



**TESIS
DOCTORAL**

**“IDENTIFICACIÓN DE MECANISMOS
MOLECULARES ASOCIADOS AL
DESARROLLO DEL HIPOTIROIDISMO
CAUSADO POR SHOCK SÉPTICO.”**

Fdo.....

Isabel Castro Piedras

Departamento de Medicina

Facultade de Medicina e Odontoloxía

Santiago de Compostela

2015



AUTORIZACIÓN DO DIRECTOR /TUTOR DA TESE

D. José Joaquín Lado Abeal, Doctor en Medicina y Cirugía, Profesor Titular del Departamento de Medicina de la Universidad de Santiago de Compostela

Como Director da Tese de Doutoramento titulada:

«IDENTIFICACIÓN DE MECANISMOS MOLECULARES ASOCIADOS AL DESARROLLO DEL HIPOTIROIDISMO CAUSADO POR SHOCK SÉPTICO »

Presentada por Dna. Isabel Castro Piedras

Alumno do Programa de Doutoramento: Bases Científicas e Clínicas da Investigación en Medicina

Autoriza a presentación da tese indicada, considerando que reúne os requisitos esixidos no artigo 34 do regulamento de Estudos de Doutoramento, e que como Director da mesma non incurre nas causas de abstención establecidas na lei 30/1992.

Asdo.



Resumen:

Los pacientes con sepsis presentan alteraciones en los niveles séricos y metabolismo de las hormonas tiroideas, que se caracterizan por un descenso de la triyodotironina o T3, elevación de la reversa de la T3 o rT3, niveles normales o bajos de tiroxina o T4 y niveles inapropiadamente normales o bajos de la tirotropina o TSH. A este fenómeno se le conoce universalmente como “Síndrome de la enfermedad no tiroidea” (NTIS, del inglés: *Nonthyroidal illness syndrome*), aunque nosotros preferimos el nombre de ***hipotiroidismo causado por la enfermedad***.

Los pacientes con hipotiroidismo causado por enfermedad presentan un hipotiroidismo central, junto a cambios tejido específico que implican un aumento del consumo de hormona tiroidea y una disminución de la sensibilidad a la acción de las hormonas tiroideas. A nivel clínico no se ha llegado a un consenso si el tratamiento con hormonas tiroideas sería beneficioso para estos pacientes, debido en parte al desconocimiento de los mecanismos moleculares que causan este cuadro y, a la falta de estudios clínicos concluyentes sobre los beneficios de la terapia con hormonas tiroideas en sujetos enfermos.

Debido al limitado acceso a tejidos humanos y a las diferencias entre el metabolismo de las hormonas tiroideas entre el humano y los actuales modelos de roedores, proponemos como modelo animal para el estudio del hipotiroidismo causado por la enfermedad, el cerdo doméstico (*Sus scrofa*). Nuestros objetivos principales son identificar los efectos del shock séptico inducido por la administración de (lipopolisacárido bacteriano) LPS sobre 1) los niveles de hormonas tiroideas en suero y

tejidos, 2) los cambios en la expresión de genes relacionados con el metabolismo y acción de las hormonas tiroideas, y 3) la relación entre la activación del factor de transcripción NF- κ B (del inglés *nuclear factor kappa-chain-enhancer of activated B cells*), elemento central en la respuesta inflamatoria, y el descenso de la expresión del gen del receptor beta de hormonas tiroideas (*THRB*).

El shock séptico inducido por LPS causó una disminución de las hormonas tiroideas en el suero y en la mayoría de los tejidos estudiados, una disminución de la expresión de deydinasa 1 (*DIO1*) en el hígado y riñón acompañada con disminución de la actividad DIO1 en el riñón y un aumento de la actividad deydinasa 3 en el hipotálamo, el hígado y la tiroides. Además, se observó disminución de la expresión del transportador de hormonas tiroideas *MCT8* (transportador de monocarboxilato 8) en la hipófisis, el corazón, el hígado, la corteza renal, el pulmón y la glándula suprarrenal, y disminución de la expresión del receptor de hormonas tiroideas *THRB* en el lóbulo frontal, la hipófisis, el hígado, el corazón, el riñón y la glándula suprarrenal. La activación de NF- κ B se asoció con la disminución de *THRB* en algunos -lóbulo frontal, glándula adrenal y córtex renal- pero no en todos los tejidos estudiados

.En conjunto, nuestros resultados sugieren que el shock séptico causa una disminución de la biodisponibilidad de hormona tiroidea a nivel tisular, y cambios tejido-específicos en dianas moleculares que pudieran causar una reducción de la sensibilidad a la acción de las hormonas tiroideas

Los resultados del presente trabajo se presentaron en el congreso The Endocrine Society's 94th Annual Meeting and Expo, 2012:

- Castro-Piedras I, Quisenberry L, Hutson J, Norman R, McGlone J, Hardy D & Lado-Abeal J. “*Lipopolysaccharide (LPS)-Induced Non-Thyroidal Illness Syndrome (NTIS) in Pigs Causes Profound Hypothyroidism and Tissue-Specific Changes in Thyroid Hormone Metabolism and Molecular Targets*” (Presentación SAT-391)

y se publicaron como artículo en:

- Castro I, Quisenberry L, Calvo RM, Obregon MJ, Lado-Abeal. “*Septic shock non-thyroidal illness syndrome causes hypothyroidism and conditions for reduced sensitivity to thyroid hormone.*” J Mol Endocrinol 18;50(2):255-66. 2013.



Agradecimientos:

En primer lugar quisiera reconocer a mi director de Tesis, Dr, Joaquin Lado por brindarme mi segunda oportunidad en esto de la ciencia. No puedo expresar más que admiración y gratitud hacia mi tutor, no solo por sus enseñanzas, orientaciones y también las necesarias críticas; sino también a nivel personal ya que es una de las mejores personas que conozco. Para mí, ha sido y es un orgullo pertenecer a su laboratorio.

A los profesores Jose A. Costoya y Victor Arce por abrirme las puertas de su laboratorio (el de colorines...) y ayudarme en los inicios de esta “carrera de fondo”.

A la Dra. Cynthia A. Jumper, directora del Departamento de Medicina Interna de la Facultad de Medicina de TTUHSC, y al Dr. Steven Lee Berk, decano de la Facultad de Medicina de TTUHSC, por el apoyo incondicional mostrado a nuestro laboratorio.

Al Dr. John J. McGlone, profesor de la Facultad de Ciencias Animales y Alimentación de TTU, por sus enseñanzas en el manejo de los animales experimentales.

Al Dr. David Araujo Vilar, profesor del Departamento de Medicina Interna de la Facultad de Medicina de la Universidad de Santiago de Compostela, por sus conocimientos y su ayuda con los análisis de los niveles de hormonas tiroideas en suero.

A la Dra. María Jesús Obregón, profesora de investigación del Instituto de Investigaciones Biomedicas “Alberto Sols”, por su ayuda con

los análisis de los niveles de hormonas tiroideas en tejido y sus consejos para estandarizar los ensayos de actividad de yodina.

A Liao Xiao-Hui, investigadora de la Unidad de Enfermedades Tiroideas del Departamento de Medicina de la Universidad de Chicago Medicina, por sus consejos y conocimientos sobre los ensayos de actividad de yodina.

Al Dr. Jim Hutson, profesor del Departamento de Biología Celular y Bioquímica de TTUHSC, por enseñarme y ayudarme a estandarizar las mediciones con HPLC, además de prestarnos el equipo y los reactivos.

Al Dr. Daniel Hardy, profesor del Departamento de Biología Celular y Bioquímica de TTUHSC, por todos sus consejos y generosidad.

Al Dr. Reid Norman, profesor del Departamento de Farmacología y Neurociencia de TTUHSC, por su generosidad y ayuda.

Al Dr. José Cameselle-Teijeiro, profesor del Departamento de Anatomía Patológica del Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela por su ayuda con las preparaciones histológicas.

Al Departamento de Medicina de la Universidad Santiago de Compostela por todo su apoyo, y en especial a Charo por ayudarme y resolver todas mis dudas.

A Isa Carneiro, Isa Ben y Marcos Seoane por estar siempre dispuestos a resolver mis dudas y aconsejarme, siempre con buen humor; a Olga Barca por todas las discusiones, científicas y no científicas, y todos los momentos compartidos dentro y fuera del laboratorio.

A todos los miembros de la Unidad de Enfermedades Tiroideas e Metabólicas (UETeM), en especial al Dr. Fernando Palos, por enseñarme tanto en tan poquito tiempo y estar siempre dispuesto a contestar todos los e-mails con todas mis dudas, y a la Dra. Berta Victoria por su dedicación, amistad y cariño.

A Leah Quisenberry por formar parte de esta aventura.

A Rosie por ser mi amiga, mi hermana a este - o el otro??- lado del charco.

A Beatriz y Maria Elena por vuestra amistad y sobretodo por no dejarme desistir y animarme hasta el último momento.

Sobretodo a mi familia, a mis padres, porque gracias a ellos he llegado a ser la persona que soy, por creer en mí y apoyarme a pesar de que eso significa tenerme demasiado lejos; a mi hermano, por seguir teniendo fe en mí, lo que me obliga a superarme cada día; a mi marido "K", por su cariño, su apoyo y su superdisponibilidad a ayudar, a mi Aldana por su sonrisa y apapachos que hacen valer la pena toda esta falta de sueño acumulada.



ÍNDICE

Abreviaturas.....	1
1. Introducción.....	7
1.1. Fisiología del eje tiroideo.....	8
1.1.1. Regulación de la síntesis y secreción de TRH.....	10
1.1.2. Regulación de la síntesis y secreción de TSH.....	13
1.1.3. Regulación de la síntesis y secreción de hormonas tiroideas.....	16
1.1.4. Transporte de las hormonas tiroideas.....	20
1.1.5. Papel de las deydinasas en el metabolismo de las hormonas tiroideas.....	22
1.1.6. Mecanismos moleculares de la acción de las hormonas tiroideas..	28
1.2. Fisiopatología del hipotiroidismo causado por la enfermedad o NTIS.....	35
1.2.1. Mecanismos responsables de los cambios en los niveles de hormonas tiroideas y TSH.....	37
1.2.2. Otros cambios moleculares potencialmente relevantes asociados a NTIS a nivel tisular.....	44
2. Objetivos.....	51
3. Material y métodos.....	53
3.1. Animales.....	53
3.2. Determinaciones Hormonales.....	57
3.3. Cuantificación de expresión génica.....	59
3.4. Medición de la actividad deydinasa.....	62
3.5. Ensayo de retardo en gel de poliacrilamida o " <i>electrophoretic mobility shift assay</i> " (EMSA).....	67

4. Resultados.....	73
4.1. Efectos de la administración de LPS sobre la fisiología animal.....	73
4.2. Efectos de la administración de LPS sobre los niveles séricos y tisulares de hormonas tiroideas.....	74
4.3. Efectos de la administración de LPS sobre la expresión génica y actividad de las deydinasas.....	76
4.4. La administración de LPS induce cambios en la expresión génica de los receptores de hormonas tiroideas, cofactores y en el transportador de hormonas tiroideas MCT8 de forma tejido-específica.....	80
4.5. Administración de LPS se asocia a la activación y aumento en la unión del factor de transcripción NFκB a sus elementos de respuesta del ADN.....	86
4.6. Efecto de la administración de LPS en la expresión de los genes <i>PTGS2</i> y <i>HIF-1</i>	89
5. Discusión.....	93
6. Conclusiones.....	111
7. Bibliografía.....	113

Abreviaturas:

°C: grado Celsius

μCi: microcurio

μg: microgramo

μL: microlitro

μM: micromolar

¹²⁵I: Yodo-125

ACC: acetyl-CoA carboxilasa

ACHE: acetilcolinesterasa

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADNc: ácido desoxirribonucleico complementario

AF-1: del inglés "*activation function-1*"

AMPc: adenosín monofosfato-3',5' cíclico

AMPK: quinasa activada por AMP

AP-1: del inglés "*Activator Protein 1*"

APACHE II: sistema de clasificación de la severidad de la enfermedad, del inglés, "*Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II*"

AR: receptor adrenérgico

ARN: ácido ribonucleico

ARNm: ácido ribonucleico mensajero

ATA: Asociación Americana de Tiroides

ATP: adenosín trifosfato

bp: par de bases

BSA: albúmina de suero bovino

Ca²⁺: calcio

Ci: curio (unidad de radiactividad)

Cl₂Ca: cloruro cálcico

COX-2: ciclooxigenasa 2

CPE: carboxipeptidasa

cpm: cuentas por minuto

CPTI: del inglés, *fatty acyl-CoA transporter carnitine palmitoyltransferase-1*

CT: ciclo umbral (del inglés, “*cycle threshold*”)

