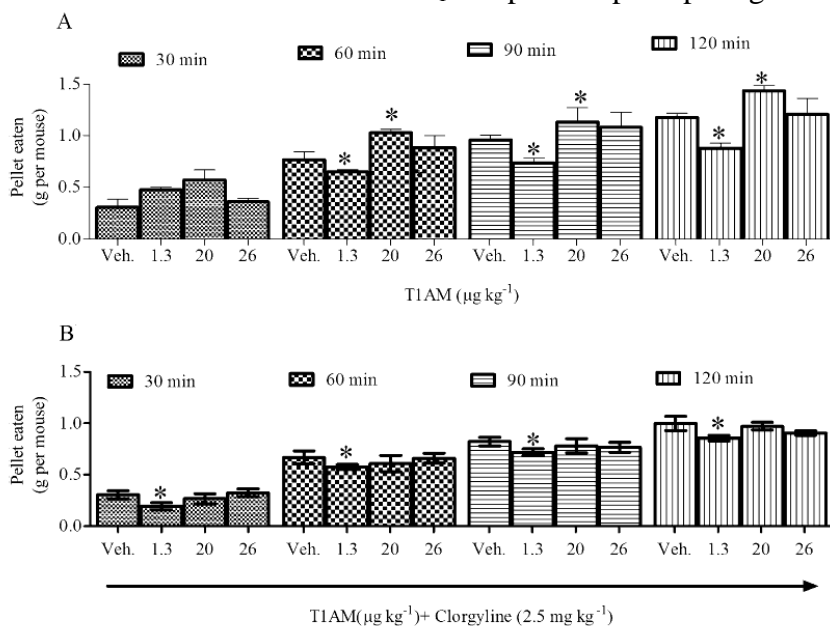
La dose di clorgilina impiegata è pari a 2.5 mg/kg. La resa percentuale del recupero di T<sub>1</sub>AM è stata calcolata considerando un volume di sangue di 1.5 mL. ND = non determinabile. Da notare che in questi esperimenti il dosaggio è stato effettuato sul plasma, anziché sul siero, e ciò determina una riduzione della sensibilità della metodica.

Nei topi in cui sono state inibite le monoamino ossidasi MAO mediante iniezione con clorgilina, la concentrazione plasmatica di T<sub>1</sub>AM è risultata notevolmente più alta. Infatti nel caso in cui siano stati somministrati 1.3 mg/kg di T<sub>1</sub>AM, i livelli ematici aumentavano di circa due volte, mentre nel caso della dose di 20 mg/kg, si rilevava un aumento di circa 40 volte. Questi risultati suggeriscono che solo una piccola quantità di T<sub>1</sub>AM iniettata può

raggiungere la periferia e che il meccanismo responsabile per il suo trasporto nel sangue non è una semplice diffusione, ma piuttosto un meccanismo di trasporto mediato.

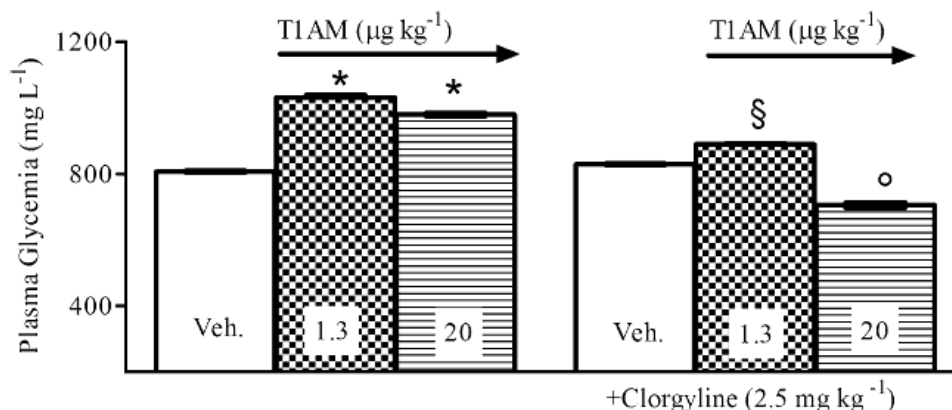
Nella prima serie di esperimenti, topi mantenuti a digiuno sono stati trattati con dosi crescenti di T<sub>1</sub>AM (1.3, 6.5, 13, 20 e 20 mg/kg), che hanno prodotto effetti opposti sulla alimentazione. In particolare, dopo 120 min, la quantità totale di cibo ingerito da topi trattati con 1.3 e 20 mg/kg di T<sub>1</sub>AM era significativamente più bassa ( $2.74 \pm 0.084$  g per topo) e più alta ( $3.83 \pm 0.02$  g per topo) rispettivamente, rispetto al valore di controllo ( $3.29 \pm 0.08$  g per topo). L'effetto di ipofagia indotto da 1.3 mg/kg di T<sub>1</sub>AM si verifica essenzialmente entro i primi 30 minuti dopo l'iniezione (fig.33). È stato inoltre osservato che in animali pre-trattati con clorgilina l'azione iperfagica scompare.

