



**UNIVERSIDAD DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA**

D. Joaquín Lado Abeal, Doctor en Medicina y Cirugía, Profesor Titular del Departamento de Medicina de la Universidad de Santiago de Compostela y D. Julián Álvarez Escudero, Doctor en Medicina y Cirugía, Profesor Titular del Departamento de Cirugía de la Universidad de Santiago de Compostela y Jefe del Servicio de Anestesiología, Reanimación y Terapéutica del Dolor del Hospital Clínico Universitario de Santiago.

CERTIFICAN:

Que el Trabajo titulado: "Identificación de mecanismos moleculares relacionados con el síndrome del enfermo eutiroideo en el músculo esquelético y el tejido adiposo de pacientes en shock séptico", presentado por D. Alfonso Rodríguez Pérez para optar al grado de Doctor en Medicina y Cirugía, ha sido realizado bajo nuestra dirección.

Revisado el mismo, quedamos conformes con su presentación para ser juzgado como Tesis Doctoral por el correspondiente Tribunal.

Para que conste a los efectos oportunos, firmamos el presente certificado en Santiago de Compostela a treinta y uno de Enero de dos mil ocho.

Prof. D. Joaquín Lado Abeal

Prof. D. Julián Álvarez Escudero

UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA
Facultad de Medicina y Odontología

DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA

**IDENTIFICACIÓN DE MECANISMOS
MOLECULARES RELACIONADOS CON EL
SÍNDROME DEL ENFERMO EUTIROIDEO EN EL
MÚSCULO ESQUELÉTICO Y EL TEJIDO
ADIPOSO DE PACIENTES EN SHOCK SÉPTICO**

Trabajo de Investigación de D. Alfonso Rodríguez Pérez para optar al grado de Doctor en Medicina y Cirugía por la Universidad de Santiago de Compostela.

A mis padres, José y Pilar.

A mi esposa, Begoña.

**IDENTIFICACIÓN DE MECANISMOS
MOLECULARES RELACIONADOS CON EL
SÍNDROME DEL ENFERMO EUTIROIDEO EN EL
MÚSCULO ESQUELÉTICO Y EL TEJIDO
ADIPOSO DE PACIENTES EN SHOCK SÉPTICO**

Alfonso Rodríguez Pérez

2008

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo debe su existencia a la concurrencia en espacio y tiempo de distintos apoyos, ánimos e inquietudes. El haber desarrollado mi labor en el Servicio de Anestesiología, Reanimación y Terapéutica del Dolor del Hospital Clínico Universitario de Santiago, generó en mí el firme propósito de considerar la consecución de la Tesis como un paso más en mi formación profesional. Pieza fundamental en la génesis de tal inquietud, sin duda, ha sido mi Jefe de Servicio, Prof. Dr. Julián Álvarez Escudero, por su constante e incansable aliento y apoyo para tal empresa. Además, el digno ejemplo de muchos de mis compañeros de servicio encendió en mí la indispensable llama para imitarlos. La coincidencia con el Prof. Dr. Joaquín Lado Abeal ha sido determinante y definitiva para que estas inquietudes pudieran tomar forma tangible y comenzásemos a trabajar en este proyecto concreto, distinto de otras muchas ocasiones anteriores en las que todo había quedado en intenciones. Su desinteresada entrega, ejemplificadora constancia y generosidad son, y lo sabe mejor que nadie, el alma del presente estudio.

A todos los miembros del Servicio de Anestesiología de nuestro hospital, en especial al Dr. Vicente Ginesta Galán y a todo el personal de la Unidad de Reanimación por su colaboración e interés.

A los miembros del Servicio del Laboratorio Central de nuestro Centro, en especial a Dña. Esther Soneira, por su paciencia y desinteresado apoyo en el procesamiento de las muestras, que no fueron pocas.

Al Dr. José Angel Cocho de la Unidad de Metabolopatías de nuestro centro y a la Profesora Dra. Pilar Bermejo del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Santiago de Compostela (USC) por la labor desarrollada en la determinación del selenio plasmático.

A D. Fernando Palos Paz de la "Unidade de Enfermidades Metabólicas e Tiroideas" de la Facultad de Medicina de la USC por su colaboración en los estudios de expresión genómica.

A todos los pacientes por su generosidad.

ÍNDICE

1.ABREVIATURAS	1
2.INTRODUCCIÓN	6
2.1.FUNCIÓN HIPOTÁLAMO-HIPOFISARIA	9
2.2.CAPTACIÓN CELULAR DE HORMONAS TIROIDEAS	10
2.3.METABOLISMO TISULAR DE HORMONAS TIROIDEAS	11
2.4.RECEPTORES NUCLEARES DE LAS HORMONAS TIRODEAS	15
2.5.DESACOPLAMIENTO MITOCONDRIAL	18
2.6.ACCIONES NO GENÓMICAS DE LAS HORMONAS TIROIDEAS	20
3.OBJETIVOS	22
4.MATERIAL Y MÉTODOS	24
4.1.SUJETOS	25
4.2.OBTENCIÓN DEL LA BIOPSIA DE MÚSCULO ESQUELÉTICO Y TEJIDO ADIPOSO SUBCUTÁNEO	32
4.3.ANÁLISIS BIOQUIMICO DE PARÁMETROS SÉRICOS	34
4.4.EXTRACCIÓN DEL ARN DEL TEJIDO MUSCULAR Y TEJIDO ADIPOSO SUBCUTÁNEO. RETROTRANSCRIPCIÓN	35
4.5.CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE PCR EN TIEMPO REAL	38
4.6.CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOT	39

4.7.DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LAS DEYODINASAS EN TEJIDO MUSCULAR Y TEJIDO ADIPOSO	42
4.8.ANÁLISIS ESTADÍSTICO	43
5.RESULTADOS	44
5.1.DATOS ANTROPOMÉTRICOS Y ANÁLISIS SÉRICOS	45
5.2.EXPRESIÓN DE GENES POR qPCR	47
5.3.EXPRESIÓN DE TRalfa, TRbeta y RXRgamma EN TEJIDO MUSCULAR	52
5.4.ACTIVIDAD DE LAS DEYODINASAS TISULARES	53
6.DISCUSIÓN	55
7.CONCLUSIONES	64
8.BIBLIOGRAFÍA	67

1. ABREVIATURAS

A: adrenalina.

ADN: ácido desoxirribonucleico.

ADNc: ADN complementario.

AMPc: adenosinmonofosfato cíclico.

Amp: Amperios.

APACHE II: en inglés Acute Physiology and Chronic Health Evaluation.

ARNm: ácido Ribonucleico mensajero.

ATP: adenosintrifosfato.

C: grados centígrados.

CBP: proteína de unión al CREB.

cm: centímetro.

cpm: cuentas por minuto.

CREB: proteína de unión al elemento de respuesta al AMPc.

D1: deyodinasa tipo 1.

D2: deyodinasa tipo 2.

D3: deyodinasa tipo 3.

dbcAMP: dibutiril AMPc.

DIO1: gen que codifican la D1.

DIO2: gen que codifican la D2.

dl: decilitro.

Dob: dobutamina.

Dop: dopamina.

DXM: dexametasona.

fmol: fentamol.

FT3: T3 libre.

FT4: tiroxina o T4 libre.

G: unidad de medida de diámetro, Gauge.

g: gramo.

H: hombre.

HAT: histona acetil transferasa.

IL-1: Interleuquina 1.

IL-2R: receptor de la interleuquina 2.

IL-6: Interleuquina 6.

IL-8: Interleuquina 8.

IL-18: Interleuquina 18.

IMC: índice de masa corporal.

Kg: kilogramo.

l: litro.

LPS: Lipopolisacaridos de la pared bacteriana.

m: metro.

M: molar.

Mu: mujer.

MAPK: en inglés mitogen-activated protein kinase.

MCT8: Transportador 8 de monocarboxilatos.

mg: miligramo.

microg: microgramo.

microl: microlitro.

min: minuto.

ml: mililitro.

mm: milímetro.

mM: milimol.

mUI: miliUnidad Internacional.

NA: noradrenalina.

NCoR1: correpresor de los receptores nucleares hormonales.

NEFA: ácidos grasos no esterificados.

NF-Kb: en inglés Nuclear Factor Kb.

ng: nanogramo.

nmol: nanomol.

ns: sin significación estadística.

NTIS: en inglés Nonthyroidal illness syndrome, Síndrome del enfermo no tiroideo.

p: nivel de significación estadístico.

PCAF: factor asociado a p300/CBP.

PCR: en inglés Polymerase Chain Reaction (reacción en cadena de la polimerasa).

PGC-1: receptor activado tipo 1 de proliferación de peroxisoma.

pg: picogramo.

pmol: picomol.

PPAR: Receptor activado por el proliferador de peroxisomas.

qPCR: PCR cuantitativa.

r.p.m.: revoluciones por minuto.

rT3: 3,3',5'-triyodotironina o reversa de la T3.

RXR: receptor retinoideo X.

RXRA: isoforma alfa del receptor retinoideo X.

RXRB: isoforma beta del receptor retinoideo X.

RXRG: isoforma gamma del receptor retinoideo X.

RXRs: receptores retinoideos X.

SBP2: proteína fijadora del SECIS tipo 2.

SECIS: en inglés selenocysteine insertion sequence element.

SEET: síndrome del Enfermo Eutiroideo.

sIL6R: receptor soluble de la Interleuquina 6.

SMRT: mediador silenciador de los receptores de hormonas tiroideas y retinoideas.

SRC-1: coactivador 1 de los receptores esteroideos.

T3: 3,5,3'-triyodotironina.

T4: 3,3',5,5' tetrayodotironina o tiroxina.

TgAb: anticuerpos antitiroglobulina.

THRA: gen que codifican los receptores tiroideos alfa.

THRB: gen que codifican los receptores tiroideos beta.

TNF- α : factor de necrosis tumoral alfa.

TPOAb: anticuerpos antitiroperoxidasa.

TR α : receptor tiroideo alfa.

TR β : receptor tiroideo beta.

TRAP220: proteína asociada a la acción receptores tiroideos.

TRH: hormona hipotalámica reguladora de la TSH.

TRs: receptores tiroideos.

TSH: hormona hipofisaria estimulante de la tiroides.

UCPs: proteínas desacopladoras de energía mitocondrial(UCP1,2 y 3).

VDU1: peptidasa ubiquitín específica 33.

VDU2: peptidasa ubiquitín específica 22.

2.INTRODUCCIÓN

Los pacientes con sepsis presentan alteraciones en el metabolismo de las hormonas tiroideas y en su regulación, originando un descenso en los niveles séricos de la 3,5,3'-triyodotironina o T3, hormona tiroidea con mayor actividad biológica. A este fenómeno se le conoce como "Síndrome del Enfermo Eutiroideo" (SEET), "Enfermedad No Tiroidea" (NTIS, del inglés: Nonthyroidal illness syndrome), ó "Síndrome de la T3 Baja" (1,2). Este trastorno en la homeostasis de las hormonas tiroideas se conoce desde hace cuatro décadas y, aunque puede aparecer en cualquier proceso grave y en la malnutrición energético-proteica moderada-severa (3), cirugía (4), infarto agudo de miocardio (5,6), bypass cardiopulmonar (7), trasplante de médula ósea (8), es en los pacientes con sepsis y en especial durante estados de shock séptico, en donde es más profundo (1). Estos cambios se refieren a un descenso de los niveles de T3 y elevación de la 3,3',5'-triyodotironina ó reversa de la T3 (rT3) en el suero y los tejidos, niveles séricos normales o bajos de 3,3',5,5'tetrayodotironina ó T4 y niveles inadecuadamente normales o bajos de hormona estimulante de la tiroides (TSH) en relación con los niveles séricos de T4 y T3 (9). Los pacientes que presentan SEET asociado a niveles séricos bajos de T4 tienen mayor probabilidad de evolucionar desfavorablemente y morir (10,11,12), pero no hay evidencias clínicas que demuestren que bajo estas circunstancias el tratamiento con hormonas tiroideas suponga una ventaja, o incluso una desventaja (13).

En este contexto clínico, el fenotipo bioquímico del SEET nos plantea el dilema si el tratamiento con hormonas tiroideas sería beneficioso para los pacientes; sin embargo, al no existir estudios clínicos concluyentes de los beneficios de la terapia con hormonas tiroideas sobre

la morbi-mortalidad de estos pacientes, no existe acuerdo sobre si deben o no administrarse. Los partidarios del tratamiento sustitutivo con hormonas tiroideas argumentan que existen datos experimentales de hipotiroidismo intracelular, y que el fenotipo bioquímico es similar al de pacientes con hipotiroidismo secundario (TSH normal con T3 y/o T4 bajos), situación ante la que no se discute el tratamiento hormonal sustitutivo (1,13-15). Los detractores alegan, que al incrementar las hormonas tiroideas el gasto energético su descenso es un mecanismo adaptativo de la célula para disminuir el gasto energético, y por consiguiente, el consumo de oxígeno en situaciones de ingesta limitada, de aumento del gasto energético y, en caso de shock, la baja perfusión tisular, por lo que su administración a enfermos con SEET sería perjudicial (14).

Estas discrepancias sobre los beneficios, y por consiguiente de la necesidad de la terapia sustitutiva con hormonas tiroideas, obedecen al desconocimiento de gran parte de los mecanismos moleculares que subyacen en el SEET. Por ello, sería importante profundizar en la fisiopatología del SEET a nivel molecular en enfermos con sepsis, con la finalidad de obtener una visión más completa al respecto de la que disponemos en la actualidad.

Los mecanismos fisiopatológicos implicados en el SEET son multifactoriales, siendo los siguientes los mejor conocidos.

2.1.FUNCIÓN HIPOTÁLAMO-HIPOFISARIA.

Con independencia de su etiología, los pacientes con SEET muestran niveles de TSH inapropiadamente normales para los niveles bajos de hormonas tiroideas que presentan. La causa es una disfunción hipotalámica que se asocia a una disminución en la expresión del ARN mensajero (ARNm) de la hormona reguladora de la TSH (TRH) en el núcleo paraventricular de enfermos críticos (16) y, concretamente, de enfermos con SEET (17).

En pacientes con una enfermedad grave prolongada se ha encontrado una disminución en la pulsatilidad en la secreción de TSH y en el pico nocturno de ésta, junto con un incremento en los niveles basales, que no se acompaña de un aumento de la pulsatilidad después de la infusión de TRH (18). Los hallazgos de que las alteraciones en el eje tiroideo son parcialmente revertidas por la administración de una infusión combinada de TRH y factores liberadores de hormona de crecimiento (18), son evidencias adicionales del importante papel que juega el hipotiroidismo central en el SEET.

En los casos más severos, se produce una disminución en la cantidad total de TSH secretada a lo largo del día, principal responsable del descenso en los niveles séricos de T4. Los mecanismos moleculares que causan esta alteración de la función hipotálamo-hipofisaria en estos pacientes no está muy clara. En ratas se ha observado que la administración de lipopolisacáridos de membrana bacterianas (LPS) induce la actividad de la deiodinasa tipo 2 (D2) en el hipotálamo mediobasal, lo que podría incrementar la conversión de T4 en T3 a ese

nivel, suprimiendo el eje hipotálamo-hipófisis-tiroides por la inhibición local de la secreción de TRH y/o TSH (19). Desconocemos si tales mecanismos existen en el hombre.

Como mecanismos responsables de esta disfunción hipotalámica se han implicado al aumento de glucocorticoides por vía endógena o exógena (20,21), la administración de fármacos dopaminérgicos (2) y, en casos de sepsis, la interleuquina 1 (IL-1) (1) y la interleuquina 18 (IL-18) (22) que podrían suprimir directamente la secreción de TRH, la respuesta hipofisaria a la TRH y la secreción de TSH (17,18,23).

Los niveles inapropiadamente normales o bajos de TSH (1), y la presencia de niveles elevados de IL-6 y su receptor soluble (sIL6R), como los observados durante la sepsis (24), llevarían al final a una disminución en la secreción de hormonas por el tiroides.