DAG: diacilglicerol

DBD: del inglés “*DNA binding domain*”

DEHAL-1: yodo tirosina deshalogenasa 1

DIO: deyodinasa

DIO1: deyodinasa 1

DIO2: deyodinasa 2

DIO3: deyodinasa 3

DIT: diyodotirosina

dL: decilitro

DTT: ditiotreitol

DUOX: enzima dual oxidasa

EDTA: ácido etildiaminotetraacético

EGF: factor de crecimiento epidérmico

EGTA: ácido etildiaminotetraacético

EMEM: del inglés, “*Eagle’s minimum essential médium*”

EMSA: ensayo de retardo en gel

EP4: receptor para la prostaglandina E2

ERK1/2 : del inglés, “*extracellular-signal-regulated kinases*”

FBS: suero bovino fetal

FGF: factor de crecimiento de fibroblastos

fmol: femtomol

FSH: hormona folículo estimulante

FT3: triyodotironina libre

FT4: tiroxina libre

g: fuerza g

G: gauge

GH: hormona de crecimiento

Gln: glutamina

Gly: glicina

GRK: quinasa de receptores acoplados a proteínas G

H₂O₂: peróxido de hidrógeno

hCG: gonadotropina coriónica humana
 HCl: cloruro de hidrógeno (ácido clorhídrico en su forma hidratada)
 HEPES: N-(2-hidroxietilo) piperacina-n'-(2-etano de ácido sulfónico)
 HEPG2: línea celular de hepatocarcinoma
 HIF-1: del inglés, “*hypoxia-inducible factor-1*”
 His: histidina
 HPLC: cromatografía líquida de alta resolución
 Hr/hrs: hora/horas
 HRE: elemento de respuesta a las hormonas tiroideas
 HSkMCs: cultivo celular de células musculares humanas
 Ht: hormona tiroidea

i.m.: intramuscular
 IACUC: Comité Institucional para el Uso y Cuidado de Animales
 ID: diámetro interno
 IL: Illinois
 Il-1: interleuquina 1
 IP₃: inositol 1, 4, 5-trifosfato
 IYD: yodo tirosina desyodinasasa

KCl: cloruro de potasio
 kD: kilodalton
 kg: kilogramo

LBD: del inglés “*ligand binding domain*”
 LH: hormona luteinizante
 LPS: lipopolisacárido bacteriano
 LTCC: canal de calcio tipo L

M: Molar
 MA: Massachusetts
 MAPK: del inglés, “*mitogen-activated protein kinase*”
 MC4R: Receptor de melanocortina 4
 MCT: transportador de monocarboxilato
 MCT10: transportador de monocarboxilato 10
 MCT8: transportador de monocarboxilato 8

MEK: del inglés, "*Mitogen-activated protein kinase kinase*"
 mg: miligramos
 MgCl₂: cloruro de magnesio
 MI: Michigan
 min: minuto
 MIT: monoyodotirosina
 mL: mililitro
 mm: milimetro
 mM: milimolar
 M-MLV RT: retrotranscriptasa "*Moloney Murine Leukemia Virus*"
 M-MLV: "*Moloney Murine Leukemia Virus*"
 MN: Minnesota
 MSH α : hormona estimulante de melanocitos α
 MYH: gen que codifica la cadena pesada de la miosina
 NaCl: cloruro de sodio
 NCoA1: coactivador receptor nuclear 1
 NE: norepinefrina
 NFkB: del inglés "*Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*"
 ng: nanogramos
 NH: New Hampshire
 NIS: del inglés "*sodium-iodine symporter*"
 NLS: del inglés "*nuclear localization signal*"
 nm: nanómetro
 nM: nanomolar
 NO: óxido nítrico
 NTIS: Enfermedad No Tiroidea, del inglés "*Nonthyroidal illness syndrome*"
 OATP: transportados de aniones orgánicos
 PAM: enzima monooxigenasa amidante de peptidilglicina
 PAX8: del inglés "*Paired box gene 8*"
 PC: enzima proconvertasa
 PCR: reacción en cadena de la polimerasa

pg: picogramos
 PGC-1: del inglés, *peroxisome proliferator-activated receptor gamma co-activator-1*
 pH: potencial hidrógeno
 Pi: fósforo inorgánico
 PI3K: del inglés, "*phosphatidylinositol 3-kinase*"
 PIP₂: fosfatidilinositol bifosfato
 PKC: del inglés, "*Protein kinase C*"
 PLN: fosfolamban
 pmol: picomol
 PNK: polinucleótido-kinasa
 poly(dI-dC): Ácido polideoxiinosínico y deoxicidílico
 POMC: propiomelanocortina
 PPAR: receptor activado por proliferadores de peroxisomas
 PRL: prolactina
 Pro: prolina
 PTGS2: gen que codifica la prostaglandina-endoperóxido sintasa 2
 PTU: propiltiouracilo
 PVN: núcleo paraventricular del hipotálamo
 Raf1: del inglés, "*Rapidly Accelerated Fibrosarcoma*"
 RAR: receptor de ácido retinoico
 Ras: del inglés, "*Rat sarcoma*"
 RIA: radioinmunoanálisis
 ROS: especies de oxígeno reactivo
 RPL4: proteína ribosómica L4
 rpm: revolución por minuto
 rT3: 3,3',5'-triyodotironina
 RXR: receptor X retinoide
 RXRa: receptor X retinoide α
 RXRb: receptor X retinoide β
 RYR: receptor de rianodina
 SECIS: secuencia de incorporación de selenocisteína
 SECISP2: del inglés, "*Selenocysteine Insertion Sequence-Binding Protein 2*"

SERCA: del inglés, *Sarcoendoplasmic reticulum adenosine triphosphatase*

SKA: actina del músculo esquelético

SLC16A2: del inglés, "*solute carrier family 16 member 2*"

STAT1: del inglés, "*Signal Transducer and Activator of Transcription 1*"

STAT3: del inglés, "*Signal Transducer and Activator of Transcription 3*"

T2: diyodotironina

T3: 3,3',5-triyodotironina

T4: tiroxina

TBE: disolución tampón formada por Tris, borato y EDTA

TEMED: N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina

TETRAC: ácido tetrayodoacético

Tg: tiroglobulina

TGB: globulina transportadora de tiroxina

THRA1: gen que codifica el receptor de hormonas tiroideas $\alpha 1$

THRA2: gen que codifica el receptor de hormonas tiroideas $\alpha 2$

THRB: gen que codifica el receptor de hormonas tiroideas β

TNF: factor de necrosis tumoral

TNF α : factor de necrosis tumoral alpha

TPO: peroxidasa tiroidea

TR: receptor de hormonas tiroideas

TRH: hormona liberadora de tirotropina

TRIAC: ácido triyodoacético

Tris: tris(hidroximetil)aminometano

TR $\alpha 1$: receptor de hormonas tiroideas $\alpha 1$

TR $\alpha 2$: receptor de hormonas tiroideas $\alpha 2$

TR β : receptor de hormonas tiroideas β

TSH: hormona estimulante del tiroides

TSHR: receptor de TSH

TTF-1: factor de transcripción nuclear tiroideo 1

TTF-2: factor de transcripción nuclear tiroideo 2

UI: Unidad Internacional

V: voltio

1. INTRODUCCIÓN

Durante la enfermedad, en especial en casos severos, se producen una serie de cambios en sistema endocrino, que se asumen como adaptativos¹⁻². En relación al eje tiroideo, los cambios consisten inicialmente en un descenso en los niveles séricos de la triyodotironina (T3), manteniéndose los niveles séricos de tirotrópina (TSH) normales – “inapropiadamente” normales³⁻⁵. En situaciones de mayor severidad y cronicidad, la tiroxina (T4) sérica también disminuye⁶. A esta forma de hipotiroidismo se la denomina con diferentes nombres tales como *síndrome del enfermo eutiroideo*, *síndrome de la enfermedad no tiroidea* o *síndrome de la T3 baja*⁷. Aunque a partir de ahora utilizaremos el término inglés NTIS –abreviatura de “*non-thyroidal illness syndrome*”-, nosotros entendemos que ninguno de estos nombres es correcto. *Síndrome del enfermo eutiroideo* implica que no existe hipotiroidismo; *síndrome de la enfermedad no tiroidea*, implica que la glándula y eje tiroideo no tienen un papel primario en el cuadro; *síndrome de la T3 baja* implica que la T4 sérica no se afecta. Nosotros creemos que este cuadro se debiera llamar ***hipotiroidismo causado por la enfermedad***, y en este trabajo presentaremos datos en favor de esta denominación: NTIS es una situación clínica de hipotiroidismo causado por la enfermedad, y de hecho es la principal causa de hipotiroidismo en enfermos hospitalizados. Sin embargo, la mayoría de los endocrinólogos, internistas o especialistas en cuidados intensivos no comparten esta visión; por ello, NTIS es una entidad clínica ignorada, y los pacientes que la presentan no reciben tratamiento, ya sea sustitutivo con hormona tiroidea o con péptidos

liberadores de TSH. Nosotros tenemos la impresión que la mayoría de los médicos -e incluso líderes en el campo sanitario que abogan por no tratar a pacientes con NTIS-, desconocen en realidad esta situación y creen que es un cambio bioquímico más asociado a enfermedad; en los casos más beligerantes la respuesta suele ser que NTIS es *“una respuesta adaptativa beneficiosa para el organismo”*. Sin embargo, ante la pregunta de que *“significa una respuesta adaptativa beneficiosa para el organismo”*, la respuesta suele ser ninguna o *“las hormonas tiroideas aumentan el metabolismo y eso es malo en situaciones de enfermedad severa”*. Por supuesto que si profundizamos en lo que significa *“que las hormonas tiroideas aumentan el metabolismo y porque normalizar niveles de hormona tiroidea es malo”* posiblemente no obtengamos una respuesta satisfactoria o ninguna respuesta. Llevado la argumentación al absurdo siempre podríamos proponer que todo sujeto hipotiroideo en caso de enfermedad severa debería de suspender la toma de hormona tiroidea, o incluso ser más radical y recomendar el bloqueo de la función tiroidea ante el mínimo dato de enfermedad, porque todos sabemos que *“las hormonas tiroideas aumentan el metabolismo y eso es muy malo en situaciones de stress metabólico severo”*.

1.1. FISIOLÓGÍA DEL EJE TIROIDEO.

La función del eje hipotálamo-hipófisis-glándula tiroidea es regular los niveles séricos de hormonas tiroideas, y así proveer niveles fisiológicos de hormonas tiroideas a los tejidos⁸.

Las principales hormonas del eje tiroideo son la TRH u hormona liberadora de tirotropina, TSH, T4, y T3. La secreción de estas hormonas

está regulada por clásicos mecanismos endocrinos de retroalimentación negativa (Figura 1).

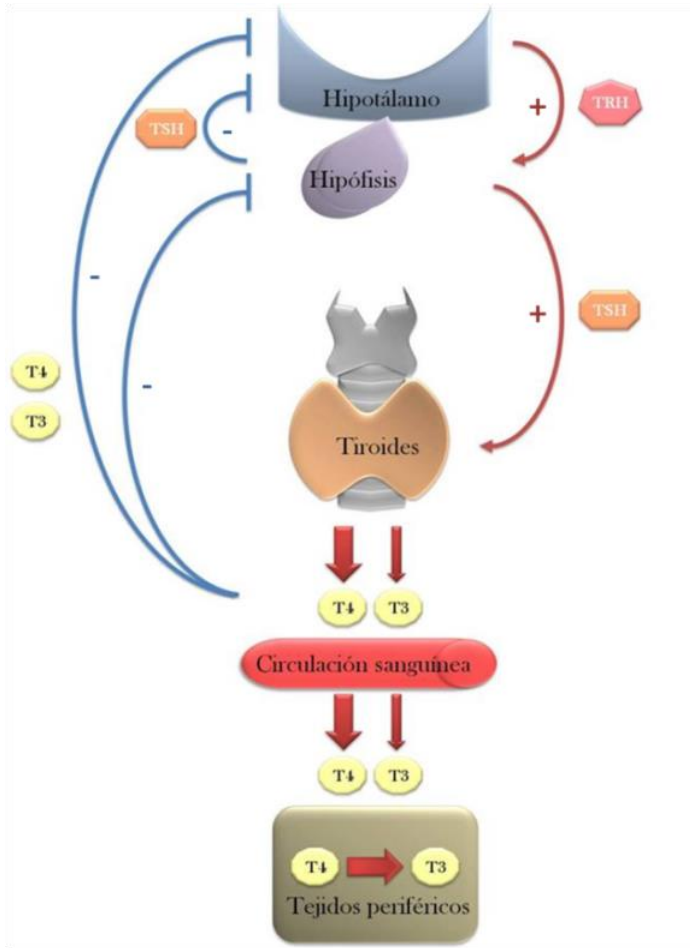


Figura 1. Regulación del eje hipotálamo -hipófisis- glándula tiroides. TRH hipotalámica estimula la secreción hipofisaria de TSH, que a su vez estimula la secreción de T4 y T3, por la glándula tiroidea. T4 y T3 ejercen un control negativo sobre la síntesis y secreción de TSH y TRH. T4 es un precursor de T3, que es la hormona tiroidea con mayor actividad biológica. La mayoría de la T3 circulante proviene de la conversión de T4 a T3 en el hígado, el riñón y glándula tiroidea, bajo la acción de la enzima de yodinasas I o DIO1

1.1.1. REGULACIÓN DE LA SÍNTESIS Y SECRECIÓN DE TRH

TRH es una hormona peptídica compuesta de tres aminoácidos: ácido piroglutámico, histidina y prolina. TRH se sintetiza a partir de un precursor (pro-TRH) de 242 aminoácidos, que contiene 6 copias de la secuencia Glutamina-Histidina-Prolina-Glicina (Gln-His-Pro-Gly)⁹, el cual se modifica post-traduccionamente para dar lugar a TRH¹⁰. Los cambios post-traduccionales se llevan a cabo por dos proconvertasas PC1/3 y PC2¹¹; los productos intermedios generados sufren otras modificaciones ejercidas por las carboxipeptidasas E y D que hidrolizan el enlace peptídico situado en el extremo carboxiterminal¹¹. Finalmente, la amidación de este pro-TRH péptido por la enzima monooxigenasa amidante de peptidil-glicina genera la TRH madura¹².