Figure 33. La somministrazione i.c.v. di T<sub>1</sub>AM porta a ipo e iperfagia.



Nonostante gli effetti opposti verificatisi nel caso dell'alimentazione, il trattamento dei topi a digiuno con 1.3 e 20 mg/kg di T<sub>1</sub>AM induceva rapidamente (entro 15 min) in entrambi i casi iperglicemia (fig. 34), che persisteva fino a 60 minuti dopo l'iniezione. Il pre-trattamento con clorgilina (2.5 mg/kg) inibiva la risposta iperglicemica indotta dalla T<sub>1</sub>AM ed entrambe le dosi di T<sub>1</sub>AM diventavano inefficaci.

Figure 34. La somministrazione i.c.v. di T<sub>1</sub>AM aumenta i livelli del glucosio nel sangue.



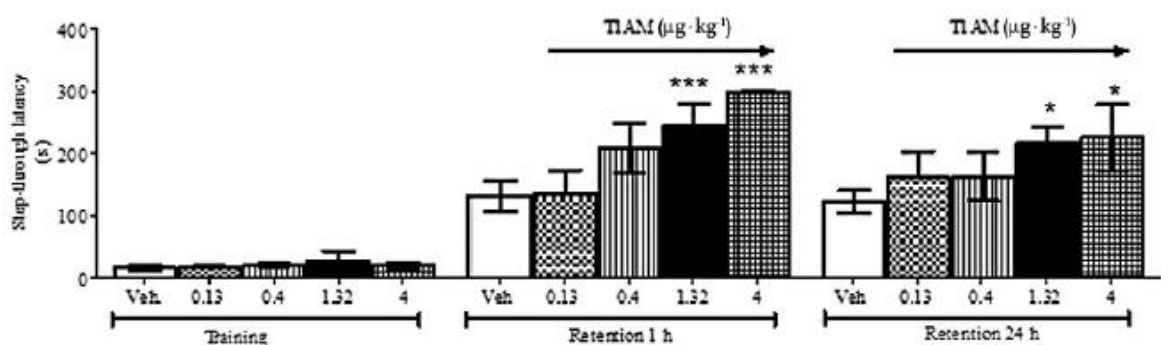
Successivamente è stato verificato se le dosi di T<sub>1</sub>AM che hanno indotto effetti sull'assunzione del cibo e sulla omeostasi del glucosio fossero in grado di modificare i livelli plasmatici di T<sub>3</sub>. A seguito dell'iniezione di T<sub>1</sub>AM 1.3 mg/kg, la concentrazione plasmatica di fT<sub>3</sub> si riduceva significativamente da 2.34±0.09 nei topi del gruppo di controllo a 1.82±0.11 pmol/L, mentre non è stata osservata nessuna variazione in seguito al trattamento con T<sub>1</sub>AM 20 mg/kg (2.37±0.20 pmol/L). La variazione dei livelli di fT<sub>3</sub> non è stata rilevata nei topi pre-trattati con clorgilina.