2.2.CAPTACIÓN CELULAR DE HORMONAS TIROIDEAS.

La captación tisular de hormonas tiroideas está disminuida en pacientes con SEET. En humanos, Arem et al (25) encontraron niveles de T3 muy bajos en todos los tejidos excepto en músculo esquelético y corazón, una observación interesante cuya causa y significado aún no ha sido explicada.

Existen estudios recientes en pacientes con SEET ingresados en unidades de cuidados críticos, en los que se realizaron toma de muestras tisulares inmediatamente después del éxitus, y en donde se encontró que la administración previa de T4 y T3 incrementó los niveles de

yodotironinas en hígado y músculo esquelético (9). Estos hallazgos demuestran que la biodisponibilidad de las hormonas tiroideas no está limitada por una captación tisular reducida siempre que se administre un tratamiento de sustitución adecuado.

Los mecanismos implicados en el bloqueo de la captación tisular de hormonas tiroideas son desconocidos, si bien la observación de que células incubadas en un medio con suero de pacientes con SEET presentan un descenso en la captación de hormonas tiroideas sugiere la presencia de sustancias inhibitoras de la misma (26,27), de los cuales los ácidos grasos no esterificados (NEFA) son los mejor caracterizados (28). Recientemente, se ha observado que fibroblastos de sujetos con mutaciones en el gen de un transportador específico para hormonas tiroideas, el transportador 8 de monocarboxilatos (MCT8), presentan un descenso importante en la captación de T4 y T3 (29). La participación del MCT8, y otros transportadores para las hormonas tiroideas, en el descenso de la captación y su desigual distribución tisular de las hormonas tiroideas en pacientes con SEET es desconocida.

2.3.METABOLISMO TISULAR DE HORMONAS TIROIDEAS.

El descenso en los niveles séricos de la T3 y el aumento de la rT3 son los primeros datos bioquímicos anormales del eje tiroideo en el SEET. En condiciones normales, el tiroides secreta el 20% de la T3 presente en suero, procediendo el 80% restante de la conversión de T4 en T3 en los tejidos periféricos, a lo que contribuyen por igual la deiodinasa tipo 1 (D1) hepática y renal, y la deiodinasa tipo 2 (D2) muscular (30,31). El

descenso de T3 y aumento de rT3 en el SEET, se debe principalmente al bloqueo en la actividad D1 hepática y D2 muscular (9,21,30), y al aumento en la actividad de la deydinasa tipo 3 (D3) muscular (32), que da lugar a una menor síntesis de T3 a partir de T4, aumento en la producción de rT3 a partir de T4, y descenso en el aclaramiento de la rT3 (Figura 1).

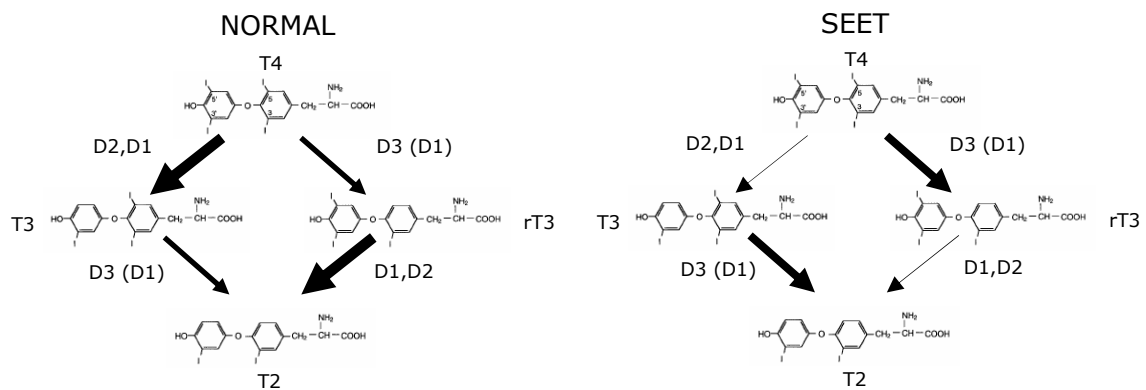


Figura 1: Metabolismo de las hormonas tiroideas en situación de normalidad y en SEET.

Los factores responsables del descenso en la actividad D1 hepática y D2 muscular, y el aumento en D3 muscular en el SEET son poco conocidos (33, 34). El factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), la IL-1 α y la IL-6 disminuyen la actividad de la D1 en roedores (35) y líneas celulares tumorales hepáticas humanas (23,36), inhibición que pudiera deberse a la competición entre el promotor de la D1 y los promotores de los múltiples genes que regulan estas citoquinas por los escasos coactivadores presentes en las células, como es el caso del coactivador 1 de los receptores esteroideos (SRC-1) (37), o por factores de transcripción como el NF-Kbeta (del inglés Nuclear Factor Kb) (38, 39). La

activación del NF- κ B juega un papel central en la respuesta inflamatoria e inmune, podría ser el factor molecular sobre el que gira el SEET en pacientes con citoquinas elevadas.

Las deydinasas son selenoproteínas y su actividad depende de los niveles de selenio; la deficiencia de selenio, frecuente en pacientes severamente enfermos, provoca un descenso en la actividad D1 (21). En este sentido, recientemente se ha demostrado en humanos que mutaciones en SBP2 (del inglés *SECIS binding protein 2*), una proteína crucial en la incorporación de selenocisteína al SECIS (del inglés *selenocysteine insertion sequence element*) en el centro catalítico de las deydinasas, causa una importante inhibición de la actividad D2, con el consiguiente descenso en T3 sérica (40). Sin embargo, la replección de selenio en enfermos graves no modificó los niveles de hormonas tiroideas (41), lo que sugiere que su deficiencia no es un factor crucial en el SEET. La participación de SBP2 en el SEET es desconocida.

La D2 se considera la deydinasa fundamental en la generación de T3 a nivel periférico debido a su plasticidad fisiológica (42), siendo responsable de la mitad de la producción de T3 en tejidos periféricos en humanos, especialmente en el músculo esquelético. Su expresión y actividad son controladas por diversos mecanismos pre y posttraslacionales. El AMP cíclico (AMPC) es un potente estimulador de la transcripción de D2, lo que constituye la base de su rápida respuesta a la estimulación adrenérgica. En fibroblastos humanos se ha encontrado que la dexametasona inhibe profundamente la expresión de D2, inhibición que no se revierte por dibutilil AMP cíclico, un potente agonista del AMP cíclico

(Figura 2); dada la frecuencia con que se emplean glucocorticoides en pacientes con SEET creemos que estos hallazgos son relevantes en clínica.

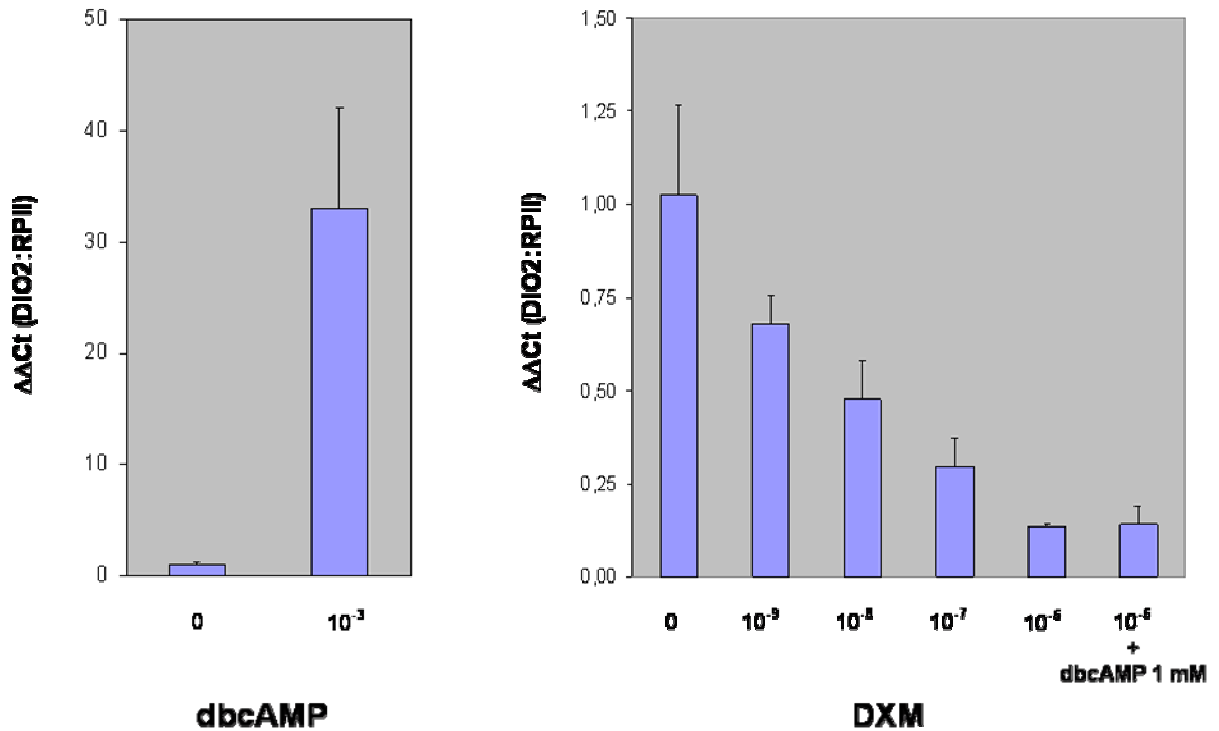


Figura 2: Efectos del dibutilil AMP cíclico –dbcAMP– (izquierda) y dexametasona –DXM– (derecha) sobre la expresión de deydinasa 2 - DIO2- en cultivos de fibroblastos humanos. dbcAMP a dosis 1 mM aumenta 30 veces la expresión de DIO2 a las 24 horas. DXM ejerce una inhibición dosis dependiente sobre la expresión DIO2 que no se puede revertir con dbcAMP 1mM.

La relación entre actividad D2 y su expresión es variable, lo que indica un importante nivel de control posttraslacional, responsable de su corta vida media (40 minutos) y que puede acortarse aún más por

concentraciones fisiológicas de su sustrato, T4 y rT3, o concentraciones elevadas de T3. La actividad de D2 está controlada por un proceso de proteólisis selectiva mediado por el sistema proteosoma-ubiquitina. Hallazgos recientes sugieren que la ubiquitinación de la D2 es reversible, prolongando así la vida media de la proteína, proceso llevado a cabo por las proteasas *peptidasa ubiquitín específica 33* (VDU1) y *peptidasa ubiquitín específica 22* (VDU2) (42), por lo que su inducción es un proceso fisiopatológico de potencial importancia al regular la vida media de la actividad de D2 y, por ello, los niveles intracelulares de T3. La participación de las proteasas desubiquitinadoras VDU1 y VDU2 en el SEET es desconocida.

2.4. RECEPTORES NUCLEARES DE LAS HORMONAS TIRODEAS.

Las acciones genómicas son las mejor conocidas de cuantas ejercen las hormonas tiroideas, y consisten en la regulación de la transcripción de genes diana a través de la unión de la T3 a receptores nucleares específicos, denominados receptores alfa (TR α) y beta (TR β) de hormonas tiroideas. Los receptores tiroideos (TRs) están codificados por genes específicos (THRA y THRB), existiendo diversas isoformas generadas por *splicing* alternativo (43,44) con desigual distribución tisular.

En estudios realizados en ratones a los que se provocó un cuadro similar al SEET séptico mediante la administración de lipopolisacáridos de pared bacteriana (LPS), se encontró una disminución en la expresión de todas las isoformas de receptor de hormonas tiroideas THRA, THRB, de RXR (receptor retinoideo X) (en sus tres isoformas: RXRA, RXRB y RXRG)

y del ARN mensajero del SRC-1 a nivel hepático, así como de su capacidad de unión al ADN (45,46), lo que sugiere que este fenómeno podría estar implicado en el SEET. Sin embargo, en humanos se encontró un aumento en la expresión del THRA y THRB en células sanguíneas mononucleares y en tejido hepático de enfermos sometidos a trasplante (47). Las razones de estas discrepancias no han sido aclaradas todavía.

Los receptores nucleares de hormonas tiroideas se unen a secuencias específicas del ADN, bien como homodímeros (TR-TR) o como heterodímeros, siendo el receptor del ácido 9-cis retinoico (RXR) la proteína predilecta (RXR-TR). En ausencia de T3, este complejo dimérico se une a otras proteínas conocidas como correpresores y, en conjunto, bloquean la transcripción (Figura 3); dentro de los correpresores, los mejor conocidos son el *correpressor del receptor nuclear hormonal* (NCoR1) y el *mediador que silencia a los receptores de hormonas tiroideas y del ácido retinoico* (SMRT)(48), presentes de forma ubicua (49). La unión de la T3 a su receptor da lugar a la liberación de correpresores y reclutamiento de coactivadores (Figura 3), siendo el SRC-1 de los mejor conocidos (50). Tiene actividad intrínseca de acetil transferasa de histonas, y media en la remodelación de la cromatina que permite la transcripción.

Mutaciones en SRC-1 causan resistencia a la acción de las hormonas tiroideas (51). Se ha encontrado recientemente una familia con resistencia severa a la acción de las hormonas tiroideas en que el THRB mutado es incapaz de reclutar SRC-1, probable causa de la severidad del

cuadro clínico (52). El SRC-1 forma parte de la familia de coactivadores p160, que se caracterizan por tener actividad histona acetiltransferasa

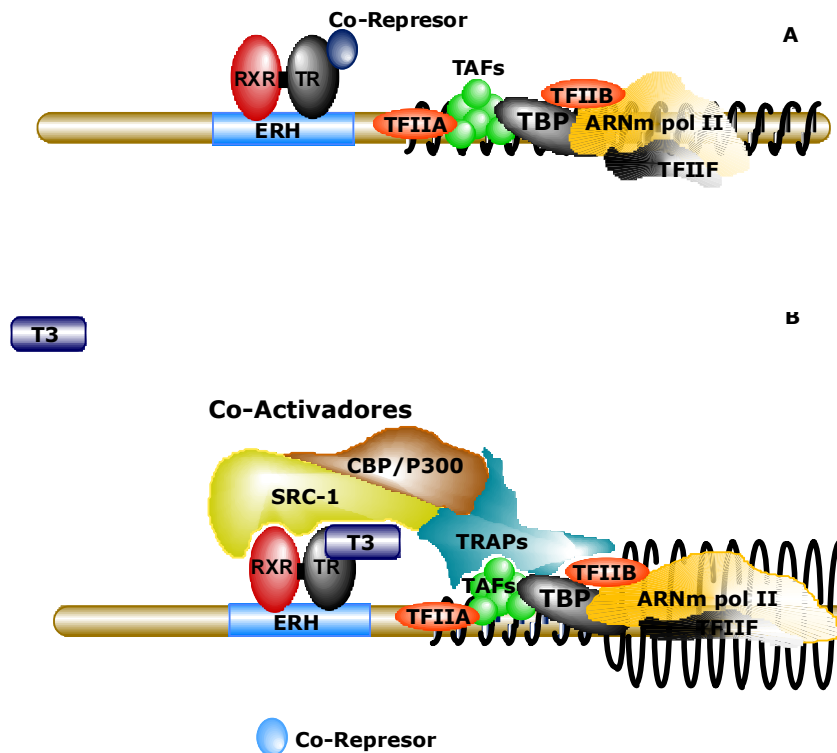


Figura 3: A) En ausencia de T3 la unión de correpresores al heterodímero RXR-TR inhibe la transcripción basal. B) En presencia de T3 los correpresores se liberan del heterodímero RXR-TR y se reclutan coactivadores, iniciándose la transcripción.

(HAT) intrínseca (53), que reclutan a otras acetiltransferasas entre las que se encuentra *p300*, la proteína de unión al elemento de respuesta al AMP cíclico (CREB) conocida como CBP y el factor asociado a *p300/CBP* (PCAF) (Figura 3). La concentración intracelular de coactivadores es baja y carecen de especificidad de receptor, aumentando la capacidad de transcripción de todos los receptores esteroideos (49), por lo que son un

potencial factor limitante de la acción hormonal en situaciones de estrés metabólico severo como la sepsis (37), en que los glucocorticoides e interleuquinas activan la transcripción de genes.