La expresión de TRH es extensa, y sólo a nivel hipotalámico se expresa en el núcleo paraventricular^{13,14}, eminencia media¹³⁻¹⁶, núcleo dorsomediano^{13,14,16} y núcleo preóptico¹³⁻¹⁵ (Figura 2).

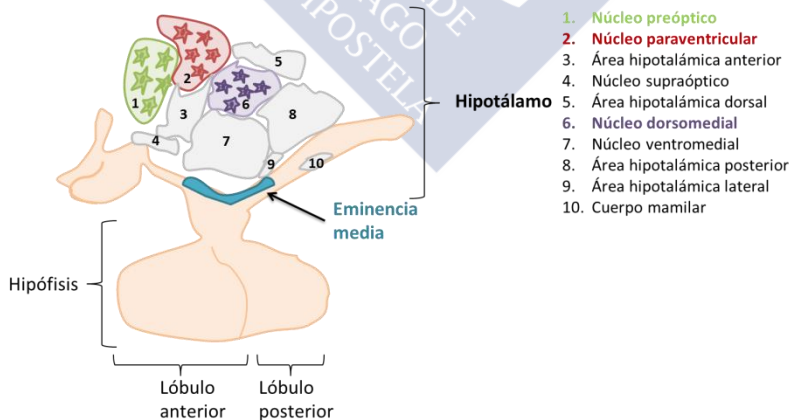


Figura 2. Areas del hipotálamo donde se expresa TRH: núcleo preóptico, núcleo paraventricular, núcleo dorsomedial y eminencia media.

TRH se expresa también en el cuerpo estriado (núcleo accumbens)¹⁶, núcleo septal lateral^{14,16}, hipófisis^{13,17,18}, núcleos motores de la médula espinal^{16,19}, bulbo raquídeo^{14,20} y bulbo olfatorio^{14,20,21}. Fuera del sistema nervioso, TRH se expresa en la glándula tiroides²², placenta²³, vesícula biliar²⁴, páncreas²⁵ y testículo^{26,27}.

TRH regula la síntesis, liberación y actividad biológica de la TSH²⁸⁻³⁰. A pesar de que en el cerebro se encuentran varios grupos de neuronas capaces de sintetizar TRH, solamente las procedentes del núcleo paraventricular regulan la síntesis y liberación de TSH³¹. Las neuronas productoras de la TRH hipofisiotropa proyectan sus axones hacia la zona externa de la eminencia media donde liberan TRH³¹ para desde ahí ser transportada por medio del sistema portal hipofisario a la glándula hipófisis. Una vez en la hipófisis, la TRH regula la secreción de TSH por las células tirotropas y prolactina por las células lactotropas^{31,32} (Figura 3).

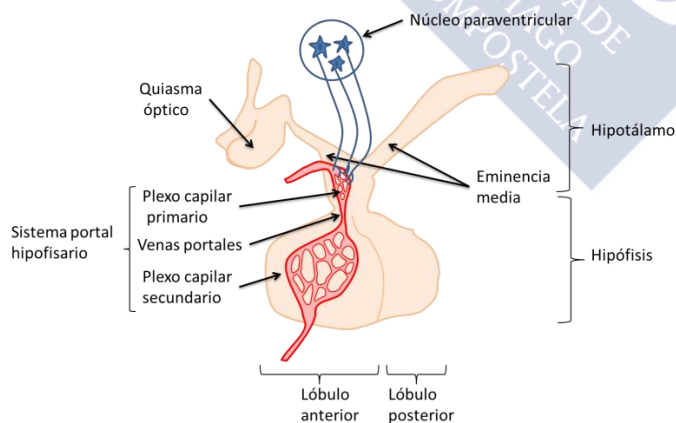


Figura 3. La TRH del núcleo paraventricular se libera en sistema sistema portal hipofisario de la eminencia media por donde llega a la hipófisis anterior donde estimulará la síntesis y liberación de TSH y PRL.

En condiciones normales, la actividad de las neuronas secretoras de TRH hipofisiotropa está regulada mediante un sistema de retroalimentación negativo por las hormonas tiroideas. Además, estas neuronas integran diversas señales para facilitar la adaptación del organismo al ayuno, disminución de la temperatura, u otras condiciones adversas como una infección. Además de las hormonas tiroideas, otros elementos como leptina, melanocortina, y norepinefrina estimulan la síntesis de proTRH y proconvertasas en el núcleo paraventricular del hipotálamo.

La disminución de los niveles de hormonas tiroideas además de aumentar la síntesis de proTRH, también incrementa el procesamiento de proTRH debido a un aumento en la expresión de PC1/3 y PC2³³. Al contrario, el aumento de los niveles de hormonas tiroideas disminuye los niveles de TRH en el núcleo paraventricular³⁴ y la expresión de PCs³³. Esta regulación negativa mediada por las hormonas tiroideas se explica debido a la presencia de lugares de unión para el receptor de hormonas tiroideas en los promotores de proTRH³⁵ y PC³⁶. La leptina estimula directamente la expresión del gen proTRH a través del factor de transcripción *transductor de señal y activador de la transcripción 3* (STAT3)³⁷, e indirectamente mediante el sistema de la melanocortina³⁸. La norepinefrina estimula la síntesis de TRH en respuesta a la exposición al frío o hipervolemia a través del receptor adrenérgico $\alpha 2$ ³⁹⁻⁴¹ (Figura 4).

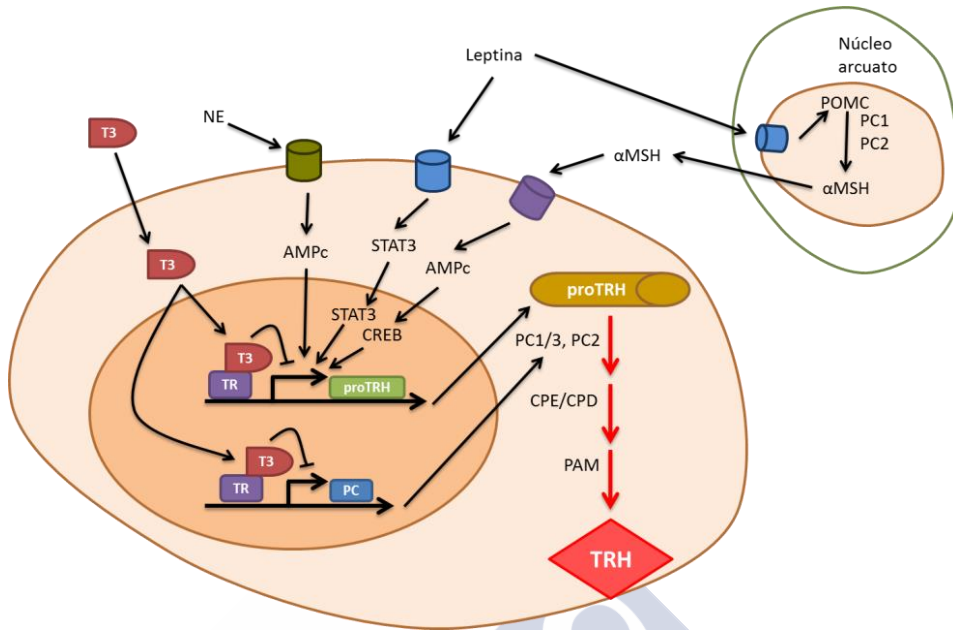


Figura 4. Regulación de la expresión de TRH en el núcleo paraventricular. T3 actúa sobre el promotor de TRH y PC inhibiendo su expresión; norepinefrina (NE) y leptina estimulan la expresión de proTRH. Leptina actúa directamente en las neuronas secretoras de TRH hipofisiotropa o indirectamente en las neuronas del núcleo arcuato que expresan proopiomelanocortina (POMC) donde estimula la liberación de melanotropina α o hormona estimulante de melanocitos α (MSH α), la cual activa el receptor de melanocortina 4 (MC4R).

1.1.2. REGULACIÓN DE LA SÍNTESIS Y SECRECIÓN DE TSH.

La TSH es una hormona glicoproteica compuesta por dos subunidades, α y β . La subunidad α es común para la TSH, la hormona luteinizante (LH), la hormona folículo estimulante (FSH) y la gonadotropina coriónica humana (hCG); la subunidad β es exclusiva para la TSH y le confiere la especificidad biológica.

La TSH es sintetizada y secretada por la células tirotropas de la adenohipófisis y es el principal regulador de la función de la glándula tiroides. La síntesis y secreción de TSH está regulada por la TRH a través de su unión a un receptor de membrana plasmática. El receptor de TRH está acoplado a las proteínas G de membrana Gq y G11, que activan la fosfolipasa C y dan lugar a la hidrólisis del fosfatidilinositol bifosfato (PIP₂) generando inositol 1, 4, 5-trifosfato (IP₃) y el diacilglicerol (DAG). El DAG activa la proteína quinasa C (PKC) dando lugar a una cascada de señalización necesaria para activar los factores de transcripción encargados de la expresión de las subunidades α y β de la TSH⁴², y la fosforilación de proteínas implicadas en la liberación de TSH mediante exocitosis. Por su parte, IP₃ interactúa con receptores específicos en retículo endoplásmico causando la liberación de calcio su interior, que estimula la secreción de TSH⁴³⁻⁴⁶ (Figura 5). TRH estimula también la glicosilación de TSH, regulando así su actividad biológica⁴⁷.

Las hormonas tiroideas inhiben la síntesis y la secreción de TSH directamente en la hipófisis al inhibir la expresión de las subunidades α y β ⁴⁸, e indirectamente al reducir la secreción de TRH por el hipotálamo. De esta forma, niveles circulantes elevados de hormonas -ej. hipertiroidismo- se asocian a niveles séricos bajos de TSH y, en situaciones de hipotiroidismo lo habitual es observar una elevación en los niveles séricos de TSH.