In altri esperimenti sono stati valutati gli effetti della T<sub>1</sub>AM sulla memoria, sulla curiosità e sulla soglia del dolore utilizzando tre test comportamentali: evitamento passivo, riconoscimento di nuovi oggetti e *hot plate* (piastra riscaldante).

I modelli di evitamento sono ampiamente utilizzati per studiare l'acquisizione, la ritenzione e l'estinzione delle risposte condizionate. Nell'evitamento passivo l'animale impara a non rispondere allo stimolo per evitare la punizione. Le tecniche di evitamento passivo sono largamente utilizzate per misurare alterazioni della memoria e dell'apprendimento in seguito a somministrazione di farmaci, a lesioni neurologiche, o a manipolazioni comportamentali. Gli esperimenti sono stati eseguiti secondo il metodo descritto da Jarvik e Kopp (1967). L'apparato sperimentale è costituito da un box a due vani,

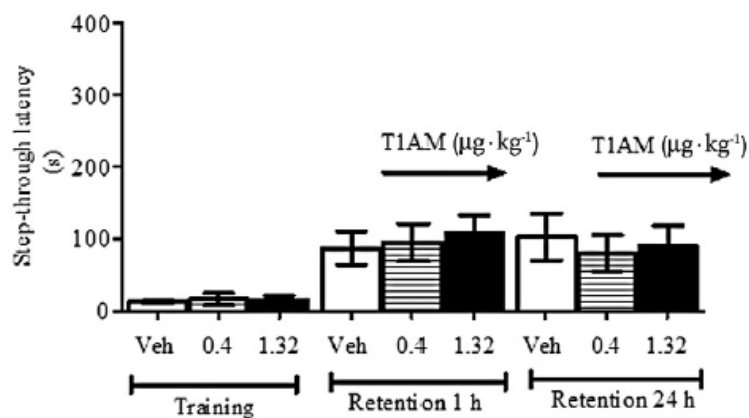
uno illuminato ed uno buio, collegati fra loro da una porta a ghigliottina. Il vano buio è dotato di un pavimento a trappola: quando i topi entrano in questa camera nella sessione di addestramento ricevono una punizione non dolorosa che consiste nel cadere da 40 cm in un bagno di acqua fredda (10°C). La prova è stata poi ripetuta 1 h e 24 h dopo l'addestramento. Prima delle prove, i topi sono stati rimossi dalla gabbia e sono stati sottoposti ad iniezione i.c.v. di 10 µL di veicolo o di T<sub>1</sub>AM (0.13, 0.40, 1.32 e 4 mg/kg, n = 20 per ogni trattamento). Altri topi sono stati pretrattati con un'iniezione ip di clorgilina (2.5 mg/kg). Trenta minuti dopo le iniezioni i.c.v., i topi sono stati posti nel vano illuminato e lasciati liberi di entrare penetrare nel compartimento buio (sessione di formazione). Poiché i topi preferiscono il buio alla luce, di solito entrano nel compartimento buio entro 5 s. I topi che non entravano nel compartimento buio entro 60 s durante la sessione di addestramento sono stati esclusi dalla sperimentazione. La latenza è stata misurata di nuovo 1 e 24 h dopo la sessione di addestramento e l'apprendimento è indicato da un aumento del tempo di latenza rispetto alla sessione di formazione. Dopo la somministrazione di 0.13 e 0.4 mg/kg di T<sub>1</sub>AM, la latenza a entrare nel compartimento buio è aumentata in entrambe le sessioni (fig. 35), ma la differenza rispetto al gruppo di controllo non ha raggiunto la soglia di significatività statistica. Un effetto significativo è stato invece osservato, sia ad 1 ora che a 24 ore, dopo la somministrazione di dosi pari a 1.32 e 4 mg/kg.

Figura 35. Risultati del test di evitamento passivo condotto su topi a quali è stata iniettata i.c.v. T<sub>1</sub>AM (0.13, 0.4, 1.32 o 4 mg/kg) (controlli Veh).



Tale effetto è notevolmente ridotto se i topi sono trattati preventivamente con clorgilina (fig. 36).

Figura 36. Risultati del test di evitamento passivo condotto su topi sottoposti a pre-trattamento con clorgilina (controlli Veh).