Los datos encontrados en humanos sugieren que durante las enfermedades crónicas graves el incremento en la expresión de los receptores tiroideos podría, en parte, compensar la disminución de los niveles de hormonas tiroideas, manteniendo el estado eutiroideo (47). Al contrario, los hallazgos en ratones sugieren que las acciones de las hormonas tiroideas podrían estar limitadas por la menor disponibilidad de los receptores tiroideos y sus cofactores durante la sepsis y, bajo estas circunstancias, la administración de hormonas tiroideas podría ser mucho menos efectivo. Por último, en ratones a los que se inyectó LPS y citoquinas proinflamatorias con la finalidad de originar un cuadro similar a la sepsis, se ha encontrado una disminución en la expresión a nivel hepático (45) y cardíaco (46) del RXRA, RXRB y RXRG, y del THRA y THRB, así como de los coactivadores CBP/p300, SRC1-1, SRC-2, TRAP220 y PGC-1. Los cambios de estos factores en enfermos con SEET no se conocen.

2.5.DESACOPLAMIENTO MITOCONDRIAL.

La energía liberada durante la fosforilación oxidativa de los hidratos de carbono y lípidos se acumula en forma de Adenosinatrifosfato (ATP); sin embargo, una parte de esa energía se desacopla de la producción de ATP y disipa en forma de calor –efecto termogénico-, o se emplea para disminuir los niveles de superóxido, mediante un proceso conocido como

goteo de protones (54) que realizan las denominadas *proteínas desacopladoras* (UCP). La UCP1, principal UCP implicada en la regulación de la termogénesis, se expresa preferentemente en la grasa parda, por lo que en humanos su función parece limitarse a los primeros días de vida. La participación de la UCP2 y UCP3 en la regulación de la termogénesis es dudosa; la función de la UCP2, que tiene una expresión ubicua, y la UCP3, que se expresa sobre todo en corazón y músculo esquelético (46), está en relación con la protección contra el estrés oxidativo, atenuando la producción de superóxido mitocondrial y disminuyendo por ello el daño celular (55).

El aumento de superóxido durante la fosforilación oxidativa da lugar a un incremento en la expresión de las UCPs y en la conducción de protones a través de éstas, desacoplando así la actividad energética de la mitocondria, que a su vez da lugar a una disminución en la producción de superóxido. Tras la administración de ácidos grasos libres, o en situaciones en las que sus niveles plasmáticos aumentan (como en el hipertiroidismo, ayuno, tratamiento con glucocorticoides, administración de lipopolisacáridos, sepsis), la expresión muscular de UCP3 aumenta; este efecto está en relación a la peroxidación de los ácidos grasos por el superóxido, que genera una mezcla compleja de aldehídos de cadena corta que causan el aumento en la expresión y actividad de las UCPs (55).

Durante la sepsis existe pérdida de masa muscular y un aumento en la expresión de UCP3 muscular, probablemente porque el aumento de glucocorticoides y ayuno asociados aumentan los niveles de ácidos grasos libres en sangre (56); la elevación de la UCP3 sería un mecanismo

protector de los efectos deletéreos de la sepsis en el músculo esquelético, al disminuir la cantidad de superóxido generado. Las hormonas tiroideas aumentan los niveles de UCP3 en el músculo (57) y, durante el hipertiroidismo, aumenta la pérdida de masa muscular; por ello, el descenso de las hormonas tiroideas durante el SEET secundario a sepsis sería un mecanismo de defensa contra la pérdida de masa muscular, pero por otro lado, se perdería el efecto inductor de la expresión de UCP3 beneficioso para disminuir los niveles de superóxido.

Los niveles de UCP3 en el músculo esquelético de pacientes con SEET debido a sepsis se desconocen.

2.6.ACCIONES NO GENÓMICAS DE LAS HORMONAS TIROIDEAS.

Las hormonas tiroideas, en especial la T4, ejercen acciones en segundos o minutos, conocidas como no genómicas o extracelulares, y que incluyen acciones sobre el transporte de glucosa, la actividad basal de bombas y canales de membrana, y participación en la fosforilización de TRs y otros factores de transcripción, controlando así la velocidad de ésta (53,58).

Recientemente Berg et al (59) han identificado a la integrina $\alpha\beta3$ como receptor de membrana plasmática de alta afinidad para la T4 - uniéndose la T3 con menor afinidad-, a través del cual la T4 activa la vía de la MAPK (del inglés *mitogen-activated protein kinase*). Este descubrimiento abre nuevas expectativas en la investigación sobre los

mecanismos de acción no genómica de las hormonas tiroideas y, por el momento, la implicación la integrina $\alpha V\beta 3$ en el SEET no ha sido estudiada.

3.OBJETIVOS

Dentro de los distintos cuadros que pueden originar un SEET, el shock séptico es uno de los más frecuentes. En seres humanos, los mecanismos moleculares implicados en el SEET son en su mayoría desconocidos. El propósito del presente estudio, realizado sobre pacientes que han desarrollado SEET secundariamente a un shock séptico, ha sido investigar los cambios en la expresión de los genes y proteínas implicados en las acciones de las hormonas tiroideas y en la actividad de las deiodinasas, en dos tejidos importantes para el metabolismo proteico y energético, como son el músculo esquelético y el tejido adiposo subcutáneo.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1.SUJETOS.

Un total de treinta pacientes divididos en dos grupos fueron incluidos en el estudio. El grupo control comprendió 17 pacientes (7 mujeres y 10 hombres), con una edad media de 69 años (rango entre 37-75 años). Este grupo está integrado por pacientes remitidos a nuestro hospital para la realización de una intervención traumatológica sobre extremidades inferiores, la gran mayoría para reemplazo protésico de rodilla o cadera (Tabla 1).

	Edad	Tipo de Cirugía de Extremidad inferior	Sexo
Caso 1	77	Prótesis de cadera	H
Caso 2	37	Protesis de cadera	Mu
Caso 3	76	Prótesis total de rodilla	Mu
Caso 4	78	Protesis total rodilla	Mu
Caso 5	68	Prótesis total de rodilla	Mu
Caso 6	55	Prótesis total de cadera	H
Caso 7	55	Prótesis total de cadera	H
Caso 8	69	Protesis total de rodilla	Mu
Caso 9	69	Protesis total de cadera	Mu
Caso 10	72	Protesis total de cadera	H
Caso 11	73	Protesis total de rodilla	Mu
Caso 12	72	Prótesis total de cadera	Mu
Caso 13	76	Protesis total rodilla	Mu
Caso 14	60	Fractura de tobillo	H
Caso 15	84	Fractura femur	Mu
Caso 16	64	Prótesis total cadera	Mu
Caso 17	74	Protesis total de rodilla	Mu

Tabla 1: Grupo control. Se representa la edad, sexo y tipo de intervención quirúrgica realizada. Mu=Mujer, H=Hombre.

El otro grupo de pacientes lo constituyen un total de 13 pacientes de la Unidad de Cuidados Críticos de nuestro hospital (7 mujeres y 6

hombres), ingresados en la Unidad de Reanimación con un cuadro de shock séptico de origen abdominal, que habían desarrollado un SEET durante la evolución de su enfermedad (Tabla 2). Este último grupo tiene una edad media de 73 años (rango entre 58-83 años). La causa de shock séptico estuvo relacionada con una infección abdominal (4 casos de colecistitis aguda, 1 caso de abscesos hepáticos múltiples, 3 casos de perforación de colon, 1 caso de dehiscencia de suturas tras cirugía de colon, 2 casos de isquemia de colon, 1 caso de megacolon tóxico y 1 caso de fascitis retroperitoneal necrotizante). Todos los pacientes del grupo de shock séptico fueron sometidos a cirugía y luego trasladados a la Unidad de Cuidados Críticos, donde se mantuvieron con soporte mecánico ventilatorio e infusión intravenosa de aminos vasoactivas (dobutamina, dopamina, noradrenalina y/o adrenalina). Para la sedación y analgesia del grupo de SEET se empleó una infusión continua de propofol y morfina, y el tipo de nutrición utilizada fue parenteral total. Todos los pacientes presentaban en el momento del ingreso un APACHE II (en inglés Acute Physiology and Chronic Health Evaluation) mayor de 17 (60). Un total de 8 pacientes (62%) se recuperaron después de una estancia media 23 días en la Unidad de Cuidados Críticos (rango entre 5 a 96 días) y cinco pacientes (38%) fallecieron en la Unidad.

Ninguno de los pacientes de ambos grupos tenían historia conocida de enfermedades tiroideas previas, ni habían estado tratados con amiodarona en los últimos seis meses previos al estudio.

	Edad	Patología de Base	Sexo	Exitus/Estancia Media	Aminas vasoactivas
Caso 1	61	Colecistitis aguda	Mu	Si	Dob y NA
Caso 2	58	Abscesos hepáticos múltiples	H	No/5	Dop y Dob
Caso 3	75	Colecistitis aguda	Mu	No/96	Dob, Dop y NA
Caso 4	72	Colecistitis aguda	Mu	No/11	Dop y Dob
Caso 5	83	Perforación de colon	Mu	No/28	Dop, Dob y NA
Caso 6	78	Colecistitis aguda	H	No/24	Dob y NA
Caso 7	81	Dehiscencia de suturas tras colectomía	H	Si	Dob, NA y A
Caso 8	67	Colitis isquémica	H	No/34	Dob y NA
Caso 9	78	Megacolon tóxico	Mu	Si	Dob y NA
Caso 10	76	Fascitis necrotizante retroperitoneal	Mu	No/20	Dob y Dop
Caso 11	61	Colitis isquémica	H	Si	Dob y NA
Caso 12	64	Perforación de colon	H	No/23	Dob y NA
Caso 13	73	Perforación de colon	Mu	Si	Dob, NA y A

Tabla 2: Resumen del grupo de pacientes con sepsis abdominal que presentaron SEET. Sexo: Mu=Mujer, H=Hombre. Aminas Vasoactivas: Dob=Dobutamina, Dop=Dopamina, NA=Noradrenalina, A=Adrenalina.

En todos los casos se obtuvo el consentimiento informado del estudio por parte del paciente o los responsables familiares directos (según modelo que se muestran en las Imágenes 1-4) . El protocolo de estudio fue sometido y aprobado por el Comité Ético de la Universidad de Santiago de Compostela y Comité Ético de Investigación Clínica de Galicia.

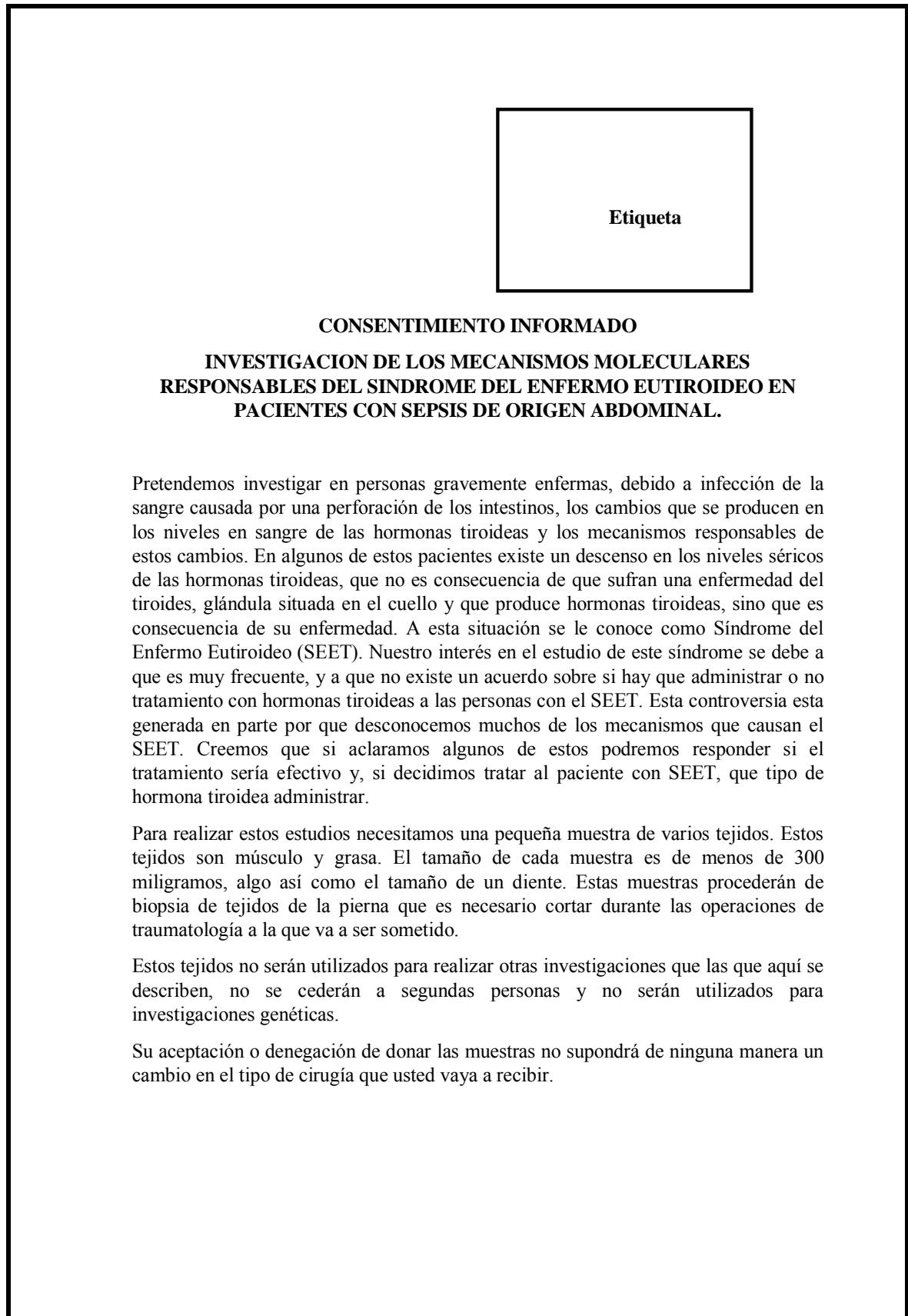


Imagen 1 : Anverso del consentimiento de los pacientes del grupo control.

La donación de las muestras es voluntaria por lo que usted no recibirá ninguna remuneración económica.

La donación o no donación de las muestras no repercutirá en el tipo de asistencia que usted este recibiendo por parte de los facultativos que participan en el estudio ni de otros facultativos o personal del Hospital.

Muchas gracias por su colaboración.

D. _____, mayor de edad, con DNI _____, en calidad de _____ en plenas facultades mentales, he entendido la finalidad del estudio, que me ha sido explicado por el Dr. _____ y doy mi consentimiento para que se utilice el tejido que se me solicita en la investigación que aquí se propone.

Firma:

En Santiago de Compostela a ____ de _____ de 2005.

Imagen 2 : Reverso del consentimiento de los pacientes del grupo control.