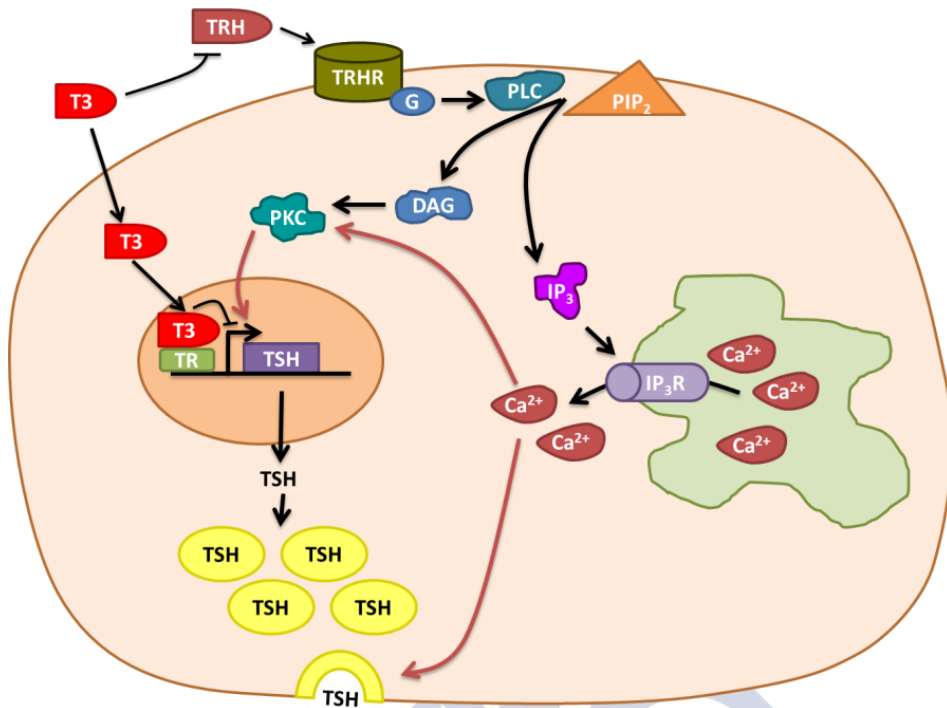


Figura 5. TRH estimula la secreción de TSH a través de la activación de PLC para producir IP₃ y DAG. IP₃ induce la liberación de calcio (Ca²⁺) del retículo endoplásmico que estimula la exocitosis de las vesículas que contienen TSH. La activación de PKC está implicada en la estimulación de la síntesis de TSH.

Otros factores implicados en síntesis y secreción de TSH son la dopamina⁴⁹, somatostatina⁵⁰, glucocorticoides⁵¹ y leptina⁵². La dopamina inhibe la transcripción de las subunidades α y β a través de la activación del receptor de dopamina D2⁵³. Somatostatina reduce la secreción de TSH afectando al calcio intracelular. La leptina estimula la transcripción de las subunidades α y β ⁵⁴. Los glucocorticoides inhiben la secreción de TSH indirectamente inhibiendo la expresión de TRH y directamente

inhibiendo la transcripción de las subunidades α y β a través de la proteína anexina 1 (antes llamada lipocortina 1) que inhibe PKC⁵³.

1.1.3. REGULACIÓN DE LA SÍNTESIS Y SECRECIÓN DE HORMONAS TIROIDEAS.

La síntesis de hormonas tiroideas por la glándula tiroidea requiere de TSH y su receptor, de tiroglobulina (Tg) y de un sistema de captación y procesamiento de yodo.

TSH es el principal regulador de la morfología y función de la glándula tiroidea⁵⁵. Para ello se requiere de la presencia del receptor de TSH (TSHR), un receptor de siete dominios transmembrana acoplado a proteínas G⁵⁶ y cuya activación da lugar a un aumento de AMPc a través de la activación de la adenilato ciclasa y del calcio intracelular a través de la activación de la fosfolipasa C⁵⁷.

La síntesis de hormonas tiroideas requiere de tiroglobulina, principal componente del coloide en el lumen folicular tiroideo. El gen de la Tg humana está ubicado en el brazo largo del cromosoma 8 y contiene 48 exones. El monómero pre proteico posee 2768 aminoácidos, de los cuales los primeros 19 aminoácidos presentes en el extremo amino-terminal corresponden al péptido señal. La estructura primaria del monómero de Tg presenta en la parte aminoterminal 19 unidades repetitivas ricas en cisteínas, agrupadas en 3 dominios diferentes, denominados tipo 1, tipo 2 y tipo 3⁵⁸. Los 11 elementos de tipo 1 se localizan entre los aminoácidos 12 y 1191 y entre 1492 y 1546 y regulan la degradación de la Tg madura por una inhibición reversible de las proteasas lisosomales. El dominio tipo 2 está compuesto por 3 elementos localizados entre los aminoácidos

1437 y 1484 y el dominio tipo 3 comprende cinco elementos entre los aminoácidos 1584 y 2168⁵⁸. La región carboxilo terminal de la Tg no presenta zonas de repetición interna, y en ella existe una región comprendida entre las posiciones 6630 (exón 38) y 8205 (exón 48) del ADNc, que posee un 47% de homología con la acetilcolinesterasa (ACHE)⁵⁸ (Figura 6).

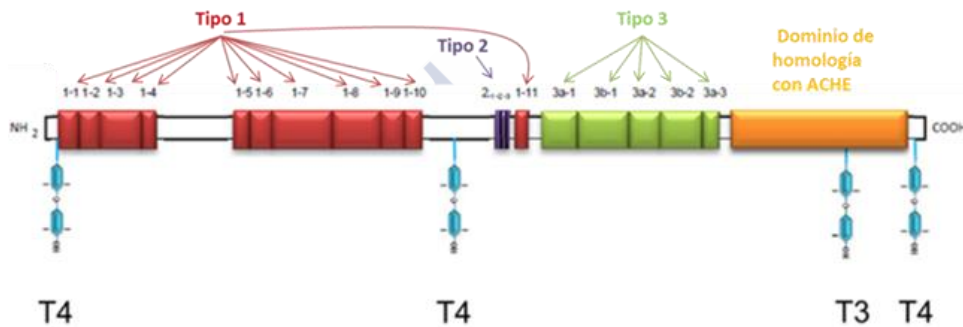


Figura 6. Representación de la tiroglobulina humana. Se indican las repeticiones tipo 1, 2 3 y el dominio de homología con la Acetilcolinesterasa (ACHE). (Imagen modificada de Rivolta CM, Targovnik HM. Molecular advances in thyroglobulin disorders. Clin Chim Acta 374:8–24, 2006)

La síntesis de hormonas tiroideas se realiza en etapas secuenciales (Figura 7). El proceso se inicia con la captación y concentración de yoduro (I) en la glándula tiroides. El yoduro se transporta al interior del tirocito mediante un transportador de Na⁺/I conocido como NIS (del inglés “*sodium-iodine symporter*”) situado en la membrana basal de las células foliculares del tiroides⁵⁹. Una vez en el interior del tirocito, el yoduro se transporta hacia el lumen folicular a través de transportadores localizados en la membrana apical, de los cuales Pendrina es el mejor caracterizado^{60,61}. La enzima peroxidasa tiroidea (TPO), localizada en membrana apical del tirocito, es crucial para la síntesis de hormonas

tiroideas. TPO cataliza la oxidación de yoduro en yodonio, permitiendo la yodación de determinados residuos tirosílicos de Tg. Además, interviene en el acoplamiento de las moléculas de yodotirosina, monoyodotirosina (MIT) y diyodotirosina (DIT), para formar yodotironinas (T4 y T3)⁶²⁻⁶⁴. La T4 se forma mediante el acoplamiento de dos residuos DIT y la T3 mediante el acoplamiento de un residuo MIT y otro DIT. Estos procesos, que tienen lugar en el lumen del folículo tiroideo, requieren peróxido de hidrógeno (H₂O₂) que actúa como un aceptor de electrones. El sistema generador de H₂O₂ asociado a la TPO está catalizado por dos enzimas dual oxidadas, DUOX1 y DUOX2^{65,66} (también denominadas THOX1 y THOX2), enzimas dependientes de Ca²⁺ y NADPH. Una vez sintetizadas, T4 y T3 junto con los residuos MIT y DIT se almacenan en el coloide formando parte de la molécula de la tiroglobulina yodada.

El primer paso para la secreción de hormonas tiroideas consiste en la endocitosis de Tg yodada desde el lumen folicular al citoplasma del tirocito. Posteriormente, las vesículas endocíticas que contienen Tg yodada se fusionan con los lisosomas, constituyendo los fagolisosomas, en donde se produce la proteólisis de Tg yodada por enzimas endopeptidasas como las catepsinas y tiol proteasas⁶⁷, dando lugar a la liberación de T4 y T3 de Tg y posterior secreción a la circulación. Las yodotirosinas que no pasan a la circulación son desyodadas en el interior de la célula por acción de la yodo tirosina deshalogenasa 1 (DEHAL-1), conocida también como yodo tirosina desyodinasas (IYD), y el yodo así liberado por deshalogenación puede ser reutilizado para la síntesis *de novo* de hormonas tiroideas.

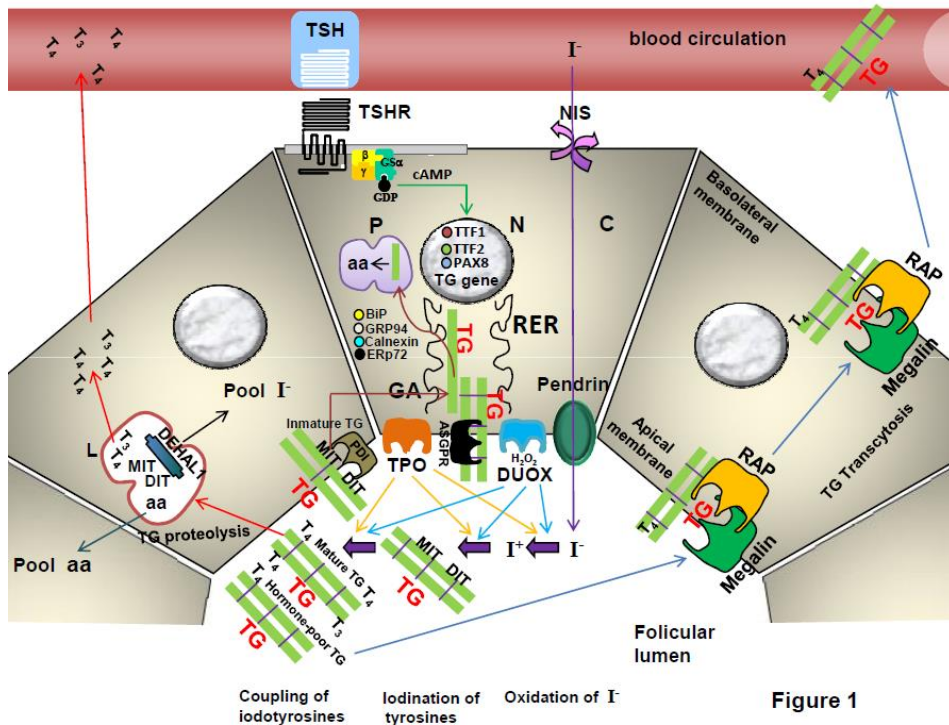


Figura 7. Regulación de la síntesis de hormonas tiroideas en el tirocito. (Imagen tomada de Targovnik HM, Esperante SA, Rivolta CM. Genetics and phenomics of hypothyroidism and goiter due to thyroglobulin mutations. Molecular and Cellular Endocrinology 322 44–55. 2010).

La TSH estimula la transcripción de los genes del receptor de TSH, la tiroglobulina, la TPO y el NIS a través de los factores de transcripción TTF-1, TTF-2 y PAX8^{68,69}. TSH también regula la secreción de las hormonas tiroideas través de la vía del AMPc, induciendo la endocitosis de la tiroglobulina yodada y la fusión de estas vesículas con los lisosomas.

1.1.4. TRANSPORTE DE LAS HORMONAS TIROIDEAS.

1.1.4.1. TRANSPORTE EN LA CIRCULACIÓN SANGUÍNEA.

Las hormonas tiroideas circulan en sangre unidas de forma reversible a proteínas específicas. T4 circula unida a proteínas en un 99.96% y libre (FT4) en un 0.04%⁷⁰; T3 circula unida en un 99.6% y libre (FT3) en un 0.4%. Las principales proteínas transportadoras son la globulina transportadora de tiroxina (TBG), transtirenina y albumina. TBG es el principal transportador (77% de T4 y 80% de T3), seguido de transtirenina (15% de T4 y 27% de T3) y albumina, proteína con gran capacidad transportadora (sobre todo de T3) pero de baja afinidad. Las tres proteínas transportadoras son sintetizadas en el hígado y variaciones en su síntesis, degradación y estructura, generan cambios en los niveles séricos de las hormonas tiroideas totales. El aumento o disminución de proteínas transportadoras, como se observa en algunas situaciones clínicas, da lugar cambios en las concentraciones séricas de las hormonas medidas como totales, aunque las concentraciones de las hormonas tiroideas libres y de TSH permanecen dentro de la normalidad⁷¹.

1.1.4.2. TRANSPORTADORES DE MEMBRANA.

Se han descrito dos grupos de transportadores de membrana para las hormonas tiroideas, la familia del polipéptido transportador de aniones orgánicos (OATP) y la familia de los transportadores de monocarboxilato (MCT).