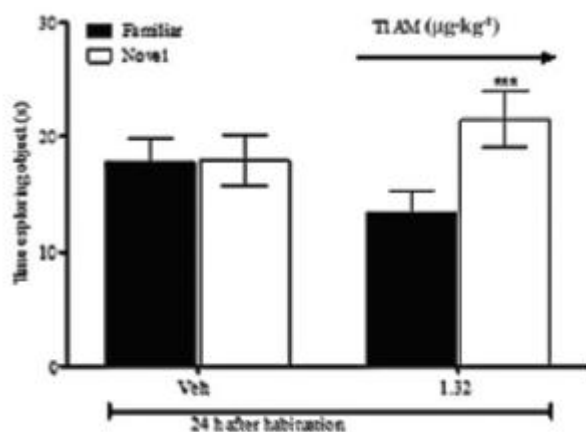
Poiché 1.32 mg/kg era la dose efficace più bassa nel test di evitamento passivo, è stato verificato se l'effetto pro-cognitivo di questo dosaggio fosse confermato nel test di riconoscimento di nuovi oggetti, che si basa sulla tendenza naturale dei roditori a esplorare oggetti non familiari. Gli esperimenti sono stati condotti come descritto da Ennaceur e Delacour (1988), con piccole modifiche. Per ogni topo la sessione era costituita da tre prove successive. Nella prova 1 (assuefazione), 24 ore prima del giorno del test il topo è stato posto al centro di una camera vuota in condizioni di suono attenuato e di luce soffusa per 2 min. Il giorno seguente, al topo è stata iniettata T<sub>1</sub>AM 30 minuti prima della seconda prova (familiarizzazione). Durante questa prova, due oggetti (ad esempio cubi di plastica o cilindri) sono stati posti in angoli opposti del box ed è stato permesso al topo di esplorarli. Dopo 24 h, ogni topo è stato nuovamente posto nel campo di prova per 5 min (prova 3) in presenza di uno degli oggetti familiari e di un oggetto nuovo, ed è stato registrato il tempo trascorso ad esplorare entrambi gli oggetti. Posizione degli oggetti e ordine di presentazione sono stati randomizzati. Ogni processo è durato 5 minuti, con un intervallo di 3 minuti inter-prova (ITI). Durante l'ITI, il topo è stato rimosso dal box dove sono stati svolti i test e posto in una gabbia.



L'esplorazione è stata definita come lo stato in cui il topo ha mantenuto il naso a 2 cm di distanza dall'oggetto. L'attività locomotoria all'interno del box è stata misurata come i tempi di attraversamento della griglia.

Come mostrato in figura 37, i topi del gruppo di controllo impiegavano la stessa quantità di tempo ad esplorare sia un oggetto conosciuto che uno nuovo, mentre nei topi trattati con T<sub>1</sub>AM il tempo speso ad esplorare l'oggetto nuovo era significativamente aumentato.

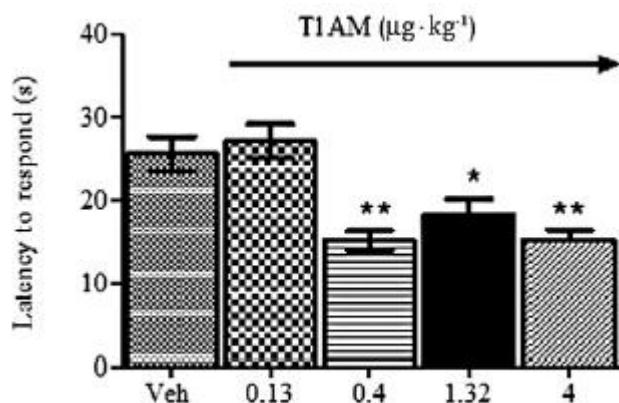
Figura 37. Risultati del test di riconoscimento di nuovi oggetti (controlli Veh).