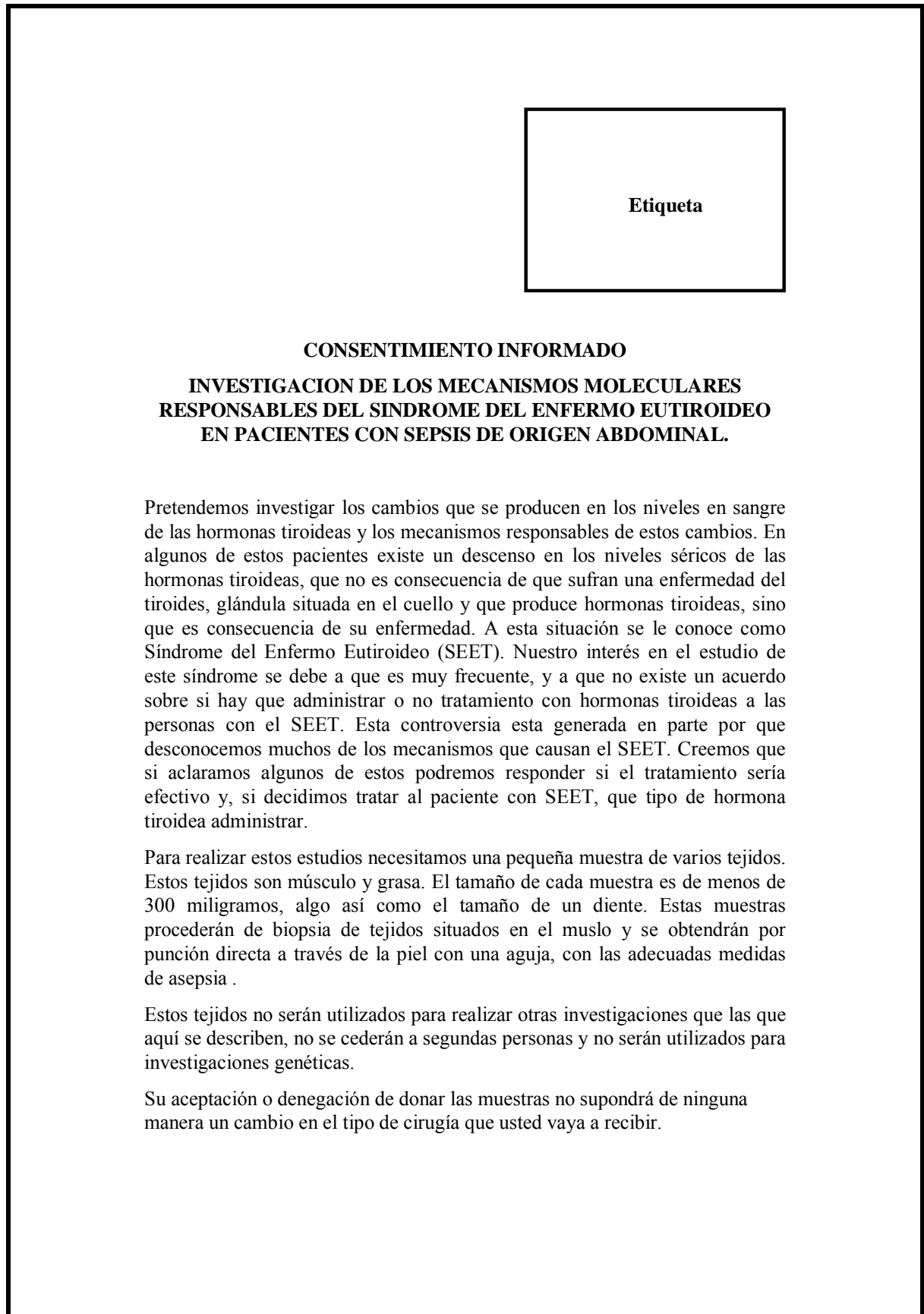


Imagen 3: Anverso del consentimiento de los pacientes del grupo de SEET.

La donación de las muestras es voluntaria por lo que usted no recibirá ninguna remuneración económica.

La donación o no donación de las muestras no repercutirá en el tipo de asistencia que usted este recibiendo por parte de los facultativos que participan en el estudio ni de otros facultativos o personal del Hospital.

Muchas gracias por su colaboración.

D. _____, mayor de edad, con DNI _____, en calidad de _____ en plenas facultades mentales, he entendido la finalidad del estudio, que me ha sido explicado por el Dr. _____ y doy mi consentimiento para que se utilice el tejido que se me solicita en la investigación que aquí se propone.

Firma:

En Santiago de Compostela a ____ de _____ de 2005.

Imagen 4 : Reverso del consentimiento de los pacientes del grupo de SEET.

4.2.OBTENCIÓN DE LA BIOPSIA DE MÚSCULO ESQUELÉTICO Y TEJIDO ADIPOSO SUBCUTÁNEO.

En el grupo control, las biopsias del músculo esquelético y el tejido adiposo subcutáneo de la extremidad inferior fueron obtenidos durante la cirugía que fue realizada con anestesia regional con un bloqueo neuroaxial. En los pacientes con shock séptico y SEET, las biopsias fueron realizadas en los primeros cinco días tras la admisión en la Unidad de Cuidados Críticos a partir de la porción distal y externa del muslo (músculo vasto lateral), empleando una aguja de biopsia tipo Tru-Cut de 14G de 15 cm. Pharmaseal (61), según se muestra en las Figuras 5 y 6. Las muestras fueron congeladas a -80°C dentro de los primeros 10-20 minutos después de la extracción. Previa a la realización de la técnica, a los paciente del grupo de SEET, se le administró una dosis en bolo de propofol y morfina cuya cantidad dependió de la situación hemodinámica del paciente, con el fin de garantizar el máximo estado de bienestar y confort durante la realización de la misma.



Imagen 5: Las biopsias musculares se realizaron en el cuadrante infero-externo del muslo (zona marcada con rotulador).

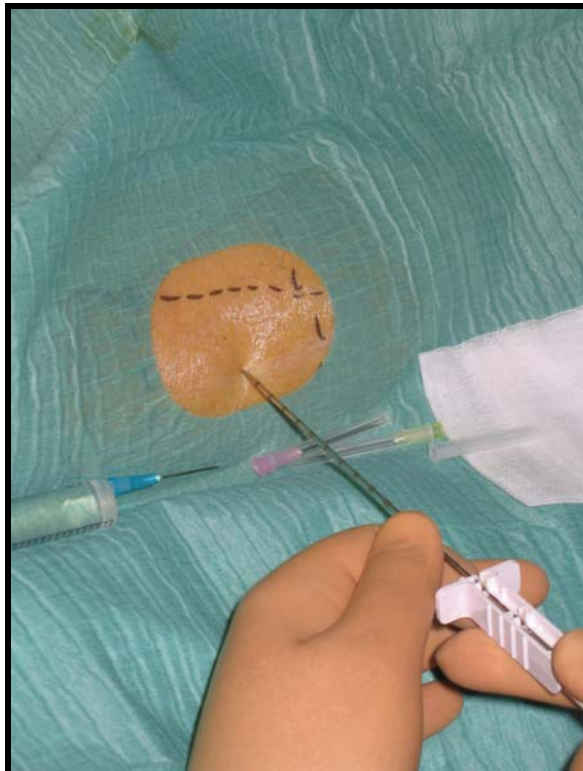


Imagen 6: Las biopsias de músculo y grasa en pacientes con SEET se realizaron mediante punción con Tru-Cut de 14G de 15 cm. Pharmaseal

4.3. ANÁLISIS BIOQUÍMICO DE PARÁMETROS SÉRICOS.

En el grupo control, las muestras sanguíneas fueron extraídas entre las 08:00 y las 09:00 horas, el mismo día de la cirugía y antes de la intervención. En el grupo con shock séptico las muestras fueron extraídas previamente a realizar la biopsia sin un horario establecido aunque mayoritariamente por las mañanas (de 8:00 a 14:00 horas).

Mediante quimioluminiscencia se determinaron las concentraciones séricas de TSH (rango normal de 0,41-4,94 mUI/l), tiroxina libre (FT4, rango normal de 0,85 a 1,69 ng/dl ó 10,94 a 21,75 pmol/l), triyodotironina libre (FT3, rango normal de 2,53 a 4,29 pg/ml ó 3,89 a 6,60 pmol/l) (ADVIA Centaur, Bayer Diagnostics), cortisol total sérico (rango normal a las 08:00 horas de 5 a 25 microg/dl ó 137,95 a 689,75 nmol/l), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), y receptor de IL-2 (IL-2R), IL-6 e IL-8 (Immulate 2000, DPC).

Los niveles séricos de rT3 (rangos normales de 0,15 a 0,35 ng/ml ó 0,23 a 0,54 nmol/l) se midieron por radioinmunoensayo (Biocode Hycel). Los anticuerpos antitiroglobulina (TgAb) y antitiroperoxidasa (TPOAb) se determinaron por ELISA (Orgentec Diagnostika).

El selenio plasmático se determinó mediante espectrometría de masas tras acoplamiento plasmático inducido (ICP masas, Varian 820 ms) (rango normal de 50 a 145 microg/l ó 0,63 a 1,84 micromol/l).

La albúmina sérica se cuantificó por espectrometría con solución verde de bromocresol como tinte de marcado (rango normal de 4 a 5,2 g/dl ó 40 a 52 g/l)(ADVIA Chemistry, Bayer Diagnostics).

La transferrina sérica fue determinada por inmunoturbidimetría (rango normal de 205 a 365 mg/dl ó 2,05 a 3,65g/l)(Cobas-bio Kit, Roche Diagnostics).

La determinación de linfocitos totales se realizó con un contador automático de células Bayer Technicom H-3.

4.4.EXTRACCIÓN DEL ARN DE TEJIDO MUSCULAR Y TEJIDO ADIPOSO SUBCUTANEO. RETROTRANSCRIPCION.

La extracción del ARN total del músculo esquelético se realizó con TRIzol (Invitrogen, España) tal y como se explica en la Tabla 3. La extracción del ARN total del tejido adiposo subcutáneo se realizó con el Lipid Tissue Kit de QIAGEN (QIAGEN, España) siguiendo las instrucciones del fabricante.

La cuantificación de la expresión génica se realizó sobre ADN complementario (ADNc) obtenido mediante transcripción reversa del ARN total. Esta se realizó empleando la enzima M-MLV (Invitrogen, España), 1 microgramo de ARN total, 5 micromoles de hexámeros aleatorios y 2 milimoles de desoxinucleotidos (Ecogen, España) completando hasta un volumen total de reactivo de 20 microlitros (ver protocolo adjunto Tabla 4).

EXTRACCIÓN DEL ARN TOTAL DE MUESTRAS DE TEJIDO MUSCULAR.

1. En tubos Eppendorf de 1,5 ml se instila 1 ml de TRizol y 25-50 mg del tejido muscular.
2. Sonicación del tejido con ultrasonidos hasta lograr un homogeneizado completo, enfriando la muestra regularmente en hielo para evitar altas temperaturas que puedan dañar el ARN
3. Incubación 5 minutos a temperatura ambiente.
4. Adición de 200 microl de cloroformo, agitación 15 segundos seguido de 2 minutos a temperatura ambiente.
5. Centrifugación a 12.000 g durante 15 minutos a 4°C. Se recoge la fase acuosa (superior) pasándola a un nuevo tubo Eppendorf, al que se adicionan 500 microl de isopropanol.
6. Incubación en isopropanol. Centrifugación a 12.000 g durante 10 minutos , a 4°C. Eliminación del sobrenadante, dejando en el fondo del tubo un pellet que corresponde al ARN de la muestra.
7. Adición de 1 ml de etanol 70%. Centrifugación durante 5 minutos a 12.000 g y 4°C. Eliminación del sobrenadante sin tocar el pellet, dejamos secar al aire.
8. Resuspensión con agua libre de ARN-asa.

Tabla 3: Procedimiento empleado para la extracción del ARN total en muestras de tejido muscular humano.

RETROTRANSCRIPCIÓN DE RNA A ADNc.

1. En un tubo Eppendorf de 1.5 ml se añaden: 5 mM dNTP, 1 microL de hexámeros aleatorios, 1 microg de ARN y csp con agua destilada.
2. Incubación de la muestra a 65°C.
3. Centrifugado rápido e introducción en hielo.
4. Adición de 4 microl de Buffer 5X + 2 microl de DTT 0,1 M.
5. Muestra en baño a 37°C durante 2 minutos.
6. Adición de 1 microl de M-MLV.
7. Baño 37°C durante 1 hora para que actúe el enzima.
8. Incubación a 70°C, durante 15 minutos, para desactivar el MMLV.
9. Adición de ARN-asa, 1 microl, 20 minutos a 37°C.

Tabla 4: Protocolo para la retrotranscripción del ARN a ADNc.

4.5. CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE PCR EN TIEMPO REAL.

Se cuantificó la expresión de THRB1, THRA1, RXRA, RXRB, RXRG, NCoR1, SMRT, SRC-1, MCT8, DIO1 (gen que codifican la dehidrogenasa tipo 1), DIO2 (gen que codifican la dehidrogenasa tipo 2), SBP2 Y UCP3, empleando como control interno RNA polimerasa II. Las reacciones se realizaron en un termociclador Light Cycler 2.0 (Roche, España) empleando sondas Probelibrary (Roche, España), oligonucleótidos específicos (Genosys, Sigma-Aldrich) y una mezcla de reactivos (*mastermix*) para PCR cuantitativa (qPCR) Quantitect Probe PCR Kit Master Mix (Qiagen). En la Tabla 5 se resumen las sondas y oligonucleótidos empleados.

La qPCR se realizó con 5 microlitros de QuantiTect Probe PCR, 0,2 microlitros de sonda específica, 0,3 micromol/l de cada oligonucleótido, 10 ng de ADNc, y solución acuosa libre de ARNasa hasta un volumen final de 20 microl. Las condiciones para la qPCR fueron una temperatura de 95°C durante 15 minutos, seguidos por 40 ciclos de 95°C durante 20 segundos y 60°C durante 1 minuto, con lectura de fluorescencia en tiempo real al final de cada ciclo. La expresión de cada gen se normalizó frente a la expresión de ARN polimerasa II empleando el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (62).

Gen	Sonda	Oligonucleótido sentido	Oligonucleótido antisentido
MCT8	17	5'-gctgccgttgctttcatt	5-aagtagcgcaggcttaggg
DIO1	79	5'-cactgcctgagaggctctacata	5'-tgtagttccaagggccagat
DIO2	47	5'-ggaagagcttctcctcgat	5'-tccttctgtactggagacatgc
SBP2	13	5'-ggtggtgatgaccagtttc	5'-agttcgtccatcccctctg
THRB1	42	5'-ttggcatggcaacagattt	5'-ccggttctcctctatcagctt
THRA1	40	5'-ggctgtgctgctaagtcaa	5'-tgactcttctcgatcttgcca
RXRA	26	5'-acatgcagatggacaagacg	5'-gagagccccttgagtcag
RXRB	66	5'-agctccccaggattctc	5'-cagggagtgacactggtgagtt
RXRG	81	5'-tgtcatgggcatgaagagg	5'-cctcactctcagctcgctct
SRC-1	15	5'-tgcagcagaatgtcttcag	5'-aaagttggcctcaccttgg
NCoR1	88	5'-gtcgcttccactgtttctgc	5'-tcgagaagtagcatttcagga
SMRT	25	5'-agcggaaatgaggaggagat	5'-ctcattcccagaggcatgtaa
UCP3	12	5'-atggacgcctacagaacat	5'-tgatgttgggcaaagttcct

Tabla 5: Genes en los que se midió la expresión, sondas y oligonucleótidos empleados para su cuantificación.

4.6. CUANTIFICACION DE LA EXPRESION DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOT.

Dado que mediante qPCR se encontró que los pacientes con SEET expresaban menos THRB1, THRA1 y RXRG, tanto en tejido muscular como en tejido graso subcutáneo, respecto a los controles, se procedió a comprobar que esta menor expresión génica tenía repercusión a nivel

proteico. Para ello, se comprobó mediante western blot la expresión de las proteínas TR β , TR α , y RXR gamma.

Las proteínas se extrajeron de los tejidos sometiendo a éstos a homogeneizado con sonicador en buffer de lisis frío (150 mM de NaCl; 50 mM de Tris pH 7,5; 1% de NP40; 0,1% de SDS; 0,5% de deoxicolato sódico, añadiendo en fresco: 1 mM de DTT, 1 mg/ml de aprotinina, 20 mM de ortovanadato, 10 mg/ml de PMSF); 200 microl de tampón de lisis por cada 200 microg de tejido fueron añadidos, manteniendo el extracto celular en hielo durante 30 minutos, y agitándolo cada 10 minutos, tras lo cual se centrifugó (14.000 r.p.m, 10 minutos, 4°C), recogiendo el sobrenadante. Las proteínas (2 microlitros) se cuantificaron mediante el método de Bradford con el BioRad Protein Assay, utilizando BSA para realizar la recta patrón.