Dentro de los OATP1, al menos cinco miembros (OATP1A2, OATP1B1, OATP1B2, OATP1B3 y OATP1C1) son capaces de

transportar hormonas tiroideas. OATP1A2 se expresa en hígado, cerebro y riñón, y transporta T4, T3, rT3 y sales biliares. OATP1B1, OATP1B2 y OATP1B3 se expresan en hígado y muestran gran afinidad por T4 y T3⁷². OATP1C1 se expresa en cerebro, testículos y cóclea, y tiene mayor afinidad por T4 y rT3 que por T3; su expresión en el endotelio vascular de las capilares del cerebro sugiere que puede ejercer un papel importante en el transporte a través de la barrera hematoencefalica⁷².

En relación a los transportadores de monocarboxilatos, MCT8 y MCT10 transportan hormonas tiroideas. MCT8 transporta T4, T3, rT3 y T2⁷³, y MCT10 transporta T3⁷⁴. MCT8 se expresa en el córtex cerebral, hipotálamo e hipófisis, así como en hígado, riñón, miocardio, glándulas suprarrenales y tiroidea^{75,76}. La distribución de MCT10 es también amplia e incluye intestino, riñón, hígado, músculo esquelético, miocardio y placenta⁷⁷⁻⁸⁰.

MCT8 tiene un papel primordial en la biodisponibilidad de hormonas tiroideas a nivel neuronal cerebral, como lo demuestra el hallazgo de que el síndrome de Allan-Herdon-Dudley, un cuadro congénito de retraso psicomotor severo ligado al cromosoma X, se debe a mutaciones en MCT8, lo que limita el acceso durante la embriogénesis de hormona tiroidea a neuronas en el sistema nervioso central⁸¹.

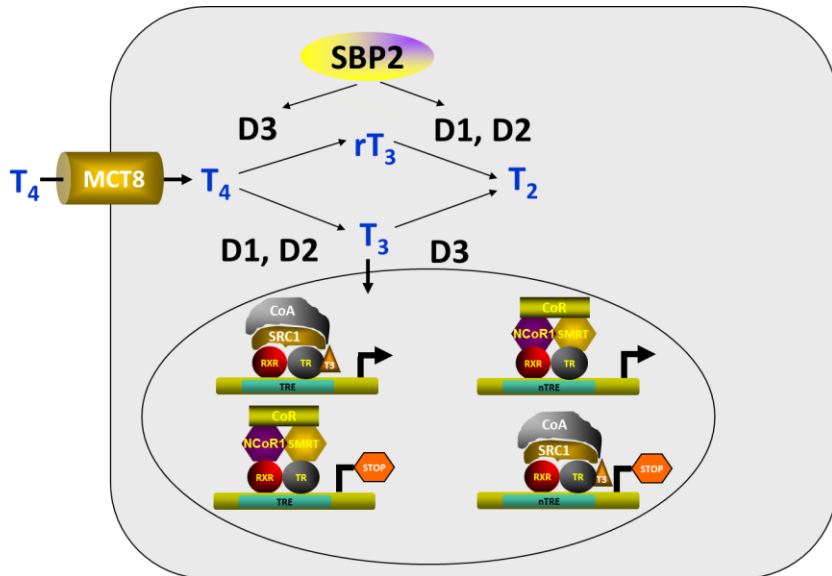


Figura 8. Transporte y metabolización de hormonas tiroideas a nivel tisular. T₄ entra en la célula diana mediante el transportador específico MCT8. Dentro de la célula, T₄ se metaboliza a T₃ (forma activa) mediante las enzimas de yodinasas 1 y/o de yodinasas 2, o bien se metaboliza a rT₃ (forma inactiva). Una vez en el núcleo, T₃ se une a sus receptores nucleares (TR) regulando la transcripción génica.

1.1.5. PAPEL DE LAS DEYODINASAS EN EL METABOLISMO DE LAS HORMONAS TIROIDEAS.

La de yodinasas progresiva constituye la vía más importante de metabolización de las T₄ y T₃, y está catalizada por unas enzimas denominadas de yodinasas. Las de yodinasas (DIOs) son selenoproteínas, grupo de enzimas que en su centro activo contienen el aminoácido selenocisteína (Se-Cis), por lo que su funcionamiento es susceptible a la deficiencia de selenio. El efecto de la deficiencia de selenio es tejido dependiente, siendo más pronunciada en el hígado, músculo esquelético y

corazón⁸²⁻⁸⁴. La incorporación de selenocisteína al centro activo de las deydinasas requiere el reconocimiento en el ARN mensajero de una secuencia de incorporación de selenocisteína (SECIS) a través de un complejo del que forma parte la proteína SECISBP2 (del inglés “*Selenocysteine Insertion Sequence-Binding Protein 2*”). Mutaciones recesivas en *SECISBP2* causan un fenotipo similar al observado en ratones knock-out para DIO1 y DIO2, que consiste en elevaciones de T4, reversa de T3 y TSH sérica con concentraciones bajas de T3. Este fenotipo es consecuencia de una menor actividad de las deydinasas debido una incorporación deficiente de selenio secundario consecuencia de las mutaciones en *SECISBP2*⁸⁵.

T4 puede deydinarse en el anillo externo dando lugar a la síntesis de T3, o en el anillo interno dando lugar a rT3. DIO1 y DIO2 son responsables de generar T3, y DIO3 es responsable de generar rT3 (Figura 9). Dado que DIO1 y DIO2 son capaces de deydinar el anillo externo de tirosina también pueden producir T2 a partir de rT3, y DIO3 puede producir T2 a partir de T3 (Figura 9).

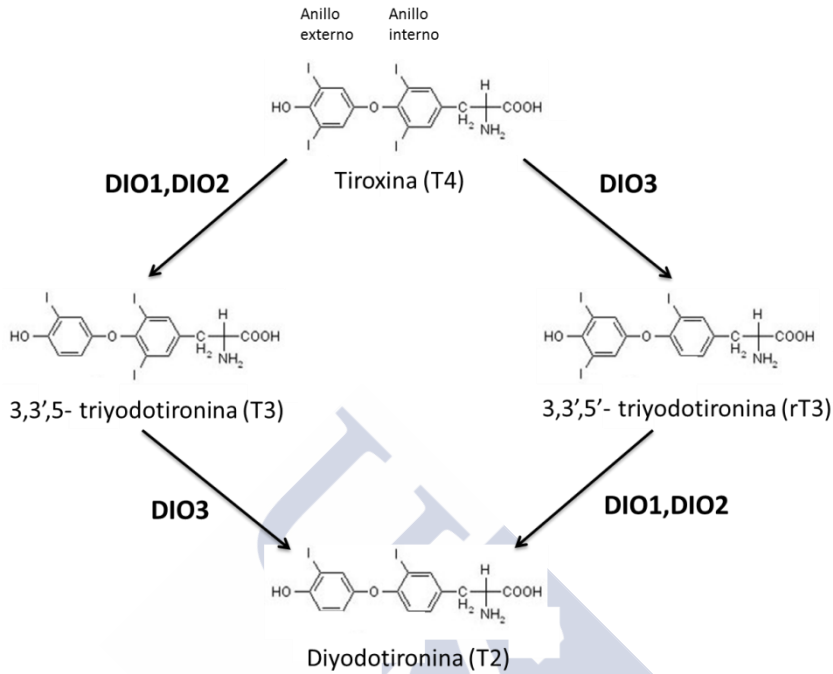


Figura 9. Metabolización de las hormonas tiroideas catalizadas por las enzimas deyodinasas. DIO1 cataliza la deyodinación del anillo externo de la T4 convirtiendo T4 a T3 y de metabolizar T3 reversa a T2. DIO2 actúa sobre el anillo externo de la T4 y rT3. DIO3 actúa sobre el anillo interno de la T4 y T3.

DIO1 se localiza en la membrana plasmática y su centro activo está situado en el citosol⁸⁶. Los tejidos que presentan mayor actividad DIO1 son hígado y riñón⁸⁷, aunque nuestro laboratorio demostró que en humanos existe actividad DIO1 también en tejido adiposo subcutáneo⁸⁸. La expresión y actividad de DIO1 están reguladas por factores hormonales y nutricionales, siendo T3 el más importante⁸⁹. T3 aumenta la expresión del gen DIO1 a través de su unión al receptor beta de hormonas tiroideas, que se une a dos elementos de respuesta a las hormonas tiroideas (HRE) situados en el promotor del gen. Uno de los HRE se une

con un homodímero del receptor beta de hormonas tiroideas, y otro HRE se une con un heterodímero formado por el receptor de hormonas tiroideas y el receptor del ácido retinoico⁸⁹. Así mismo, sujetos con hipertiroidismo presentan mayor actividad enzimática DIO1⁹⁰ y estudios *in vitro* mostraron que T3 estimula dicha actividad⁹⁰. Existen otros factores que regulan la expresión y actividad de DIO1 en forma específica de tejido. Así, TSH induce la síntesis de DIO1 en la glándula tiroides humana mediante un mecanismo que implica AMPc^{91,92}. La administración de hormona de crecimiento (GH) en adultos eutiroideos incrementa la proporción de T3 respecto a T4 en el suero y reduce la de rT3 respecto a T4⁹³ sugiriendo que GH podría aumentar de la actividad DIO1 en los tejidos periféricos. Sin embargo, en un estudio reciente realizado en pacientes con déficit de hormona de crecimiento, antes y después del tratamiento con GH, nosotros no observamos un aumento de la actividad DIO1 en biopsias de grasa subcutánea⁹⁴, por lo que los cambios en los niveles séricos de hormonas tiroideas tras administración de GH no se pueden explicar por cambios en la actividad de yodinasas en la grasa subcutánea.

DIO2 es una enzima residente en el retículo endoplásmico, cuyo dominio N-terminal está localizado en el lumen de retículo y el dominio catalítico en el citosol⁸⁶. DIO2 cataliza la deiodinación del anillo tirosina externo de las hormonas tiroideas, por lo que puede convertir T4 en T3, y producir T2 a partir de la rT3. La expresión de DIO2 es ubicua, y su mayor actividad reside en cerebro, hipófisis anterior, placenta, tiroides y músculo esquelético humanos⁹⁵⁻¹⁰⁰. A diferencia de las otras deiodinasas, tiene una vida media corta de 20 min, debido a su degradación

dependiente del sistema ubiquitina/proteosoma¹⁰¹. La regulación de DIO2 por las hormonas tiroideas es compleja, y se ejerce a nivel transcripcional, post-transcripcional y post-traducciona. T3 inhibe la expresión del gen *DIO2* mientras que T4 inhibe la actividad de DIO2 actuando a nivel post-traducciona¹⁰²⁻¹⁰⁴. Esta regulación negativa mediada por T4 controla la producción de T3 y sus niveles intracelulares, dependiendo de la disponibilidad de T4. El gen *DIO2* está regulado por TTF-1 (del inglés “*Thyroid Transcription Factor 1*”), AP-1 (del inglés “*Activator Protein 1*”) y NF-κB (del inglés “*Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*”) ^{105,106}. Esta regulación es importante en situaciones de enfermedad caracterizadas por el aumento de citoquinas proinflamatorias, tales como el factor de necrosis tumoral alfa (TNFα) y la interleuquina-1 (IL-1), que tras su unión a los receptores específicos inducen las cascadas de señalización que conllevan a la activación de los factores de transcripción AP-1 y NF-κB, y por lo tanto, también afectan la expresión de *DIO2*. En cultivo celular de células musculares humanas (HSkMCs) se observó como TNFα disminuye la expresión de *DIO2* de manera dosis dependiente¹⁰⁷.

DIO3 cataliza la deyodinación del anillo tirosina interno de las hormonas tiroideas, convirtiendo T4 en rT3 y T3 en T2, ejerciendo así un papel muy importante como inactivador de las hormonas tiroideas. DIO3 se localiza en la membrana plasmática¹⁰⁸, tiene expresión ubicua y su actividad es mayor en la placenta, cerebro y epidermis en el adulto; su expresión en tejidos fetales es más abundante, y se encuentra en el hígado, la piel, el pulmón, el corazón y el intestino¹⁰⁹⁻¹¹¹. Diversos estudios han descrito reactivación de la expresión de DIO3 en diversas

condiciones patológicas como cánceres, hipertrofia cardíaca, infarto de miocardio e inflamación crónica¹¹². Las hormonas tiroideas y el ácido retinoico estimulan la expresión del gen *DIO3*¹¹³. Los estrógenos y progesterona en el útero¹¹¹ o el factor de crecimiento epidérmico y de fibroblastos (EGF y FGF)¹¹⁴ también estimulan la expresión de *DIO3*. El promotor del gen *DIO3* presenta una secuencia de unión al factor de transcripción *factor 1 inducible por hipoxia* o HIF-1, por lo que su expresión aumenta en situaciones de hipoxia¹¹⁵. En cultivos primarios de astrocitos de rata se observó que el estrés oxidativo incrementa la expresión *DIO3*¹¹⁶.