Poiché la risposta del test di evitamento passivo e al test di riconoscimento degli oggetti può essere influenzata da una azione analgesica, è stato verificato se la T<sub>1</sub>AM avesse effetti sulla soglia del dolore indagando la latenza di una risposta (ritrarsi o saltare) di topi posti su una piastra riscaldata a  $51.5 \pm 1^\circ\text{C}$ , per un tempo massimo di 45 secondi.

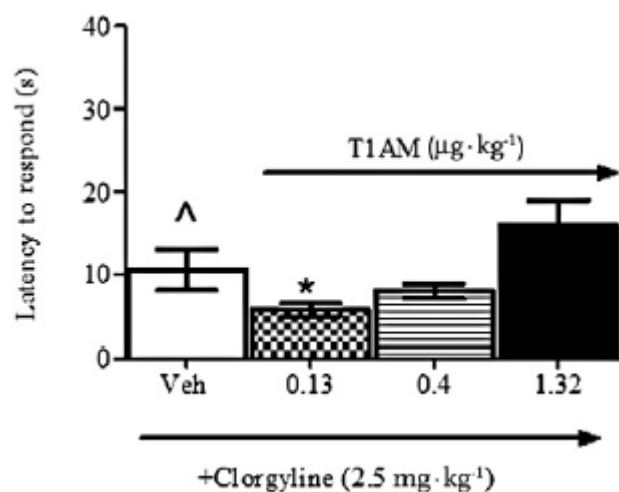
Come mostrato in figura 38, a dosi che si erano rivelate efficaci nel test di evitamento passivo (1,32 e 4 mg/kg), la T<sub>1</sub>AM riduceva significativamente la soglia della percezione del dolore. È interessante notare che l'effetto iperalgesico della T<sub>1</sub>AM era mantenuto alla dose 0.4 mg/kg, ma veniva perso a 0.132 mg/kg.

Figura 38. Risultati del test sull'azione analgesica della T<sub>1</sub>AM (controlli Veh).



In presenza di clorgilina la T<sub>1</sub>AM produceva ancora un'azione iperalgesica, ma la relazione dose-risposta risultava modificata: un effetto significativo si manifestava con la dose di 0.134 mg/kg, ma non con dosi più elevate (fig. 39).

Figura 39. Risultati del test sulla soglia del dolore in topi pretrattati con clorgilina (controlli Veh).



Nel complesso questi risultati dimostrano che la T<sub>1</sub>AM produce importanti effetti comportamentali a dosi che determinano un aumento della concentrazione cerebrale di circa un ordine di grandezza. E' quindi verosimile che queste azioni possano avere un significato fisiologico, in relazione alla regolazione dell'assunzione di cibo, ai processi di apprendimento ed alla percezione del dolore. Ulteriori esperimenti saranno necessari per accertare i correlati

elettrofisiologici di queste risposte, ed in particolare la loro relazione con una eventuale azione di neuromodulatore che è stata proposta per la T<sub>1</sub>AM.

La modulazione della glicemia e dei livelli di FT3 conferma precedenti osservazioni sulle azioni endocrine di T<sub>1</sub>AM somministrata per via i.c.v., che sono stati ascritti alla stimolazione della secrezione di glucagone [7]. L'elemento innovativo consiste nell'osservazione che gli effetti si manifestano anche con dosaggi sensibilmente inferiori a quelli utilizzati in precedenza [7].

Tutti questi effetti centrali sono influenzati in modo rilevante dalla somministrazione di clorgilina. L'interpretazione della risposta alla clorgilina non è semplice. L'inibizione delle monoamino ossidasi ostacola il catabolismo ossidativo di numerose amine biogene, inclusa la stessa T<sub>1</sub>AM. E' quindi possibile che alcuni effetti rilevati siano esercitati da cataboliti della T<sub>1</sub>AM, quali ad esempio l'acido 3-iodotiroacetico. Un'altra spiegazione è che la risposta alla T<sub>1</sub>AM sia influenzata dall'attività di altri sistemi aminergici, ed in particolare dai sistemi adrenergici.