Una vez extraídas las proteínas, las muestras (40 microg/microl) se calentaron durante 5 minutos a 95°C en un buffer de carga (50% de glycerol, 10% de SDS, 5% de beta mercaptoetanol; 0,5% de azul de bromofenol; 0,4 M de Tris, pH 6,8, realizando la electroforesis en geles de poliacrilamida al 10%, en condiciones desnaturalizantes:

Preparación Archilamida/bisacrilamida: 146 g de archilamida, 4 g de bisacrilamida (en 500 ml de agua destilada) y filtración a través de un papel de filtro, guardándolo en oscuridad a 4°C.

Gel separador (10%) (para 10 ml de gel): 4 ml de agua destilada; 3,3 ml de acrilamida:bisacrilamida; 2,5 ml de Tris 1,5M (pH 8,8); 0,1 ml de SDS (10%), 0,1 ml de APS 0,004 ml de TEMED.

Gel stack(para 5 ml de gel): 3,4 ml de agua destilada; 0,83 ml de acrilamida:bisacrilamida; 0,63 ml de Tris 1M (pH 6,8); 0,05 ml de SDS (10%), 0,05 ml de APS, 0,005 ml de TEMED.

Running Buffer (5x). Para 1 l: 15,1 g de Tris, 94 g de Glicina, 25 ml de SDS (20%).

Posteriormente, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Una vez finalizada la transferencia en el tampón Tris-glicina a 0.3 Amp durante 2 horas, las membranas se bloquearon en agitación durante 12 horas a 4°C.

Tampón de transferencia (para 2 l): 6 g de Tris, 28,8 g de Glicina, 400 ml de metanol

Solución de bloqueo: Leche en polvo desnatada al 5% en PBS , 0,1% de Tween 20.

A continuación, las membranas se incubaron 1 hora con el primer anticuerpo en solución de bloqueo a temperatura ambiente. Tras la incubación, la membrana se lavó durante 90 minutos, efectuando un cambio de la solución de lavado cada 10 minutos. Posteriormente, la membrana se incubó en solución de bloqueo durante 1 hora en agitación con un segundo anticuerpo conjugado con peroxidasa. Tras los lavados, la actividad peroxidasa se detectó con el sistema de quimioluminiscencia ECL seguido de la exposición y revelado de una película fotográfica.

Solución de lavado: PBS, 0,1% de Tween 20.

4.7.DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LAS DEYODINASAS EN TEJIDO MUSCULAR Y TEJIDO ADIPOSO.

Las muestras de músculo esquelético y tejido adiposo subcutáneo fueron homogeneizadas en hielo en 10 volúmenes del tampón PED (100 mM de fosfato, 2 mM de EDTA y 10 mM de DTT, con un pH de 7,2). La concentración de proteínas fue determinada por la técnica de Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad, Holanda) siguiendo las instrucciones del fabricante.

La actividad de la D1 fue medida por incubación doble de 50 microl de cada homogeneizado con 0,1 micromoles ($3',5'-^{125}\text{I}$)rT3 (200000 cpm) en un volumen final de 100 microl de tampón PED durante 4 horas a 37°C. La reacción fue detenida por la adición de 0,1 ml de etanol helado. Después de la centrifugación, 0,1 ml del sobrenadante fue añadido a 0,1 ml de 0,02M de tampón de acetato de amonio (pH 4), y 0,1 ml de la mezcla fue analizada en una columna de 4,6 x 250 mm del Symmetry C18 conectado a un sistema Alliance HPLC (Waters, Holanda). Para la elución de la columna se empleó un gradiente lineal de acetonitrilo (28-42% en 15 minutos) en acetato de amonio (pH 4) con un flujo de 1,2 ml/min. La radioactividad del producto eluido fue medida directamente empleando un detector de centellografía Radiomatic A-500 (Packard, Meriden, CT).

Las actividades de la deyodinasa tipo 2 y 3 fueron determinadas como previamente se ha descrito para la D1 con pequeñas modificaciones. La incubación doble fue hecha con 50 microl del homogeneizado y 1 nmol de ($3',5'-^{125}\text{I}$)T4 (200000 cpm) para la D2 y 1

nmol ($3'$ - ^{125}I)T3 (200000 cpm) para la D3, en un volumen final de 100 microl de tampón PED durante 4 horas a 37°C. Para la determinación de la actividad de la D2 la incubación fue realizada en presencia de 0,1 micromol de T3 no marcada, para evitar la deiodinación del anillo interno del sustrato de T4 marcada y de la T3 generada por la D3. Las reacciones fueron paradas por la adición de 0,1 ml de etanol helado. El resto del procedimiento fue llevado a cabo según se ha descrito anteriormente en la determinación de la actividad de la D1.

4.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Los datos obtenidos fueron analizados empleando el programa SPSS 12.0 para Windows (SPSS, Chicago, IL). Los resultados han sido expresados como media \pm SD, mediana y rango. Para la comparación de los grupos se empleó el test de Student para variables paramétricas o el test de Mann-Whitney para valores no paramétricos, según fuera el adecuado.

5. RESULTADOS

5.1.DATOS ANTROPOMÉTRICOS Y ANÁLISIS SÉRICOS.

La edad, el sexo, el índice de masa corporal (IMC) y los datos bioquímicos relevantes se muestran en la Tabla 6. Como se aprecia, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la edad, el sexo y el índice de masa corporal de ambos grupos. Los pacientes con Síndrome del Enfermo Eutiroideo mostraron niveles séricos más bajos de TSH y FT3, y niveles más elevados de rT3 respecto a los controles. No existieron diferencias estadísticamente significativas en los niveles séricos de FT4 entre ambos grupos. El cortisol sérico resultó más elevado en el grupo con SEET que en el control. La cifra total de linfocitos, los niveles séricos de albúmina, transferrina y selenio fueron más bajos en el grupo con SEET que en el control. Los niveles de TNF α , IL-6, IL-8 y receptores para IL-2 estaban más elevadas en el grupo con SEET que en los pacientes del grupo control.

	Control	Shock séptico con SEET	<i>p</i>
Edad	66.37 ± 12.47 69 (37-78)	71.31 ± 8.27 73 (58-83)	ns
IMC (kg/m ²)	28.39 ± 2.20 28.09 (25.48-32.06)	30.73 ± 4.52 29.44 (26.25-40.07)	ns
Linfocitos 10 ⁵ /l	2176.5 ± 702.3 1900 (1200-4100)	748.5 ± 375.2 650 (400-1600)	<0.001
Albúmina (g/dl)	4.20 ± 0.36 4.2 (3.70-5)	2.04 ± 0.57 1.90 (1-3)	<0.001
Transferrina (mg/dl)	217.70 ± 47.47 222 (107-264)	115 ± 47.48 117 (38-207)	<0.001
TSH (mUI/l)	2.35 ± 1.17 2.38 (0.55-4.02)	1.02 ± 2.45 0.26 (0.02-9.09)	<0.01
FT4 (pmol/l)	16.67 ± 3.08 17.05 (11.79-20.64)	14.36 ± 6.41 13.84 (5.12-26.15)	ns
FT3 (pmol/l)	4.83 ± 0.61 5.02 (4.04-5.34)	1.93 ± 0.58 1.84 (1.15-2.72)	<0.001
rT3 (nmol/l)	0.29 ± 0.09 0.28 (0.18-0.41)	1.18 ± 0.57 1.10 (0.49-2.00)	<0.001
Cortisol (microg/dl)	15.81 ± 6.28 15 (4-28)	45.61 ± 24.72 39 (11-98)	<0.01
Selenio (micromol/l)	0.45 ± 0.10 0.46 (0.25-0.56)	0.31 ± 0.12 0.29 (0.18-0.63)	<0.01
TNFα (pg/ml)	6.57 ± 2.52 5.80 (4.1-14.9)	38.53 ± 26.73 28.8 (9.1-94.1)	<0.001
IL-6 (pg/ml)	4.80 ± 4.67 2.9 (2-21)	1383 ± 2562 125 (11.2-8486)	<0.001
Il-8 (pg/ml)	9.70 ± 5.88 10 (0-18)	444.15 ± 999.6 71 (10-3673)	<0.001
IL-2R (UI/ml)	431.52 ± 162.24 419 (225-813)	3565.4 ± 2969.5 3099 (366-12048)	<0.01

Tabla 6: Datos antropométricos y bioquímicos de los grupos control y shock séptico con SEET. Los datos se expresan como media ± desviación estándar (arriba), mediana (abajo) y rango (abajo, paréntesis).

5.2.EXPRESIÓN DE GENES POR qPCR.

En la Figura 4 se muestran, en el grupo control, la expresión relativa en el tejido adiposo subcutáneo y músculo esquelético de los genes estudiados: THRA1, THRB1, RXRA, RXRB, RXRG, MCT8, SRC-1, NCoR1, SMRT, DIO1, DIO2, SBP2 y UCP3. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el músculo esquelético y el tejido adiposo subcutáneo en lo que se refiere a THRB1, RXRA, NCoR1 o SMRT. El tejido adiposo subcutáneo mostró niveles de expresión más altos para MCT8 (casi 13 veces) y THRA1 (1,8 veces) y una expresión más baja de RXRB (2,7 veces), RXRG (4,6 veces), SRC-1 (2,2 veces), DIO2 (39 veces), SBP2 (340 veces) y UCP3 (5 veces). Los niveles de expresión de la DIO1 fueron muy bajos en los dos tejidos (no se representa).

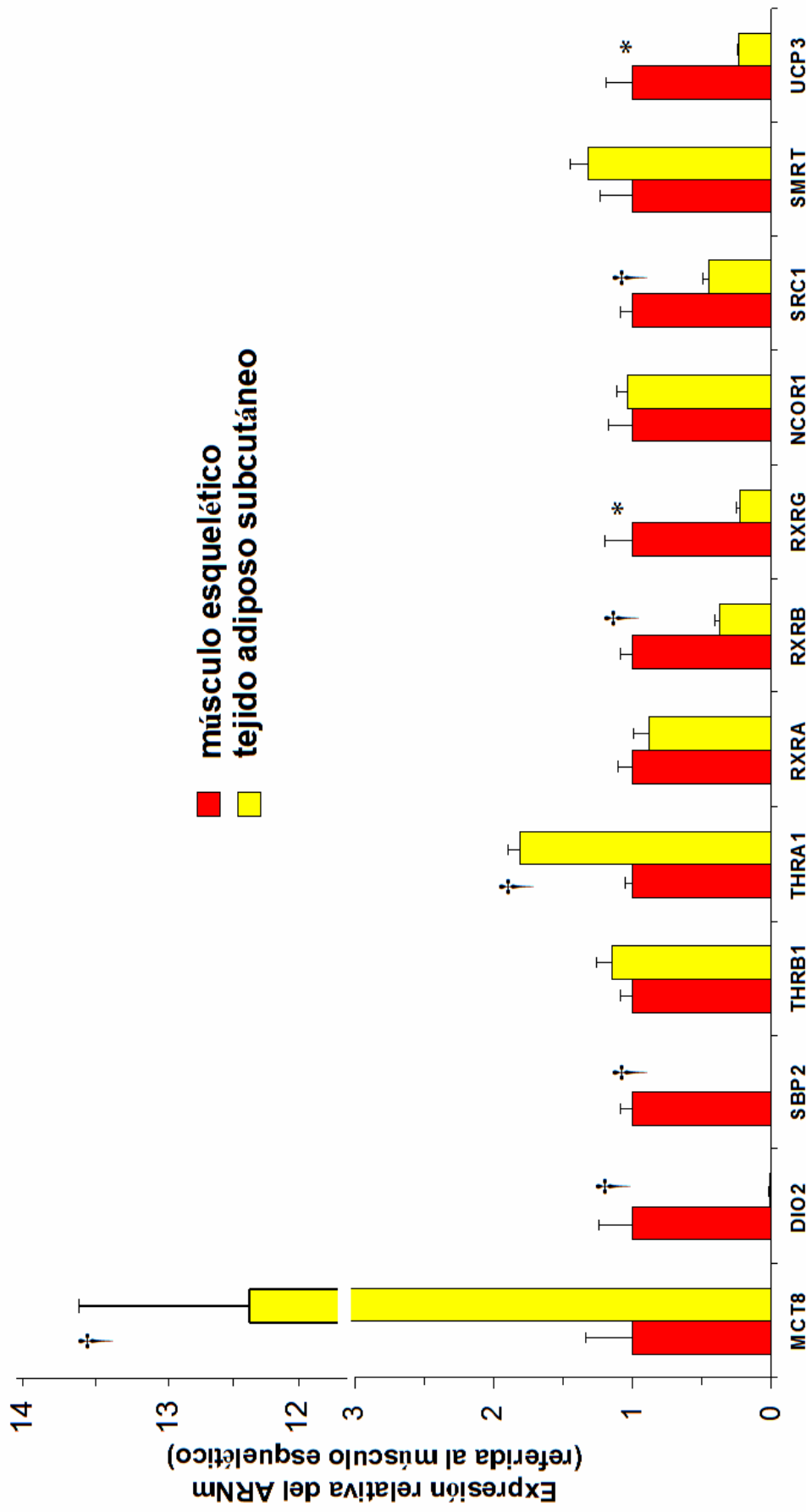


Figura 4: comparación de la expresión de los genes estudiados entre el músculo esquelético y el tejido adiposo subcutáneo en el grupo control (*p<0.05, †p<0.01).

Se observaron diferencias en la expresión de genes específicas para cada tejido entre los grupos control y con SEET. El músculo esquelético de los pacientes con SEET en comparación con el grupo control mostró una expresión más baja de DIO2 (2,9 veces), THRB1 (1,6 veces), y RXRG (5 veces); y una expresión más alta para RXRA (1,7 veces). No se observaron diferencias significativas entre ambos grupos en lo que se refiere a MCT8, SBP2, THRA1, RXRB, NCoR1, SRC-1, SMRT o UCP3 (Figura 5). El tejido adiposo subcutáneo del grupo que desarrollo SEET mostró una expresión más baja si lo comparamos con el mismo tejido del grupo control en lo que se refiere a MCT8 (3,4 veces), THRB1 (1,5 veces), THRA1 (1,5 veces), RXRG (1,8 veces) y SMRT (1,6 veces); y unos niveles de expresión más altos de UCP3 (1,6 veces). No se encontraron diferencias para la DIO1, DIO2, SBP2, RXRA, RXRB, NCoR1 o SRC-1 (Figura 6).