Otras rutas de metabolización de las hormonas tiroideas son la desaminación y decarboxilación por oxidación de la cadena lateral de alanina, dando lugar a la producción de ácido tetrayodoacético (TETRAC) y triyodoacético (TRIAC), que luego son deiodados y conjugados en el hígado y eliminados por la vía biliar¹¹⁷. TRIAC tiene afinidad por los receptores de hormonas tiroideas alfa 1 y beta (TR α 1 y TR β), y puede actuar como agonista competidor de T3.

Un aspecto esencial en el metabolismo y acción fisiológica de las hormonas tiroideas es su producción por tejidos periféricos. En humanos sanos, la glándula tiroides genera sólo el 20% de la T3 circulante, mientras que el 80% restante se genera por conversión de T4 a T3 mediada por la DIO1 en hígado y riñón, y posiblemente por DIO2 en el músculo esquelético^{87,118-120}. Sin embargo, existe cierta discrepancia entre el papel relativo de DIO1 con respecto a DIO2 en la producción de T3 periférica. Esta controversia se debe por que la DIO1 tiene preferencia

por rT3 y yodotironinas sulfatadas como sustrato, lo que sugiere que DIO1 tiene un papel en la deiodinación de yodotironinas inactivas y el reciclaje de yodo en el organismo¹²¹. En pacientes hipertiroideos DIO1 es importante en la generación de T3 periférica ya que a diferencia de la DIO2, la expresión del gen de *DIO1* está regulada positivamente por T3.

1.1.6. MECANISMOS MOLECULARES DE LA ACCIÓN DE LAS HORMONAS TIROIDEAS.

Las hormonas tiroideas ejercen acciones genómicas y acciones no genómicas.

1.1.6.1. ACCIONES GENÓMICAS DE LAS HORMONAS TIROIDEAS.

Las acciones genómicas de las hormonas tiroideas son las mejor caracterizadas. Se ejercen a través de la unión de T3 con un grupo de factores de transcripción nuclear conocidos como receptores nucleares de hormonas tiroideas (TRs). Estos receptores tienen 1) un dominio regulador N-terminal A/B, que posee una función activadora independiente del ligando conocida como AF-1 (del inglés “*activation function-1*”), 2) un dominio de unión al ADN conocido como DBD (del inglés “*DNA binding domain*”), que tiene una estructura denominada *dedos de zinc* necesaria para el reconocimiento de las secuencias específicas del ADN -conocidas como elemento de respuesta a hormonas o HRE (del inglés “*hormone response element*”); el dominio DBD contiene también parte de la señal de localización nuclear o NLS (del inglés “*nuclear localization signal*”), 3) un dominio o región bisagra y contiene el resto de la NLS, 4) el dominio de unión al ligando o LBD (del inglés “*ligand binding domain*”) que proporciona la especificidad del

receptor por el ligando -T3- (Figura 10B), modula la capacidad de formar homodímeros o heterodímeros con otros miembros de la superfamilia de receptores nucleares¹²² y contiene la función activadora de la transcripción dependiente de ligando o AF-2, y 5) el dominio C-terminal que interacciona con proteínas coactivadoras (Figura 10A).

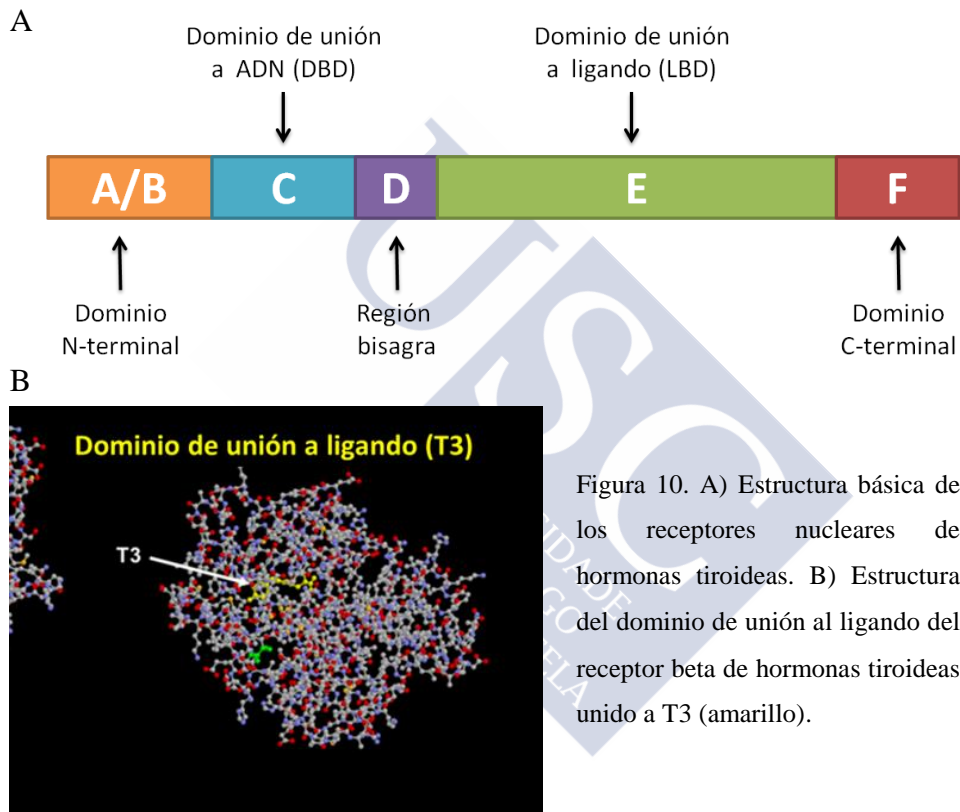


Figura 10. A) Estructura básica de los receptores nucleares de hormonas tiroideas. B) Estructura del dominio de unión al ligando del receptor beta de hormonas tiroideas unido a T3 (amarillo).

Los receptores para hormonas tiroideas están codificados por dos genes, *THRA* y *THRB*¹²³, que se encuentran en cromosomas diferentes, *THRA* en el cromosoma 17 y *THRB* en el cromosoma 3. La expresión de estos receptores es relativamente ubicua pero los niveles de expresión varían dependiendo del tejido^{122,124}.

THRA codifica para tres variantes TR α que se generan por *splicing* alternativo (figura 12) y dos formas truncadas $\Delta\alpha 1$ y $\Delta\alpha 2$. La TR $\alpha 1$, es un receptor funcional capaz de unirse a T3 y al ADN, y las TR $\alpha 2$ y TR $\alpha 3$ no se unen a T3 y tienen capacidad dominante negativa *in vitro* - bloqueo de la acción de T3 - aunque su papel *in vivo* no está claro¹²⁵⁻¹²⁸. La diferencia entre TR $\alpha 2$ y TR $\alpha 3$ con respecto a TR $\alpha 1$ reside en su extremo C-terminal; TR $\alpha 2$ carece de los 40 últimos aminoácidos de TR $\alpha 1$ que son sustituidos por una secuencia de 120 aminoácidos. Las TR $\Delta\alpha$ carecen del dominio de DBD.

THRB codifica cuatro isoformas TR $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$ y $\beta 4$ ¹²⁹ que se generan por el uso de un promotor alternativo (Figura 11) y la forma truncada TR $\Delta\beta 3$. Por el momento, TR $\beta 3$ se ha identificado sólo en la rata. Las isoformas 1, 2 y 3 unen T3 y se diferencian en la región N-terminal. La isoforma TR $\beta 4$ se genera mediante *splicing* alternativo de la región C-terminal de la isoforma TR $\beta 1$, por lo que contiene los dominios A/B, C y D idénticos a los de TR $\beta 1$ pero carece del dominio de unión al ligando y no se une a T3¹³⁰.

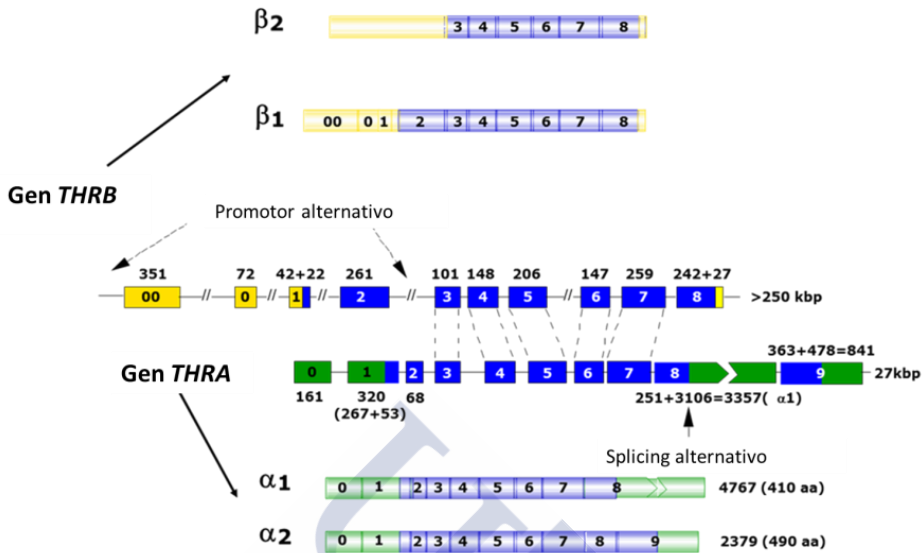


Figura 11. Isoformas de los receptores nucleares de hormonas tiroideas. En la figura se muestran 2 isoformas para el gen *THR β* (TR $\beta 1$ y TR $\beta 2$) generadas por el uso de un promotor alternativo situado entre los exones 2 y 3 del gen *THR β* . Además, también se muestran dos isoformas para el gen *THRA* (TR $\alpha 1$ y TR $\alpha 2$) que se originan por el splicing alternativo entre los exones 8 y 9, que corresponden con el dominio de unión a ligando.

En la mitocondria existen por lo menos otras dos proteínas TR α , más cortas y capaces de unir T3. Una proteína tiene un peso molecular de 28 kDa (p28) y se localiza en la membrana interna de las mitocondrias; la otra tiene un peso molecular de 43 kDa (p43) y se localiza en la matriz mitocondrial. Ninguna de estas dos isoformas se encuentra en el núcleo, pero p43, a diferencia de p28, contiene el dominio de unión a ADN. p43 actúa a nivel del genoma mitocondrial regulando la síntesis de proteínas mitocondriales. Ambas isoformas se producen a partir de un codón de inicio de la traducción (met 39 y met 150)^{131,132} (Figura 12).

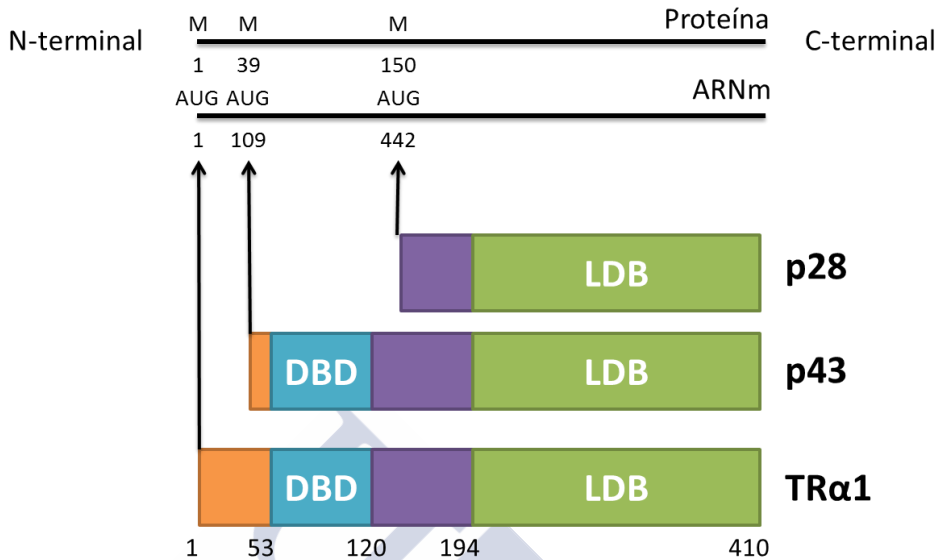


Figura 12: Las dos isoformas mitocondriales de TRα, p28 y p43, se originan por traducción alternativa a partir de distintos AUG internos del ARN mensajero (109 y 442) que corresponden con las metioninas 39 y 150. En el receptor TRα1 se muestran los números de amino ácidos 1, 53, 120, 194 y 410.