## 4. CONCLUSIONI

Questo lavoro di tesi ha consentito di sviluppare e validare una nuova metodica per il dosaggio di T<sub>1</sub>AM e altre tironamine mediante spettrometria di massa associata ad HPLC. La metodica si è rivelata più sensibile delle tecniche già descritte in letterature e consente anche la determinazione contemporanea degli ormoni tiroidei e dei cataboliti di T<sub>1</sub>AM. Tale metodica è stata quindi applicata a diversi modelli animali e a campioni di sangue umano, con i seguenti risultati:

1) La T<sub>1</sub>AM è un composto endogeno a distribuzione ubiquitaria. In animali da esperimento le concentrazioni sieriche sono dell'ordine di 0.1 - 0.3 nM, e le concentrazioni tissutali risultano significativamente maggiori, suggerendo che la T<sub>1</sub>AM venga attivamente accumulata nei tessuti e/o si leghi a strutture intracellulari. In particolare i livelli tissutali variano da 1 a 90 pmol/g, con un massimo nel fegato, nel cervello e nel rene.

2) Nel ratto la produzione di T<sub>1</sub>AM richiede la presenza di una ghiandola tiroidea normofunzionante, in quanto è inibita da metimazolo e perclorato. Non si è osservata invece la conversione di tiroxina esogena in T<sub>1</sub>AM. Il catabolismo di T<sub>1</sub>AM comprende la deaminazione ossidativa ad acido 3-iodotiroacetico o la deiodinazione a tironamina. La prima via appare preponderante in tutti i tessuti valutati.

3) La T<sub>1</sub>AM è riscontrabile nel sangue umano. La sua concentrazione media è dell'ordine di 0.2 nM ed è significativamente correlata a quella degli ormoni tiroidei. Si osserva inoltre una correlazione significativa con l'emoglobina glicosilata ed un aumento significativo in un sottogruppo di pazienti diabetici. Dato che la somministrazione di T<sub>1</sub>AM in modelli animali induce insulino-resistenza, questi risultati incoraggiano a valutare l'eventuale ruolo patogenetico della T<sub>1</sub>AM nella insulino-resistenza e nel diabete mellito.

4) Esperimenti condotti con la somministrazione intracerebrale di T<sub>1</sub>AM nel topo mostrano significativi effetti comportamentali. Si produce un effetto bifasico sull'assunzione di cibo (azione anoressica a basso dosaggio ed azione oressigenica a concentrazioni maggiori), un effetto positivo sull'apprendimento e la ritenzione della memoria, una riduzione della soglia al dolore. Tali effetti sono presenti anche con dosaggi che producono un aumento della concentrazione tissutale di circa un ordine di grandezza, rispetto ai livelli basali. E' possibile quindi che le azioni neurologiche di T<sub>1</sub>AM rivestano un ruolo fisiologico.

## 5. BIBLIOGRAFIA

- [1] Tomita K & Lardy HA, 1956 *Synthesis and biological activity of some triiodinated analogues of thyroxine*. J. Biol. Chem. **219**: 595-604
- [2] Scanlan TS et al., 2004 *3-Iodothyronamine is an endogenous and rapid-acting derivate of thyroid hormone*. Nat. Med. **10**:638-642
- [3] Chiellini G et al., 2007 *Cardiac effects of 3-iodothyronamine: a new aminergic system modulating cardiac function*. FASEB J. **21**:1597-1608
- [4] Braulke LJ et al., 2008 *3-Iodothyronamine: a novel hormone controlling the balance between glucose and lipid utilisation*. J. Comp. Physiol. **178**:167-177
- [5] Zucchi R et al., 2006 *Trace amine-associated receptors and their ligands*. Br. J. Pharmacol. **149**:967-978
- [6] Regard JB et al., 2007 *Probing cell type-specific functions of Gi in vivo identifies GPCR regulators of insulin secretion*. J. Clin. Invest. **117**:4034-4043
- [7] Klieverik LP et al., 2009 *Central effects of thyronamines on glucose metabolism in rats*. J. Endocrinol. **201**:377-386
- [8] “Thyroid function”, Cap 42 in Tietz Textbook of Clinical Chemistry, Third Ed., Carl A. Burtis and Edward R. Ashwood, eds. Philadelphia, PA: WB Saunders, 1999
- [9] “Thyroid Hormones”, Cap. 6 in Hormones, Second Ed., Academic Press, London, 1997
- [10] Hiroi Y et al., 2006 *Rapid nongenomic actions of thyroid hormone*. PNAS **103**:14104-14109
- [11] Moreno M et al., 2008 *Metabolic effects of thyroid hormone derivates*. Thyroid **18**:239-253