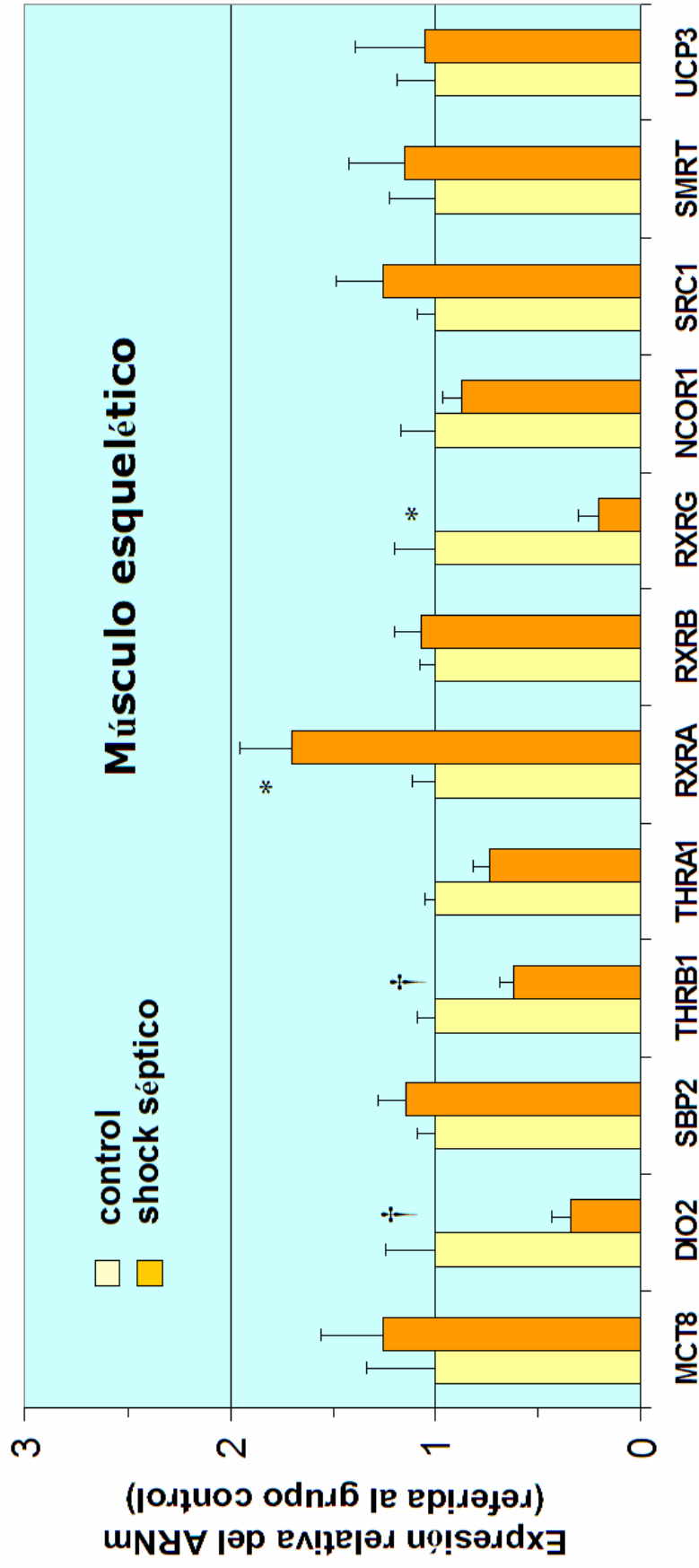


Figura 5: comparación en la expresión del ARNm de los genes estudiados en el músculo esquelético entre el grupo control y los pacientes con shock séptico que presentaron SEET (* $p < 0.05$, $tp < 0.01$).

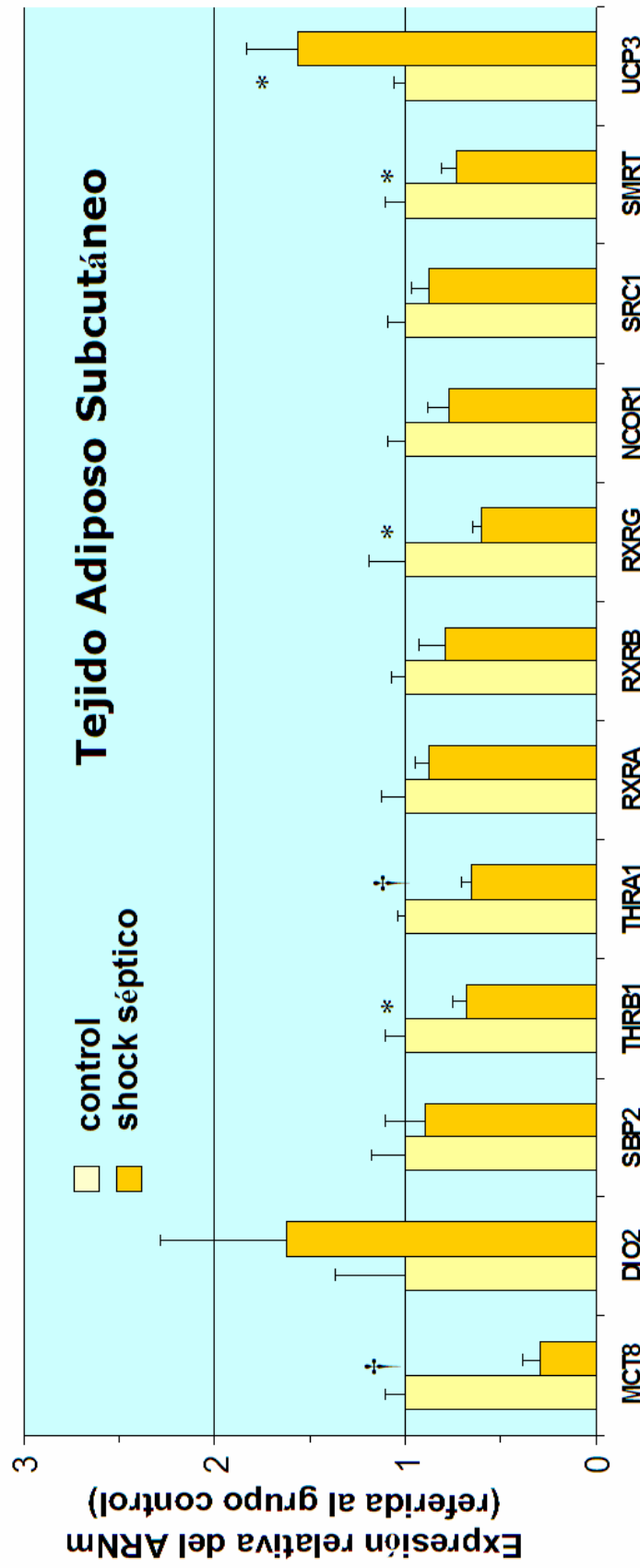


Figura 6: comparación en la expresión del ARNm de los genes estudiados en el tejido adiposo subcutáneo entre el grupo control y los pacientes con shock séptico que presentaron SEET (*p<0.05, †p<0.01).

5.3. EXPRESIÓN DE TR α , TR β y RXR γ EN TEJIDO MUSCULAR.

Debido a la escasez de muestras tisulares de los pacientes, sólo se pudieron determinar las expresiones proteicas de TR α , TR β y RXR γ en tejido muscular de algunos pacientes. Los pacientes con shock séptico y SEET presentaron un descenso en la expresión de las tres proteínas respecto a los controles, de acuerdo a lo observado en la expresión génica. Reseñar que como proteína control no se pudo utilizar la proteína habitual, tubulina, ya que ésta también disminuyó de forma importante en los enfermos sépticos con SEET, cuyo significado desconocemos. Por ello, se empleo como controles proteínas de membrana cuya cuantificación se realizó mediante tinción de Ponceau (figura 7 y 8).

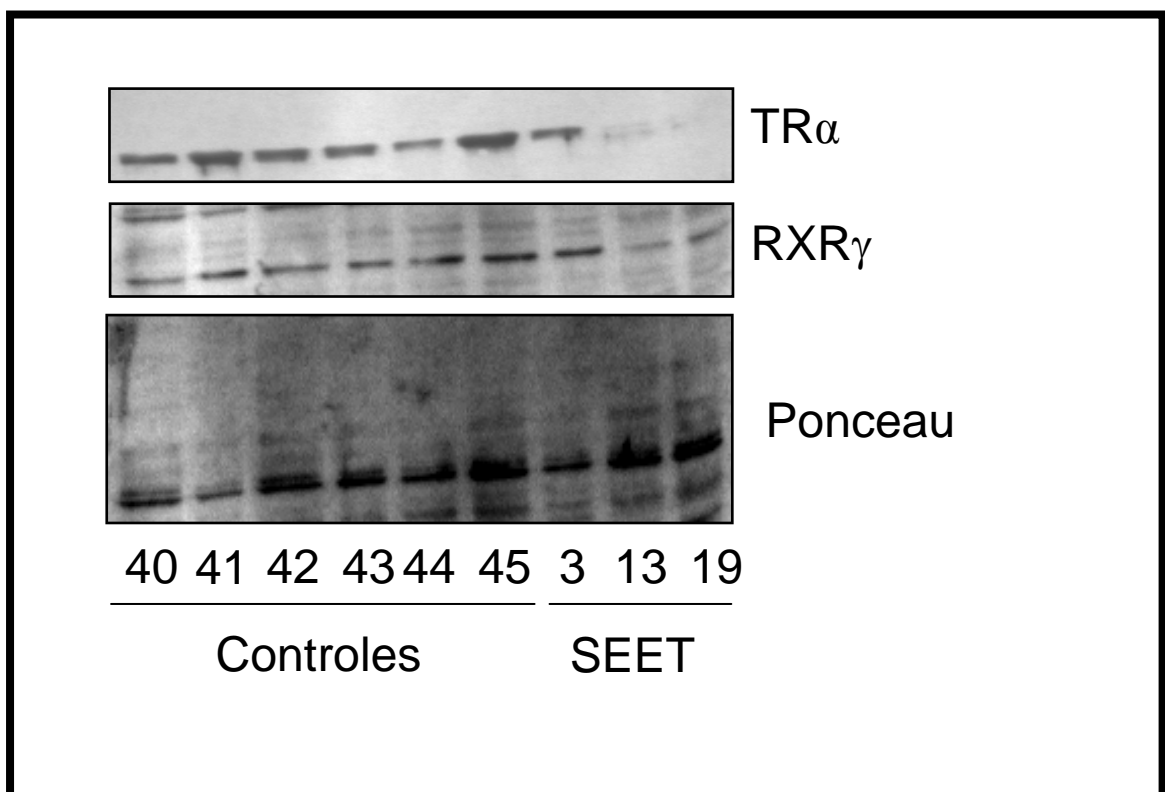


Figura 7: Las expresión de las proteínas TR α (imagen superior) y RXR γ (imagen medio) disminuyó en enfermos con SEET respecto a los pacientes controles. Como proteína de control se empleó la tinción de Ponceau con la que se tiñen las proteínas de membrana.

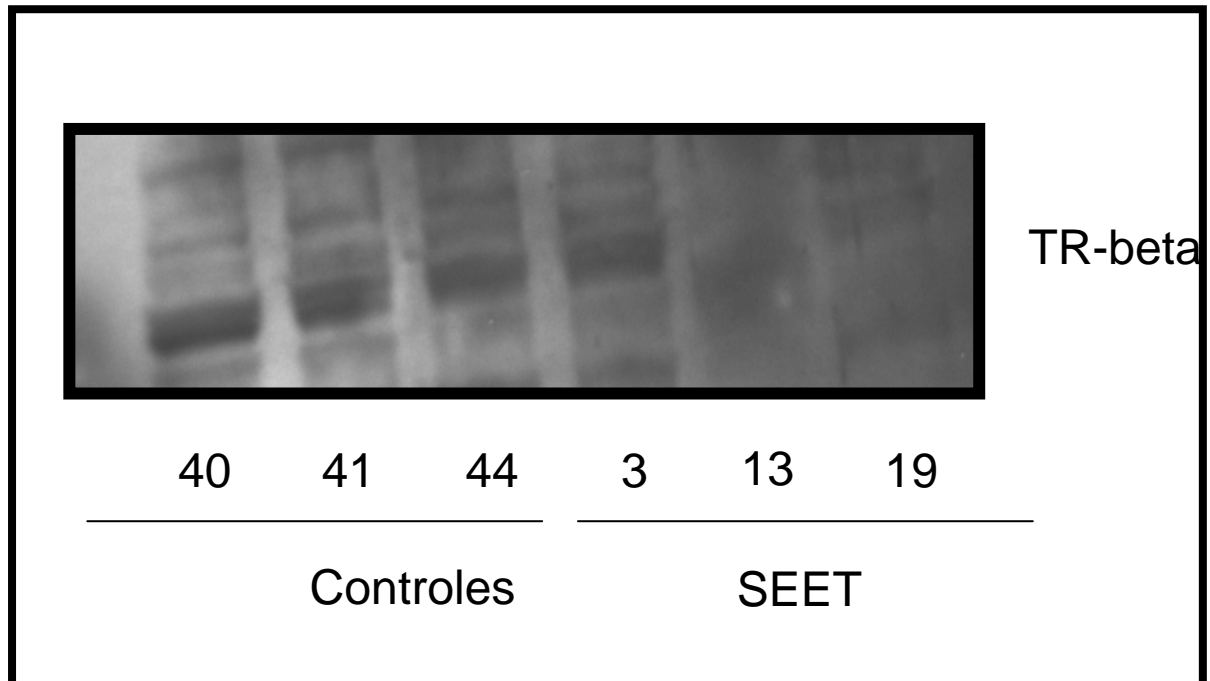


Figura 8: Las expresión de la proteína TRbeta también disminuyó en enfermos con SEET respecto a los pacientes controles.

5.4.ACTIVIDAD DE LAS DEYODINASAS TISULARES.

En el músculo esquelético se detectó actividad de yodinasas 2 y 3, y no se encontró actividad de yodinasas 1. Los pacientes con SEET presentaron mayor actividad D3 respecto a los controles ($0,38 \pm 0,33$ fmol/mg por minuto en pacientes con SEET versus $0,05 \pm 0,03$ fmol/mg por minuto en controles, $p < 0,01$). A pesar de que la actividad D2 se encontró en el músculo de todos los controles y sólo fue posible

demostrarla en el 50% de las muestras de músculo esquelético de pacientes con SEET, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos ($0,01 \pm 0,01$ fmol/mg por minuto en el grupo con SEET versus $0,009 \pm 0,009$ fmol/mg por minuto en el grupo control, ns).

En el tejido adiposo subcutáneo se detectó actividad D1 y D3 y no se detectó actividad D2. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos en actividad D1 ($0,18 \pm 0,18$ pmol/mg por minuto en el grupo con SEET versus $0,11 \pm 0,07$ pmol/mg por minuto en el grupo control, ns) ni en la actividad de la D3 ($0,25 \pm 0,24$ fmol/mg por minuto en pacientes con SEET versus $0,17 \pm 0,13$ fmol/mg por minuto en controles, ns) (Figura 9).

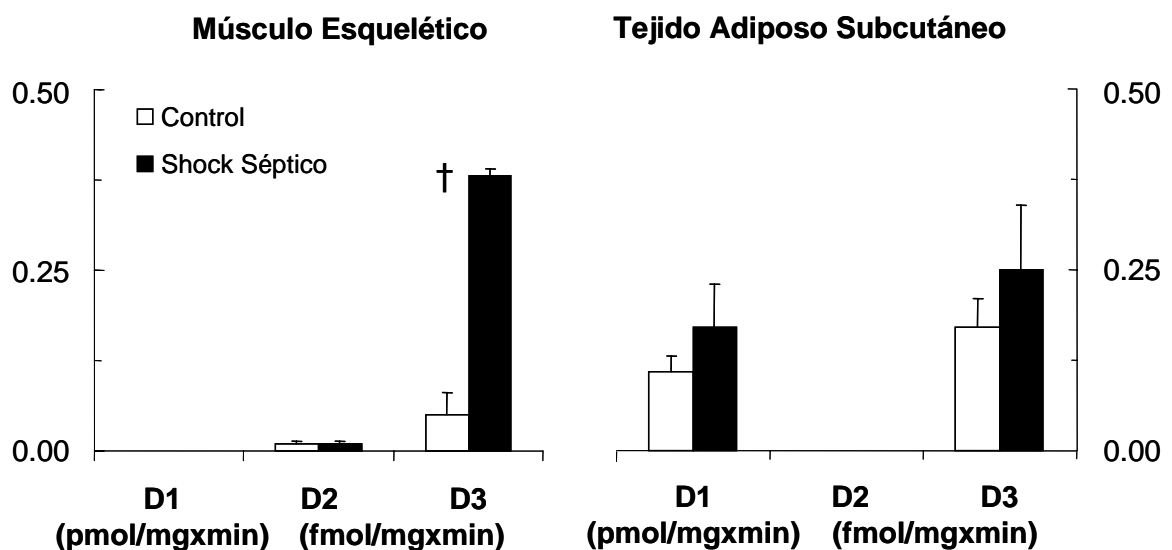


Figura 9: comparación de la actividad de las deiodinasas tipo 1, 2 y 3 (D1,D2 y D3) entre el grupo control y shock séptico con SEET en el músculo esquelético y en el tejido adiposo subcutáneo († $p < 0.01$).