La capacidad de los TRs de regular la expresión génica depende de la presencia en los promotores de genes de HRE. Los TRs se pueden unir a los HREs en forma de monómeros o de dímeros, formando homodímeros (TR-TR) o heterodímeros con otros factores de transcripción. Entre éstos factores están el receptor retinoideo X (RXR), el receptor de estrógenos, el receptor de ácido retinoico (RAR) y el receptor activado por proliferadores de peroxisomas (PPAR), siendo la interacción con el RXR la más abundante.

La unión de T3 al complejo TR-HRE de un gen regulado positivamente por T3 da lugar un cambio conformacional en el TR causando la disociación de represores de la transcripción del complejo y

el reclutamiento de coactivadores. Algunos de esos coactivadores son proteínas que inducen la acetilación del ADN o poseen actividad histona acetiltransferasa, haciendo así accesibles los genes regulados por las hormonas tiroideas al complejo de iniciación de la transcripción (Figura 13).

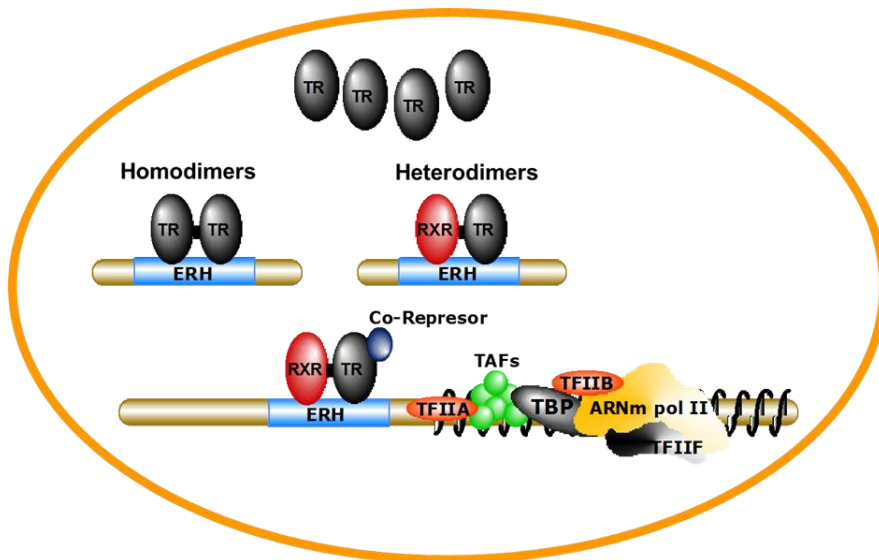


Figura 13. Mecanismo genómico de acción de las HT. Los TR se unen al DNA formando homodímeros (TR-TR) o heterodímeros (RXR-TR). En un HRE regulado positivamente por T3 la ausencia de T3 hace que el heterodímero RXR-TR este unido a co-represores que inhiben la transcripción de los genes regulados.

1.1.6.2. ACCIONES NO GENÓMICAS DE LAS HORMONAS TIROIDEAS

Las acciones de las hormonas tiroideas independientes de la unión del receptor al ADN se conocen como acciones no genómicas de las hormonas tiroideas¹³³. Estas acciones dependen de la activación de receptores situados en la membrana plasmática o en el interior de la

célula, fundamentalmente en el citoplasma, el núcleo o la mitocondria¹³⁴⁻¹³⁶.

La integrina $\alpha V\beta 3$ es una proteína estructural de la membrana plasmática que puede interactuar con las proteínas de la matriz extracelular y con las hormonas tiroideas¹³⁷. $\alpha V\beta 3$ tiene dos sitios de unión a las hormonas tiroideas¹³⁸; uno de éstos se une exclusivamente T3 y activa la vía de la PI3K (del inglés, “*phosphatidylinositol 3-kinase*”) lo que da lugar a la translocación de TR $\alpha 1$ al núcleo celular y la transcripción del factor HIF-1; el otro lugar puede unir T3 o T4, activando la vía PKC, Ras-Raf1-MEK (del inglés, “*Rat sarcoma*”, “*Rapidly Accelerated Fibrosarcoma*” y “*Mitogen-activated protein kinase kinase*”) dando lugar a la fosforilación, activación y translocación nuclear de MAPK-ERK1/2 (del inglés “*mitogen-activated protein kinase*” y “*extracellular-signal-regulated kinases*”) dando lugar a 1) fosforilación de TR provocando su disociación de co-represores y aumentando su actividad transcripcional, 2) interacción con el TR, formándose el complejo MAPK-/TR que a su vez se une a p53 fosforilándola y disminuyendo su actividad transcripcional^{135,139} o 3) fosforila STAT1 (del inglés, “*Signal Transducer and Activator of Transcription 1*”), STAT3 (del inglés, “*Signal Transducer and Activator of Transcription 3*”) ^{135,140} provocando su translocación al núcleo y activando la transcripción génica (Figura 14).

La activación de la vía MAPK (ERK1/2) está implicada en angiogénesis^{137,141} y proliferación de la células tumorales^{138,142}, mientras que la activación de la vía PI3K está relacionada con el tráfico intracelular de proteínas¹³⁸ (Figura 14).

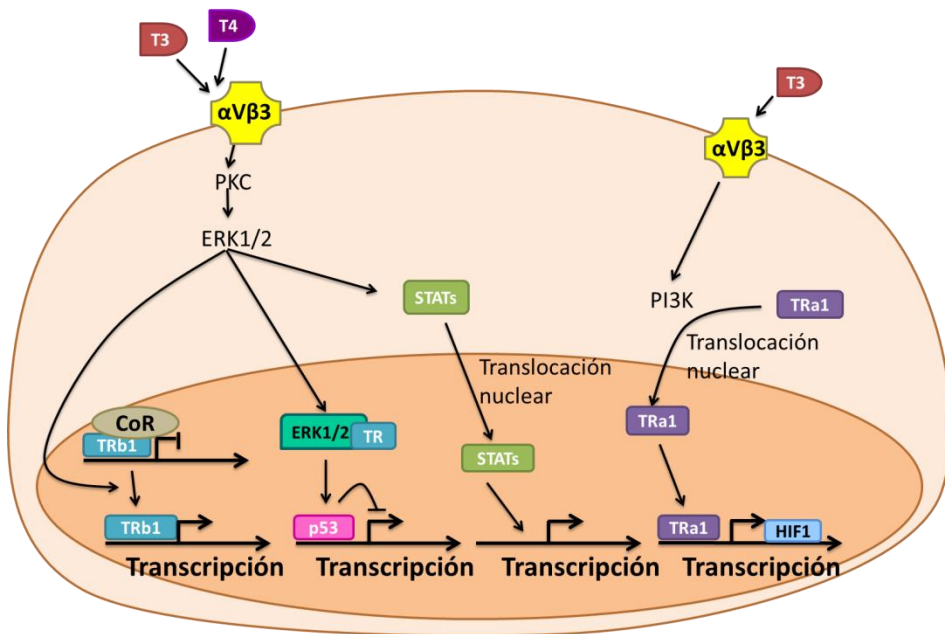


Figura 14. Acciones no genómicas iniciadas a nivel del receptor integrina $\alpha V\beta 3$ en la membrana plasmática. Las hormonas tiroideas estimulan ERK1/2 a través de PKC, la activación de ERK1/2 promueve su translocación al núcleo y la fosforilación de TR, p53 y STATs. T3 activa PI3K que está implicada en la translocación de TR α y activación de la transcripción de HIF-1

La translocación al núcleo de los receptores de hormonas tiroideas sugiere que tanto los efectos genómicos como los no genómicos de las hormonas tiroideas podrían actuar conjuntamente.

1.2. FISIOPATOLOGÍA DEL HIPOTIROIDISMO CAUSADO POR ENFERMEDAD O NTIS.

NTIS es una situación de hipotiroidismo presente en sujetos con enfermedad severa o en ayuno prolongado. Se caracteriza por un descenso en los niveles séricos de T3, aumento de rT3, y valores normales o bajos de TSH. Los niveles séricos de T4 se mantienen

normales, aunque en los casos de mayor severidad y prolongados en el tiempo, también se observa un descenso en esta hormona³⁻⁵ (Figura 15).

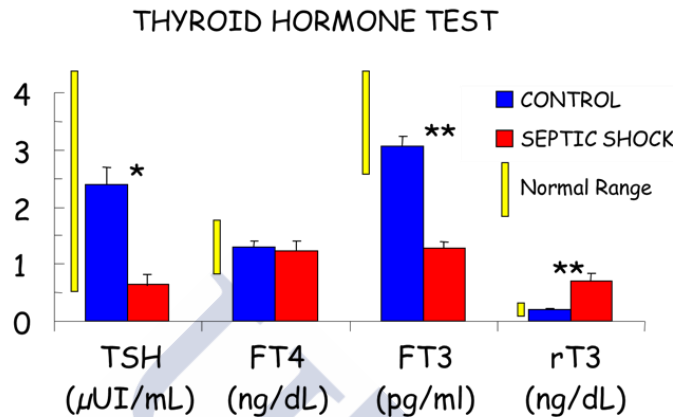


Figura 15. Niveles séricos de TSH, FT4, FT3 y rT3 en un grupo de pacientes control y un grupo de pacientes con shock séptico. Los pacientes con shock séptico muestran disminución significativa de TSH, T3 libre y un aumento de rT3 comparado con controles. (Tomado de Lado-Abeal J, Castro-Piedras I. Nonthyroidal Illness Syndrome. *Hot Thyroidol.* e11. ISSN 2075-2202. 2009).

En nuestra experiencia, esta situación se presenta en casi todos los enfermos críticos tras 48 horas de ingreso en unidades de cuidados intensivos. En clínica, niveles bajos de T4 se asocian a un aumento en la mortalidad, y de hecho en sujetos con niveles séricos de T4 inferiores a 4 $\mu\text{g/dL}$ la probabilidad de muerte aumenta al 50%, y si los niveles de T4 son inferiores a 2 $\mu\text{g/dL}$, dicha probabilidad de muerte alcanza 80%⁶. Queda por dilucidar si este aumento de mortalidad es consecuencia del hipotirodismo profundo, o es una mera asociación clínica reflejo de la gravedad del cuadro clínico.

1.2.1. MECANISMOS RESPONSABLES DE LOS CAMBIOS EN LOS NIVELES DE HORMONAS TIROIDEAS Y TSH.

La disminución de los niveles séricos de T3 se debe fundamentalmente a cambios en la actividad de las deydinasas. Diversas observaciones, tanto en modelos animales como en humanos enfermos, apuntan a que un descenso en la actividad DIO1 a nivel hepático y renal, tiene papel relevante en el desarrollo de NTIS. En condiciones fisiológicas, hígado y riñones generan el 70% de la T3 circulante, a partir de la conversión de T4 en T3 por acción de DIO1 (Figura 16), lo que explicaría la elevada frecuencia de niveles séricos bajos de T3 en enfermos con insuficiencia renal crónica y con cirrosis hepática.

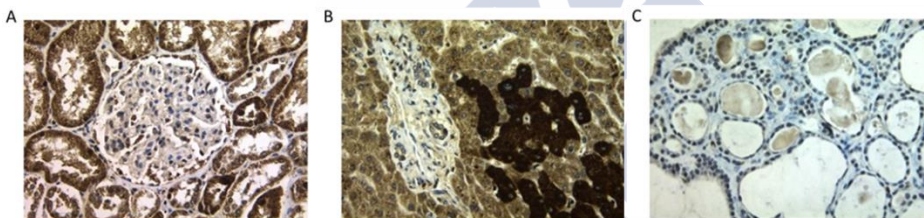


Figura 16. Expresión de DIO1 (color marrón oscuro) medida por inmunohistoquímica en riñón (A), hígado (B) y tiroides(C) humanos. Puede apreciarse una mayor expresión de la enzima tanto riñón como en hígado respecto a tiroides. (Cortesía del Dr. Jose Cameselle Teijeiro, Servicio de Anatomía Patológica, Complejo Hospitalario de Santiago de Compostela)

Al igual que la enfermedad severa, el ayuno prolongado es una causa de disminución de T3 y en modelos animales se observó una disminución de la actividad DIO1 hepática durante el ayuno¹⁴³. Así mismo, en situaciones que desencadenan una respuesta inflamatoria severa, como el shock séptico o abscesos infecciosos, existe un descenso de la T3 sérica

que se asocia a una disminución en la actividad DIO1 hepática^{144,145}. Sin embargo, todavía no se ha aclarado si existe una relación causal entre disminución de la expresión y actividad de DIO1 y el descenso en los niveles séricos de T3. En este sentido, tanto en ratones knock-out para DIO1 como ratones de la cepa CH3 -presentan baja expresión de DIO1 en el hígado y riñón-, las concentraciones séricas de T3 y TSH son normales^{121,146,147}, presentando niveles elevados de T4 y rT3. Sin embargo, es posible que animales crónicamente deprivados de actividad DIO1 desarrollen mecanismos compensatorios que permitan mantener niveles séricos de T3 dentro de la normalidad.