- [12] Sabatino L & Iervasi G, 2010 *Caratteristiche generali degli ormoni tiroidei: dalla sintesi all'azione sulle cellule bersaglio*. *LigandAssay* **15**, 111-118
- [13] Yamauchi M et al., 2008 *Thyroid hormone activates adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase via intracellular calcium mobilization and activation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta*. *Mol. Endocrinol.* **22**:893-903
- [14] Davis PJ et al., 2008 *Mechanisms of nongenomic actions of thyroid hormone*. *Front. Neuroendocrinol.* **29**:211-218
- [15] Wu SY et al, 2005 *Alternative pathways of thyroid hormone metabolism*. *Thyroid* **15**:945-958
- [16] Zhu MY et al, 1995 *Aromatic L-amino acid decarboxylase: biological characterization and functional role*. *Gen. Pharmacol.* **26**:681-696
- [17] Hoefig CS et al., 2012 *Does the aromatic L-amino acid decarboxylase contribute to thyronamine biosynthesis?*. *Mol. Cell. Endocrinol.* **349**:195-201
- [18] Piehl S et al., 2008 *Thyronamines are isozyme-specific substrates of deiodinases*. *Endocrinology* **149**:3037-3045
- [19] Kohrle J, 2002 *Iodothyronine deiodinase*. *Methods Enzimol.* **347**:125-167
- [20] Huang SA, 2005 *Physiology and pathophysiology of type 3 deiodinase in humans*. *Thyroid* **15**: 875-881
- [21] Silverman RB, 1995 *Radical Ideas about Monoamine Oxidase*. *Acc. Chem. Res.* **28**:335-342
- [22] Magyar K & Mészáros Z, 2003 *Semicarbazide-sensitive amine oxidase (SSAO): present and future*. *Inflammopharmacology* **11**, 165-173
- [23] Beedham C et al., 1995 *Role of aldehyde oxidase in biogenic amine metabolism*. *Prog. Brain Res.*, **106**:345-353

- [24] Wood WJL et al., 2009 *Iodothyronamines are Oxidatively Deaminated to Iodothyroacetic Acids in vivo*. ChemBioChem, **10**:361-365
- [25] Pietsch CA et al., 2007 *Thyronamines are substrates for human liver sulfotransferases*. Endocrinology; **148**:1921-1927
- [26] Meyer T & Hesch R-D, 1983 *Triiodothyronamine: a badrenergic metabolite of triiodothyronine?* Horm. Metab. Res. **15**:602-606
- [27] Zucchi R et al., *Cardiac functional effects of 3-Iodothyronamine, a new endogenous compound thyroid hormone derivative*. Cap. 6 in Thyroid and Heart failure, Springer-Verlag, Milano, 2009
- [28] Grandy DK, 2007 *Trace amine associated receptor*. Pharmacol. Ther. **116**:355-390
- [29] Lindemann L et al., 2005 *Trace amine-associated receptors form structurally and functionally distinct subfamilies of novel G protein-coupled receptors*. Genomics, **85**:372-385
- [30] Borowsky B et al., 2001 *Trace amines: identification of a family of mammalian G protein-coupled receptors*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA; **98**:8966-8971
- [31] Ianculescu AG et al., 2009 *Identification and characterization of 3-iodothyronamine intracellular transport*. Endocrinology **150**: 1991-1999
- [32] Miyakawa M, Scanlan TS, 2006 *Synthesis of [<sup>125</sup>I]-, [<sup>2</sup>H]-, and [<sup>3</sup>H]-labeled 3-iodothyronamine (T<sub>1</sub>AM)*. Synth. Commun. **36**: 891-90
- [33] Cody V et al., 1984 *Molecular structure and biochemical activity of 3,5,3'-triiodothyronamine*. Endocrine Res. **10**:91-99
- [34] Snead AN et al., 2007 *Thyronamines inhibit plasma membrane and vesicular monoamine transport*. ACS Chem. Biol. **2**:390–398