6.DISCUSIÓN

Los estudios de los mecanismos moleculares implicados en el Síndrome del Enfermo Eutiroido en humanos son escasos (13), centrándose, principalmente, en las alteraciones en las actividades de las deydinasas en muestras de hígado y músculo esquelético, obtenidas de pacientes fallecidos que habían desarrollado SEET en Unidades de Cuidados Críticos(32).

Se cree que el descenso de la T3 y el aumento de rT3 séricas, en pacientes con SEET, están causados por la disminución de la actividad de la D1 hepática y la D2 del músculo esquelético, y por el incremento de la actividad o de la expresión de la D3 de estos tejidos (32).

En el presente estudio, hemos encontrado que el músculo esquelético de pacientes con SEET expresa ARN mensajero de D2 y tiene actividad de D2; sin embargo, no hemos encontrado expresión ni actividad de D1. Los pacientes con shock séptico que desarrollan SEET presentan niveles significativamente más bajos de expresión de ARN mensajero de D2 en el músculo comparados con los pacientes control. Además, en el 50% de las muestras de músculo esquelético del grupo de pacientes con SEET se ha encontrado también actividad D2, hallazgo que contrasta con los estudios previos en los que no se encontró actividad D2 (32). El hecho de que nuestras muestras fueron tomadas en individuos vivos, en lugar de fallecidos, podría explicar estas diferencias.

Al contrario que en las muestras de los pacientes con SEET, todas las muestras de músculo esquelético procedentes del grupo control presentaban actividad de la D2, aunque sus niveles de actividad en general fueron muy bajos. No se encontraron diferencias estadísticamente

significativas en la actividad de la D2 del músculo esquelético entre el grupo control y el de los pacientes con SEET, lo que probablemente obedece a la gran dispersión encontrada en la actividad D2 en el grupo de SEET, que van desde valores indetectables a actividades superiores al grupo control.

Encontramos actividad D3 en músculo esquelético, tanto de controles como de SEET; este hallazgo sugiere que D3 tiene un papel fisiológico en el metabolismo de las hormonas tiroideas en el músculo esquelético. Los pacientes con SEET presentaron valores de actividad D3 en músculos esquelético muy superiores a los controles, lo que sugiere que, durante el SEET asociado a shock séptico, existe un aumento en la conversión de T4 en rT3 y en la degradación de la T3 a T2 a nivel de músculo esquelético y que, posiblemente, éste sea un mecanismo implicado en los cambios del metabolismo de las hormonas tiroideas que tienen lugar en el shock séptico de pacientes con SEET.

En tejido adiposo subcutáneo se encontró actividad D1 y D3, no encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y SEET. Estos resultados sugieren que los cambios en los niveles de expresión de las deiodinasas y de sus actividades en el tejidos adiposo no están implicadas el SEET de enfermos sépticos, de modo que los cambios en la actividad de las deiodinasas son tejido-específicos, y no implicarían al tejido adiposo. No somos conocedores de ninguna comunicación previa sobre la actividad de la D3 en el tejido adiposo subcutáneo en humanos.

Las deydinasas son selenoproteínas y, tanto la deficiencia de selenio como mutaciones en la proteína transportadora encargada de la inserción de la selenocisteína en la molécula (SBP2), son una causa de bajos niveles séricos de T3 (40, 63), debido a una menor conversión de T4 en T3 en tejidos periféricos, principal fuente de T3 sérica, que además es la hormona biológicamente más activa. En el presente estudio, los niveles plasmáticos de selenio fueron bajos en ambos grupos, aunque en el grupo con SEET los pacientes presentaron niveles de selenio más bajos que en el grupo control. No obstante, estudios previos en pacientes críticamente enfermos que desarrollaron SEET encontraron que no existe un efecto directo de la administración de suplementos de selenio sobre los niveles de hormonas tiroideas (41). Ello sugiere que las alteraciones sistémicas, iniciadas por la enfermedad primaria, son las responsables de la coincidencia de selenio plasmático bajo y baja T3. De hecho, los resultados del presente estudio no demuestran actividades de la deydinasa más bajas en los pacientes con SEET, que tenían niveles plasmáticos de selenio más bajos. Del mismo modo, no se encontraron diferencias en los niveles de expresión del ARN mensajero de SBP2 entre controles y pacientes con SEET, lo que refuerza la idea de que el selenio no juega un importante papel en los niveles de T3 bajos vistos en el SEET. Curiosamente, los niveles de expresión del ARN mensajero de SBP2 fueron mucho más bajos en el tejido adiposo subcutáneo que en el músculo esquelético, lo que sugiere que las deydinasas requieren niveles mucho más bajos de SBP2 en el tejido adiposo subcutáneo, aunque también los niveles de expresión de las deydinasas fueron muchos más bajos en el tejido adiposo que en el músculo esquelético.

La captación de hormonas tiroideas está disminuida en los tejidos de pacientes con SEET (25, 26 y 64). Varios factores, como los ácidos grasos no esterificados y la bilirrubina, han sido identificados como inhibidores de la captación celular de T4 en hepatocitos de rata, aunque su mecanismo de acción permanece desconocido (27). Nuestros estudios revelan que la expresión de MCT8, un transportador selectivo de hormonas tiroideas localizado en la membrana plasmática (65), es más alta en tejido adiposo subcutáneo que en músculo esquelético (tanto en el grupo control como en pacientes con SEET), y una disminución significativa en la expresión de MCT8 en el SEET con respecto a los controles fue observada sólo en el tejido adiposo. Estos datos, junto con nuestros resultados en la actividad tisular de la deiodinasa, sugieren que la biodisponibilidad de las hormonas tiroideas en pacientes con shock séptico que desarrollan SEET están seriamente disminuida por cambios en la actividad de la deiodinasa, especialmente en músculo esquelético, pero debería mediar una disminución en el transportador de las hormonas tiroideas, como ocurre con el MCT8 del tejido adiposo.

La expresión génica y proteica de los receptores nucleares de hormonas tiroideas está disminuida en pacientes con shock séptico asociado a SEET: la expresión de THRB1 disminuyó en músculo esquelético y tejido adiposo subcutáneo, mientras que la expresión de THRA1 disminuyó en tejido adiposo subcutáneo. Estos hallazgos son similares a los encontrados en ratones después de la administración de lipopolisacáridos de membranas bacterianas (LPS), que da lugar a una disminución en las proteínas TR α 1, TR α 2, TR β , y en la expresión de su ARNm a nivel hepático, grasa blanca y corazón (45,46). Curiosamente,

estudios previos en humanos encontraron un incremento de concentraciones de ARNm de THRA y THRB en células mononucleares periféricas de pacientes con SEET debido a enfermedad hepática o fallo renal crónico; sin embargo, cuando las células se obtuvieron en las primeras 48 horas después del ingreso en la Unidad de Cuidados Críticos (47), dicho incremento no se observó. Un reciente estudio, en el que se realizaban biopsias hepáticas de pacientes críticamente enfermos que fallecieron en la Unidad de Cuidados Críticos, demostraba que la relación en la expresión de ARNm de las dos isoformas de THRA, TR α 1/ TR α 2, era más alta en pacientes con enfermedad más grave (66). Esto llevó a postular que el aumento en la expresión de los receptores nucleares para las hormonas tiroideas podría suponer un incremento de la sensibilidad hormonal, para compensar la disminución de la biodisponibilidad de la T3, en un intento de mantener su actividad biológica(47,66). Sin embargo, en seis de los pacientes que fallecieron después de una muy corta estancia en la Unidad de Cuidados Críticos, la ratio TR α 1/ TR α 2 no fue diferente de la vista en los controles (66). Coincidiendo con nuestros resultados, se observó que la expresión de los genes de THR disminuye durante la fase aguda de una enfermedad grave.

Las tres isoformas de RXR se expresan en el músculo esquelético y el tejido adiposo subcutáneo. En los tejidos de los sujetos control, la isoforma más abundante fue la RXRA, mientras que la expresión de RXRB y RXRG fue más alta en el músculo esquelético que en el tejido adiposo subcutáneo. En roedores, la administración de LPS indujo una disminución de las tres isoformas de RXR en hígado (45) y corazón (46), la cual, junto con una disminución en los receptores de hormonas tiroideas, PPARalfa,

PPARgamma y los coactivadores CBP/300, SRC-1, SRC-3, TRAP220 y PGC1, ayudan a explicar la disminución de la expresión de proteínas requeridas para la oxidación de ácidos grasos, observada durante la sepsis en estos modelos animales (46). Curiosamente en nuestros resultados, en los pacientes con shock séptico que desarrollan SEET respecto al grupo control, la expresión de ARNm de RXRG estaba disminuida en músculo esquelético y tejido adiposo subcutáneo, la expresión de RXRA estaba aumentada en músculo esquelético, mientras que la expresión de RXRB no mostró cambios, tanto en músculo esquelético como en tejido adiposo subcutáneo. Los RXRs juegan un importante papel en el metabolismo del músculo esquelético, aumentando la captación y la oxidación de ácidos grasos saturados y, por lo tanto, aumentando la cantidad de ácidos grasos insaturados sobre los saturados. Más aún, los ratones con deficiencia de RXRG tienen aumentada la actividad de la lipoproteín lipasa del músculo esquelético y niveles más bajos de triglicéridos (67). Los cambios en la expresión de las isoformas de RXR, vistas en las muestras de músculo esquelético y el tejido adiposo subcutáneo de los pacientes con shock séptico que han desarrollado un SEET, parecen estar dirigidas a una disminución de la resistencia a la insulina y un desplazamiento en la producción de ATP desde la grasa hacia el músculo esquelético durante el shock séptico.

En los humanos, la T3 incrementa la termogénesis, favoreciendo el desacoplamiento mitocondrial de la producción energía en el músculo esquelético (68). La T3 incrementa la expresión del UCP3 en el músculo esquelético, y se ha sugerido que el desacoplamiento energético promovido por la T3 debería estar parcialmente mediado a través de este

mecanismo (68-70). La administración de suplementos de T3 en voluntarios sanos provocó un incremento del metabolismo basal y un descenso del cociente respiratorio, que coincidió con elevación de la expresión del ARNm de UCP2 y UCP3 (69). Sin embargo, el posible papel de la UCP3 como proteína desacopladora es cuestionable, y se ha postulado que el incremento mediado por hormonas tiroideas en la expresión de la UCP3 estaría provocado, probablemente, por una elevación de los niveles séricos de ácidos grasos, y se baraja más su papel como transportador mitocondrial, aunque a día de hoy se desconocen cuales serían sus moléculas diana (71). En relación con esto, los niveles bajos de T3 libre, observados en pacientes con shock séptico que desarrollaron SEET, no estuvieron acompañados por una disminución de la expresión del ARNm del UCP3. Curiosamente, nuestros hallazgos sobre la expresión de la UCP3 en pacientes con shock séptico que habían desarrollado SEET fueron tejido específicos: la expresión aumentó en el tejido adiposo subcutáneo, y no se demostraron cambios en el músculo esquelético. Estos datos sugieren que la expresión de la UCP3 está regulada por vías diferentes en el músculo esquelético y en tejido adiposo subcutáneo durante el shock séptico, y que, en el shock séptico en pacientes con SEET, la expresión de la UCP3 está regulada por otros factores distintos de las hormonas tiroideas.

En los ratones, la sepsis disminuye la expresión de SRC-1 en el corazón (46). Las citoquinas, como la IL-1 y la IL-6, empeora la capacidad de la T3 para inducir la expresión de la D1 en cultivos primarios de hepatocitos de ratón, y la expresión forzada de la SRC-1 previene este efecto de las citoquinas (72). Igualmente, la disminución en los niveles

hepáticos de D1 y plasmáticos de T3, en ratones inducidos por la LPS, se evitaron con la administración previa de un adenovirus que induce la expresión de SRC-1 (72). En resumen, estos datos sugieren que durante la sepsis en los ratones se produce una disminución citoquina-inducida en la SRC-1, que participa en la aparición de SEET, y que el SEET podría ser evitado por una expresión forzada del coactivador SRC-1 (72). No obstante, en el presente estudio no hemos observado ningún cambio en la expresión del ARNm del coactivador SRC-1, tanto en el músculo esquelético como en el tejido adiposo subcutáneo. De hecho, los datos que hemos obtenido en humanos sugieren que los distintos receptores para las hormonas tiroideas y RXRs, SRC-1 y NCoR1 no están afectados por los mecanismos moleculares que provocan el SEET durante el shock séptico, aunque no se puede descartar una respuesta a nivel de otros tejidos. Del mismo modo, las concentraciones intracelulares de estos coactivadores de la transcripción genética, sobre los que actúan las hormonas tiroideas, son bajas y carecen de especificidad por el receptor (49), de manera que la situación de estrés metabólico que supone la sepsis, podría desplazar a estos mediadores hacia tareas distintas de la acción hormonal, concentrándose en traducir las órdenes inducidas por las citoquinas (37). Sorprendentemente, el correpressor nuclear SMRT muestra disminución en el tejido adiposo subcutáneo de los pacientes con shock séptico que desarrollaron SEET; el significado de este hallazgo requiere estudios posteriores.

7.CONCLUSIONES

En conclusión, los pacientes con shock séptico que desarrollan un síndrome del enfermo eutiroideo muestran cambios en la expresión de varios genes implicados en las acciones de las hormonas tiroideas en el músculo esquelético y el tejido adiposo subcutáneo . La expresión de THRB1 y RXRG disminuye en ambos tejidos, y la expresión de la THRA1 está disminuida en el tejido adiposo, indicando una potencial disminución de la acción de las hormonas tiroideas, al disminuir los receptores nucleares a través de los cuales estas hormonas desencadenan sus efectos de control de la transcripción de sus genes diana.

Los pacientes del grupo del shock séptico con SEET también mostraron una disminución en la expresión de deydinasa tipo 2 y un incremento de la actividad de la deydinasa tipo 3 en el músculo esquelético, lo que explicaría una disminución de la conversión periférica de la T4 en T3 a nivel de este tejido (disminución de la expresión de la deydinasa tipo 2) y un aumento de la degradación de la T3, biológicamente la más activa, en T2 (aumento de la actividad de deydinasa tipo 3). No se demostraron cambios en la expresión de las deydinasas o su actividad en el tejido adiposo. Se demostró actividad de la D3 en músculo esquelético y tejido adiposo subcutáneo de pacientes sanos, en contra de referencias encontradas en estudios anteriores (32), en los que se sugería que la isquemia celular, ocasionada por los cambios hemodinámicos de la sepsis, induciría la expresión y la actividad de la D3, que podrían representar cambios tejido-específicos encaminados a reducir la actividad biológica de las hormonas tiroideas durante la hipoxia.

Considerando todo ello, junto con los hallazgos que encontramos de disminución de la expresión del transportador de monocarboxilatos 8, MCT8, en el tejido adiposo de los pacientes que desarrollaron SEET, llevaría a un intento de establecer la hipótesis de que el SEET en el shock séptico causa una disminución en la biodisponibilidad de las hormonas tiroideas, que está regulada por vías tejido-específicas: en el tejido adiposo a través de la disminución en la expresión de los transportadores de hormonas tiroideas, y en el músculo esquelético a través de una disminución en la producción e incremento de la degradación de la T3.

8. BIBLIOGRFÍA

1. De Groot LJ. Dangerous dogmas in medicine: the nonthyroidal illness syndrome. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 1999; 84: 151-164.
2. Wartofsky L, Burman KD. Alterations in thyroid function in patients with systemic illness: the "euthyroid sick syndrome". *Endocr Rev*. 1982; 3: 164-203.
3. Hennemann G, Docter R, Krenning EP. Causes and effects of the low T3 syndrome during caloric deprivation and non-thyroidal illness: an overview. *Acta Med Scand*. 1988; 15: 42- 45.
4. Cherem HJ, Nellen HH, Barabejski FG, Chong MBA, Lifshitz GA. Thyroid function and abdominal surgery. A longitudinal study. *Arch Med Res*. 1992; 23: 143-147.
5. Vardarli I, Schmidt R, Wdowinski JM, Teuber J, Schwedes U, Usadel KH. The hypothalamo-hypophyseal thyroid axis, plasma protein concentrations and the hypophyseogonadal axis in low T3 syndrome following acute myocardial infarct. *Klin Wochenschrift*. 1987; 65: 129-133.
6. Eber B, Schumacher M, Langsteger W, et al. Changes in thyroid hormone parameters after acute myocardial infarction. *Cardiology*. 1995; 86: 152-156.
7. Holland FW, Brown PS, Weintraub BD, Clark RE. Cardiopulmonary bypass and thyroid function: a "euthyroid sick syndrome". *Ann Thorac Surg*. 1991;52: 46 -50.