- [35] Frascarelli S et al., 2008 *Cardiac effects of trace amines: pharmacological characterization of trace amine-associated receptors*. Eur. J. Pharmacol. **587**:231-236
- [36] Bunzow JR et al., 2001 *Amphetamine, 3,4-methylenedioxymethamphetamine, lysergic Acid diethylamide, and metabolites of the catecholamine neurotransmitters are agonists of a rat trace amine receptor*. Mol. Pharmacol. **60**:1181-1188
- [37] Buu-Hoi NP et al., 1969 *Thyronamine, a new substance with long-acting positive inotropic effect*. Pharmacology **2**:281-287
- [38] Boissier IR et al., 1973 *Differential inotropic-chronotropic action of thyronamine*. Eur. J Pharmacol. **22**:141-149
- [39] Felt V, Ploc I, 1982 *Effect of theophylline on binding of triiodothyronine, thyroxine, thyroxamine, tetraiodothyroaceticacid and cortisol in the cytosol of human leukocytes*. Endokrinologie **79**:315-317
- [40] Doyle KP et al., 2007 *Novel thyroxine derivatives, thyronamine and 3-iodothyronamine, induce transient hypothermia and marked neuroprotection against stroke injury*. Stroke **38**:2569–2576
- [41] Skoog D, Leary J, Chimica Analitica Strumentale, ed. Edises, 2000, 974-976
- [42] Tai S S.-C. et al., 2004 *Development and Evaluation of a Reference Measurement Procedure for the Determination of Total 3,3',5-Triiodothyronine in Human Serum Using Isotope-Dilution Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry*. Anal. Chem. **76**:5092-5096
- [43] Saba A et al., 2010 *Tissue Distribution and Cardiac Metabolism of 3-Iodothyronamine*. Endocrinology **151**: 5063-5073

- [44] Smith JE et al., 2008 *Chronic binge-like moderate ethanol drinking in rats results in widespread decreases in brain serotonin, dopamine, and norepinephrine turnover rates reversed by ethanol intake*. J. Neurochem. **105**:2134–2155C
- [45] Galli E et al., 2012 *Detection of 3-iodothyronamine in humane patients: a preliminary study*. J. Clin. Endocrinol. Metab. **97**: E69-74
- [46] Hoefig CS et al., 2011 *Evidence for extrathyroidal formation of 3-iodothyronamine in humans as provided by a novel monoclonal antibody-based chemiluminescent serum immunoassay*. J. Clin. Endocrinol. Metab. **96**:1864-1872
- [47] Scanlan TS, 2011 *Endogenous 3-iodothyronamine (TIAM): more than we bargained for*. J. Clin. Endocrinol. Metab. **96**:1674–1676
- [48] Roy G, 2012 *ApoB-100-containing lipoproteins are major carriers of 3-iodothyronamine in circulation*. J. Biol. Chem. **287**:1790-1800
- [49] Hackenmueller SA et al., 2012 *Biosynthesis of 3-iodothyronamine (TIAM) is dependent on the sodium-iodide symporter and thyroperoxidase but does not involve extrathyroidal metabolism of T4*. Endocrinology, **153** (11):5659-5667.
- [50] Cooper DS, 1984 *Antithyroid drugs*. N. Engl. J. Med. **311**:1353–1362
- [51] Van Sande J et al., 2003 *Anion selectivity by the sodium iodide symporter*. Endocrinology **144**:247–252
- [52] Manni ME et al., 2012 *3-iodothyronamine: a modulator of the hypothalamus-pancreas-thyroid axes in mouse*. Br. J. Pharmacol. **166**:650-8.
- [53] Manni ME et al., 2013 *harmacological effects of 3-iodothyronamine (T<sub>1</sub>AM) in mice include facilitation of memory acquisition and retention and reduction of pain threshold*. Br. J. Pharmacol. , **168**:354-362.