8. Vexiau P, Perez-Castiglioni P, Socie G, et al. The 'euthyroid sick syndrome:' incidence, risk factors and prognostic value soon after allogeneic bone marrow transplantation. *Br J Hematol.* 1993; 85: 778-782.
9. Peeters RP, van der Geyten S, Wouters PJ, Darras VM, van Toor H, Kaptein E, Visser TJ, Van den Berghe G. Tissue thyroid hormone levels in critical illness. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005; 90: 6498-6507.
10. Slag MF, Morley JE, Elson MK, Crowson TW, Nutall FQ, Shafer. Hypothyroxinemia in critically ill patients as a predictor of high mortality. *JAMA.* 1981; 245: 43-45.
11. Ray DC, Macduff A, Drummond GB, Wilkinson E, Adams B, Beckett GJ. Endocrine measurements in survivors and non-survivors from critical illness. *Intensive Care Med.* 2002; 28: 1301-1308.
12. Plikat K, Langgartner J, Buettner R, Bollheimer LC, Woenckhaus U, Scholmerich J, Wrede CE. Frequency and outcome of patients with nonthyroidal illness syndrome in a medical intensive care unit. *Metabolism.* 2007; 56: 239-244.
13. De Groot LJ. Non-thyroidal illness syndrome is a manifestation of hypothalamic-pituitary dysfunction, and in view of current evidence, should be treated with appropriate replacement therapies. *Crit Care Clin.* 2006; 22: 57-86.
14. Stathatos N, Levetan C, Burman KD, Wartofsky L. The controversy of the treatment of critically ill patients with thyroid hormone. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2001; 15: 465-478.

-
15. Stathatos N, Wartofsky L. The euthyroid sick syndrome: is there a physiological rationale for thyroid hormone treatment?. *J Endocrinol Invest.* 2003; 26: 1174-1179.
16. Fliers E, Alkemade A, Wiersinga WM. The hypothalamic-pituitary-thyroid axis in critical illness. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology and Metabolism.* 2001; 15: 453-464.
17. Fliers E, Guldenaar SE, Wiersinga WM, Swaab DF. Decreased Hypothalamic Thyrotropin-Releasing Hormone Gene Expression in Patients with Nonthyroidal Illness. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997; 82: 4032-4036.
18. Van den Berghe G, de Zegher F, Baxter RC, Veldhuis JD, Wouters P, Schetz M, Verwaest C, Van der Vorst E, Lauwers P, Bouillon R, Bowers CY. Neuroendocrinology of prolonged critical illness: effects of exogenous thyrotropin-releasing hormone and its combination with growth hormone secretagogues. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998; 83: 309-319.
19. Fekete C, Gereben B, Doleschall M, Harney JW, Dora JM, Bianco AC, Sarkar S, Liposits Z, Rand W, Emerson C, Kacskovics I, Larsen PR, Lechan RM. Lipopolysaccharide induces type 2 iodothyronine deiodinase in the mediobasal hypothalamus: implications for the nonthyroidal illness syndrome. *Endocrinology.* 2004; 145: 1649-1655.
20. LoPresti JS, Eigen A, Kaptein E, Anderson KP, Spencer CA, Nicoloff JT. Alterations in 3,3',5'-triiodothyronine metabolism in response to propylthiouracil, dexamethasone, and thyroxine administration in man. *J Clin Invest.* 1989; 84: 1650-1656.

21. Bianco AC, Salvatore D, Gerenben B, Berry MJ, Larsen PR. Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of the iodothyronine selenodiodinases. *Endocrine Reviews*. 2002; 23: 38-89.
22. Boelen A, Kwakkel J, Platvoet-ter Schiphorst M, Mentrup B, Baur A, Koehrlé J, Wiersing WM. Interleukin-18, a proinflammatory cytokine, contributes to the pathogenesis of non-thyroidal illness mainly via the central part of the hypothalamus-pituitary-thyroid axis. *European Journal of Endocrinology*. 2004; 151: 497-502.
23. Bartalena L, Bogazzi F, Brogioni S, Grasso L, Martino E. Role of cytokines in the pathogenesis of the euthyroid sick syndrome. *Eur J Endocrinol*. 1998; 138: 603-614.
24. Yamazaki K, Yamada E, Kanaji Y, Shizume K, Wang D-S, Maruo N, Obara T, Sato K. Interleukin-6 (IL-6) inhibits thyroid function in the presence of soluble IL-6 receptor in cultured human thyroid follicles. *Endocrinology*. 1996; 137: 4857-4863.
25. Arem R, Wiener GJ, Kaplan SG, Kim HS, Reichlin S, Kaplan MM. Reduced tissue thyroid hormone levels in fatal illness. *Metabolism*. 1993; 42: 1102-1108.
26. Sarne DH, Refetoff S. Measurement of thyroxine uptake from serum by cultured human hepatocytes as an index of thyroid status: reduced thyroxine uptake from serum of patients with nonthyroidal illness. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 1985; 61: 1046-1052.
27. Lim CF, Docter R, Visser TJ, Krenning EP, Bernard B, van Toor H, de Jong M, Hennemann G. Inhibition of thyroxine transport into cultured rat

hepatocytes by serum of nonuremic critically ill patients: effects of bilirubin and nonesterified fatty acids. *J Clin Endocrinol Metab.* 1993; 76: 1165-1172.

28.Hennemann G, Docter R, Friesema EC, de Jong M, Krenning EP, Visser TJ. Plasma membrane transport of thyroid hormones and its role in thyroid hormone metabolism and bioavailability. *Endocr Rev.* 2001; 22: 451-476.

29.Dumitrescu A, Liao X, Lado-Abeal J, Moeller L, Brockmann K, Refetoff S. On the mechanism producing the unusual thyroid phenotype in defects of MCT8 gene. 30th Annual Meeting of the European Thyroid Association. Estambul.

30.Nguyen TT, Chapa F, DiStefano III JJ. Direct measurement of the contribution of type I and type II 5'-deiodinases to whole body steady state 3,5,3'-triiodothyronine production from thyroxine in the rat. *Endocrinology.* 1998; 139: 4626-4633.

31.Maia AL, Kim BW, Huang SA, Harney JW, Larsen PR. Type 2 iodothyronine deiodinase is the major source of plasma T3 in euthyroid humans. *J Clin Invest.* 2005; 115: 2524-2533.

32.Peeters RP, Wouters PJ, Kaptein E, Van Toor H, Visser TJ, Van den Berghe G. Reduced activation and increased inactivation of thyroid hormone in tissues of critically ill patients. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003; 88: 3202-3211.

33.Hosoi Y, Murakami M, Mizuma H, Ogiwara T, Imamura M, Mori M. Expression and regulation of type II iodothyronine deiodinase in cultured

human skeletal muscle cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999; 84: 3293-3300.

34.Boelen A, Kwakkel J, Alkemade A, Renckens R, Kaptein E, Kuiper G, Wiersinga WM, Visser TJ. Induction of type 3 deiodinase activity in inflammatory cells of mice with chronic local inflammation. *Endocrinology.* 2005; 146: 5128-5134.

35.Boelen A, Platvoet-ter Schiphorst MC, Bakker O, Wiersinga WM. The role of cytokines in the lipopolysaccharide-induced sick euthyroid syndrome in mice. *J Endocrinol.* 1995; 146: 475-483.

36.Jakobs TC, Mentrup B, Schmutzler C, Dreher I, Kohrle J. Proinflammatory cytokines inhibit the expression and function of human type I 5'-deiodinase in HepG2 hepatocarcinoma cells. *Eur J Endocrinol.* 2002; 146: 559-566.

37.Yu J, Koenig RJ. Regulation of hepatocyte thyroxine 5'-deiodinase by T3 and nuclear receptor coactivators as a model of the sick euthyroid syndrome. *J Biological Chemistry.* 2000; 275: 38296-38301.

38.Nagaya T, Fujieda M, Otsuka G, Yang JP, Okamoto T, Seo H. A potential role of activated NF-kappa B in the pathogenesis of euthyroid sick syndrome. *J Clin Invest.* 2000; 106: 393-402.

39.Kwakkel J, Wiersinga WM, Boelen A. Differential involvement of nuclear factor-kappaB and activator protein-1 pathways in the interleukin-1beta-mediated decrease of deiodinase type 1 and thyroid hormone receptor beta1 mRNA. *J Endocrinol.* 2006; 189: 37-44.

40. Dumitrescu AM, Liao X-H, Abdullah SYM, Lado-Abeal J, AbdulMajed F, Moeller LC, Boran G, Weiss RE, Refetoff S. Mutations in the selenocystein insertion sequence binding protein (SBP) 2 produce a thyroid phenotype. *Nature Genetics*. 2005; 37: 1247-1252.
41. Angstwurm MWA, Schopohl J, Gaertner R. Selenium substitution has no direct effect on thyroid hormone metabolism in critically ill patients. *European Journal of Endocrinology*. 2004; 151: 47-54.
42. Bianco AC, Larsen PR. Cellular and structural biology of the deiodinases. *Thyroid*. 2005; 15: 777-786.
43. Cheng SY. Isoform-dependent actions of thyroid hormone nuclear receptors: lessons from knockin mutant mice. *Steroids*. 2005; 70: 450-454.
44. Cheng SY. Thyroid hormone receptor mutations and disease: beyond thyroid hormone resistance. *Trends Endocrinol Metab*. 2005; 16: 176-82.
45. Beigneux AP, Moser AH, Shigenaga JK, Grunfeld C, Feingold KR. Sick euthyroid syndrome is associated with decreased TR expression and DNA binding in mouse liver. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2003; 284: E228-E236.
46. Feingold K, Kim MS, Shigenaga J, Moser A, Grunfeld C. Altered expression of nuclear hormone receptors and coactivators in mouse heart during the acute-phase response. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2004; 286: E201-E207.

47. Williams GR, Franklyn JA, Neuberger JM, Sheppard Mc. Thyroid hormone receptor expression in the "sick euthyroid" syndrome. *Lancet*. 1989; 2: 1477-81.
48. Goodson M, Jonas BA, Privalsky MA. Corepressors: custom tailoring and alterations while you wait. *Nuclear Receptor Signaling*. 2005; 3: e003.
49. Zhang J, Lazar MA. The mechanism of action of thyroid hormones. *Annu Rev Physiol*. 2000; 62: 439-66.
50. Spencer TE, Jenster G, Burcin MM, Allis CD, Zhou J, Mizzen CA, McKenna NJ, Onate SA, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW. Steroid receptor coactivator-1 is a histone acetyltransferase. *Nature*. 1997; 89: 194-8.
51. Weiss RE, Xu J, Ning G, Pohlenz J, O'Malley BW, Refetoff S. Mice deficient in the steroid receptor co-activator 1 (SRC-1) are resistant to thyroid hormone. *EMBO J*. 1999; 18: 1900-04.
52. Lado-Abeal J, Dumitrescu A, Liao X-H, Cohen R, Pohlenz J, Lebrethon M-C, Verloes A, Refetoff S. Resistance to thyroid hormone due to a de-novo mutation in an already mutant nucleotide of the thyroid hormone receptor beta gene. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2005; 90: 1760-7.
53. Basset JHD, Harvey CB, Williams GR. Mechanisms of thyroid hormone receptor-specific nuclear and extra nuclear actions. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2003; 213: 1-11.
54. Krauss S, Zhang C-Y, Lowell BB. The mitochondrial uncoupling-protein homologues. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2005; 6: 248-261.

- 55.Brand MD, Affourtit C, Esteves TC, Green K, Lambert AJ, Miwa S, Pakay JL, Parker N. Mitochondrial superoxide: production, biological effects, and activation of uncoupling proteins. *Free Radical Biology & Medicine*. 2004; 37: 755-767.
- 56.Sun X, Wray C, Tian X, Hasselgren P-O, Lu J. Expression of uncoupling protein 3 is upregulated in skeletal muscle during sepsis. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2003; 250: E512-E520.
- 57.Lanni A, Moreno M, Lombardi A, Goglia F. Thyroid hormone and uncoupling proteins. *FEBS Letters*. 2003; 543: 5-10.
- 58.Incerpi S. Thyroid hormones: rapid reply by surface delivery only. *Endocrinology*. 2005; 146: 2861-2863.
- 59.Bergh JJ, Lin HY, Lansing L, Mohamed SN, Davis FB, Mousa S, Davis PJ. Integrin α V β 3 contains a cell surface receptor site for thyroid hormone that is linked to activation of mitogen-activated protein kinase and induction of angiogenesis. *Endocrinology*. 2005; 146: 2864-2871.
- 60.Knaus WA, Draper EA, Wagner DP, Zimmerman JE. APACHE II: a severity of disease classification system. *Crit Care Med*. 1985; 13: 818-29.
- 61.Dubowitz V. Diagnosis and Classification of Neuromuscular Disorders. In: Dubowitz V, eds. *Muscle disorders in childhood*. 2nd ed. London: Saunders Company Ltd; 1995. p.19-33.
- 62.Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-DDCT method. *Methods*. 2001; 25: 402-408.

- 63.Köhrle J, Jakob F, Contempré B, Dumont JE. Selenium, the thyroid, and the endocrine system. *Endocrine Reviews*. 2005; 26: 944-984.
- 64.Kaptein EM, Kaptein JS, Chang EI, Egodage PM, Nicoloff JT, Massry SG. Thyroxine transfer and distribution in critical nonthyroidal illnesses, chronic renal failure, and chronic ethanol abuse. *J Clin Endocrinol Metab*. 1987; 65: 606-616.
- 65.Friesema EC, Ganguly S, Abdalla A, Manning Fox JE, Halestrap AP, Visser TJ. Identification of monocarboxylate transporter 8 as a specific thyroid hormone transporter. *J Biol Chem*. 2003; 278: 40128-40135.
- 66.Thijssen-Timmer DC, Peeters RP, Wouters P, Weekers F, Visser TJ, Fliers E, Wiersinga WM, Bakker O, Berghe GV. Thyroid hormone receptor isoform expression in livers of critically ill patients. *Thyroid*. 2007; 17: 105-112.
- 67.Haugen BR, Jensen DR, Sharma V, Pulawa LK, Hays WR, Krezel W, Chambon P, Eckel RH. Retinoid X receptor gamma-deficient mice have increased skeletal muscle lipoprotein lipase activity and less weight gain when fed a high-fat diet. *Endocrinology*. 2004; 145: 3679-36857.
- 68.Lebon V, Dufour S, Petersen KF, Ren J, Jucker BM, Slezak LA, Cline GW, Rothman DL, Shulman GI. Effect of triiodothyronine on mitochondrial energy coupling in human skeletal muscle. *J Clin Invest*. 2001; 108: 733-737.
- 69.Barbe P, Larrouy D, Boulanger C, Chevillotte E, Viguerie N, Thalamas C, Oliva Trastoy M, Roques M, Vidal H, Langin D. Triiodothyronine-mediated up-regulation of UCP2 and UCP3 mRNA expression in human

skeletal muscle without coordinated induction of mitochondrial respiratory chain genes. *FASEB J.* 2001; 15: 13-15.

70.Silva JE. Thermogenic mechanisms and their hormonal regulation. *Physiol Rev.* 2006; 86: 435-64.

71.Nedergaard J, Cannon B. The 'novel' 'uncoupling' proteins UCP2 and UCP3: what do they really do? Pros and cons for suggested functions. *Exp Physiol.* 2003; 88: 65-84.

72.Yu J, Koenig RJ. Induction of type 1 iodothyronine deiodinase to prevent the nonthyroidal illness syndrome in mice. *Endocrinology.* 2006; 147: 3580-3585.