La participación DIO2 en el descenso de T3 durante el NTIS se desconoce. DIO2 es esencial en la regulación hipotalámico-hipofisaria de la secreción de TSH, y por ello, en la secreción de hormonas tiroideas. Ratones knock-out para DIO2 (D2KO) tienen niveles séricos de T3, T4 y TSH elevados, y el tratamiento con T3 disminuye los niveles de TSH, que sin embargo no se afectan por la administración de T4. Estas observaciones indican que la ausencia de actividad DIO2 causa resistencia central a la acción de T4, y que T3 inhibe secreción de TSH¹⁴⁸ (Figura 18). Dado que los ratones D2KO presentan niveles normales de ARNm de TRH en el núcleo paraventricular del hipotálamo TSH¹⁴⁹, se hipotetizó que T3 actúa a nivel hipofisario bloqueando la secreción de TSH y, que para que las hormonas tiroideas ejerzan un efecto de retroalimentación negativo en el hipotálamo se requiere de actividad DIO2 (Figura 17).

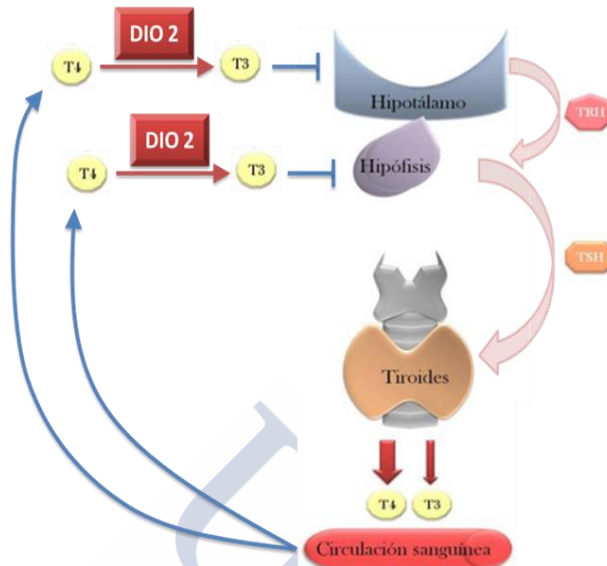


Figura 17. Papel de la DIO2 en la regulación negativa del eje hipotálamo-hipófisis-glándula tiroides. D2 es la principal enzima en el cerebro responsable de convertir T4 en T3. La producción de T3 por DIO2 en las células tirotropas de la hipófisis anterior es la encargada de inhibir la producción de TSH en la hipófisis. DIO2 también se expresa en la eminencia media y unas células gliales especializadas llamadas tanicitos que tapizan parcialmente la pared del tercer ventrículo en el hipotálamo mediobasal. La producción de T3 por los tanicitos conlleva a la supresión de TRH en el núcleo paraventricular del hipotálamo.

En lo que existe un mayor acuerdo es en que DIO3 tiene una función relevante en el descenso de T3 en NTIS. Estudios en humanos y modelos animales han mostrado que la actividad DIO3 aumenta en el hígado y músculo esquelético^{88,150,151}. El aumento en la actividad DIO3 causa una mayor conversión de T4 a rT3, y una mayor conversión de T3 en T2, lo que explicaría el aumento de rT3 y descenso de T3 en sujetos con enfermedad severa, fenómeno que se conoce como hipotiroidismo por consumo.

El aumento en el nivel sérico de rT3, se debe al aumento en la actividad DIO3 y a una menor actividad DIO1. El aumento de actividad DIO3 incrementa la conversión de T4 en rT3 (Figura 18), y el descenso de la actividad DIO1 disminuye la conversión de rT3 a T2, siendo el resultado final el aumento de rT3 (Figura 18). El aumento de la actividad DIO3 y descenso DIO1 explicarían la necesidad de administrar dosis sustitutivas muy elevadas de tiroxina y triyodotironina en sujetos críticos con hipotiroidismo para normalizar los niveles de TSH y la observación del aumento de rT3 circulante tras sus administración¹⁴⁵.

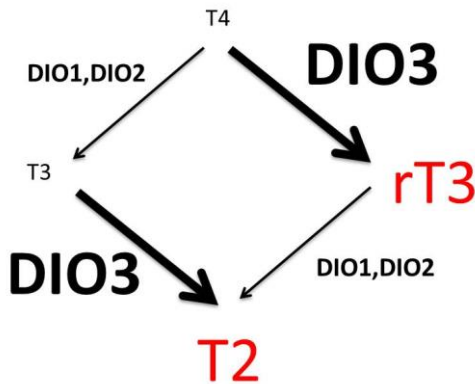


Figura 18. El hipotiroidismo por consumo es un cuadro resultante del aumento de la conversión de T4 a rT3 y la conversión de T3 a T2 por el incremento de la actividad de la enzima DIO3.

Dado que la producción de rT3 está limitada por la concentración de sustrato, en situaciones prolongadas en las que T4 está disminuida, la rT3 sérica no se eleva. Sin embargo, en estas situaciones el cociente rT3/T4 aumenta. En nuestro laboratorio se describió que pacientes con shock séptico ingresados en una unidad de cuidados intensivos presentaban un incremento de los niveles séricos de rT3 asociado a un aumento de la actividad DIO3 en el músculo⁸⁸. Otros estudios realizados en muestras obtenidas *postmortem* procedentes de enfermos críticos, también

encontraron una inhibición de DIO1 en el hígado y un incremento de la actividad DIO3 en hígado y musculo esquelético¹⁵⁰.

Los pacientes con enfermedad crítica tienen valores séricos de TSH normales o bajos. Estos valores son inapropiados para los niveles séricos de hormonas tiroideas que presentan estos pacientes, ya que sería esperable una elevación en la TSH como repuesta al descenso en los niveles séricos de hormonas tiroideas. Los mecanismos que previenen el incremento de TSH no se han caracterizado del todo¹⁵², aunque la idea vigente es que existe un descenso en la liberación de TRH hipotalámico. Así, estudios *postmortem* en humanos encontraron un descenso en la expresión de TRH a nivel del núcleo paraventricular en sujetos que fallecieron tras sufrir una enfermedad crítica respecto a aquellos que fallecieron por otras causas¹⁵³ (Figura 19). Además, estudios en humanos demostraron que la administración de TRH a pacientes críticos reestableció la concentración normal de TSH en el suero¹⁵⁴. Estas observaciones junto a estudios experimentales en roedores, en donde la administración de citoquinas inflamatorias causa un descenso en la expresión de TRH y beta-TSH^{155,156} ha extendido la creencia de que durante la enfermedad severa existe un hipotiroidismo central secundario a un bloqueo de la secreción de TRH y de TSH inducido por citoquinas inflamatorias y otros mediadores de stress como glucocorticoides.

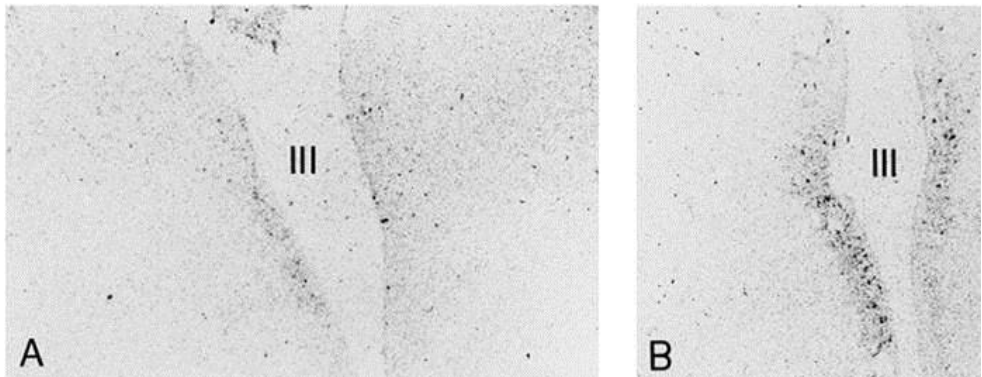


Figura 19. Autoradiografías de secciones representativas de hibridación in situ para ARNm de TRH de dos pacientes, mostrándose la región paraventricular (PVN) del hipotálamo a lo largo de la pared del tercer ventrículo. A. Señal de hibridación de baja intensidad de un paciente con enfermedad crítica. B. Señal de hibridación de alta intensidad de un paciente con concentraciones normales de hormonas tiroideas. (Imagen tomada de Fliers et al. Decreased hypothalamic thyrotropin-releasing hormone gene expression in patients with nonthyroidal illness. *J Clin Endocrinol Metab* 82, 4032-4036.1997)

Sin embargo, nosotros hemos observado en pacientes gravemente enfermos y que padecían hipotiroidismo primario severo no tratado, que niveles séricos bajos de T4 y T3 se asocian con niveles elevados -en ocasiones extremadamente elevados- de TSH sérica¹⁴⁵. Además, la administración a estos pacientes de levotiroxina o de una combinación de levotiroxina y triyodotironina, logró disminuir e incluso normalizar en algunos sujetos, los niveles de TSH. Este estudio clínico demuestra que durante la enfermedad severa, para mantener los niveles normales de TSH se requiere la presencia de T4. La aparente discrepancia en los niveles séricos de TSH durante la enfermedad crítica entre sujetos no hipotiroideos antes de la enfermedad (niveles normales) y sujetos

hipotiroideos (niveles elevados), pudiera explicarse por los cambios en la actividad de DIO2 inducidos por la respuesta inflamatoria a la enfermedad crítica. En roedores, la expresión y actividad de DIO2 aumenta en el hipotálamo y otras áreas del cerebro durante situaciones de stress inflamatorio^{157,158}. Como hemos comentado con anterioridad, DIO2 aumenta la conversión de T4 en T3, haciendo posible que en sujetos enfermos no previamente hipotiroideos este mecanismo mantenga niveles de T3 hipotalámicos dentro del rango normal, previniendo así la elevación de TSH, es decir se mantendría una situación de eutiroidismo hipotalámico; incluso, cuando se observa un descenso de la TSH, habría entonces un exceso de hormona tiroidea a nivel local. En caso de que no haya suficiente T4 circulante, como sucede durante el hipotiroidismo primario, se observaría la elevación de TSH; de hecho, el descenso en los niveles de TSH tras la administración de tiroxina observada en estos pacientes enfermos con hipotiroidismo primario no tratado apoya nuestra hipótesis.

Los niveles séricos y tisulares de T4 disminuyen en casos de enfermedad severa prolongada. Así, estudios *postmortem* en humanos, han mostrado que la concentración de T4 en el hígado de enfermos críticos fue un 66% menor que en sujetos muertos por enfermedad no crítica¹⁵⁹. En estos casos, además de un aumento en la metabolización de T4 en rT3 mediada por DIO3⁸⁸, existe posiblemente un aumento en la conversión de T4 a T3 a nivel hipotalámico-hipofisario mediada por DIO2^{158,160}, lo que conllevaría un descenso en los niveles séricos de TSH, que unido a una posible menor actividad biológica, tendría como resultado una menor producción de T4 por la glándula tiroides.

1.5.2. OTROS CAMBIOS MOLECULARES POTENCIALMENTE RELEVANTES ASOCIADOS A NTIS A NIVEL TISULAR.

Durante NTIS se producen cambios tisulares que podrían causar una menor sensibilidad a la acción de las hormonas tiroideas. Entre éstos, cabe citar una menor expresión de transportadores específicos de hormonas tiroideas⁸⁸ y de los receptores nucleares para hormonas tiroideas y algunos de sus cofactores¹⁶¹. Estos cambios son además tejido específico como hemos demostrado previamente en estudios en pacientes crítico⁸⁸. En pacientes críticos nosotros encontramos una disminución en la expresión de *DIO2* y un incremento de la actividad *DIO3* en el músculo, y un descenso en la expresión de *MCT8* en el tejido adiposo. Además, en músculo esquelético se observó una disminución en la expresión de *THRBI*, *RXRA* y *RXRG*, y en el tejido adiposo un descenso en la expresión de *THRBI*, *THRA1* y *RXRG* (Figura 20 y 21)^{88,144}. Estos hallazgos sugieren que durante la enfermedad crítica, unido a una menor biodisponibilidad de hormona tiroidea, existe un descenso en mediadores moleculares de sus acciones nucleares.

En esta misma línea, estudios en roedores tratados con lipopolisacárido bacteriano mostraron una disminución de la expresión de *THRA1*, *THRA2*, *THRB*, *RXRA*, *RXRB* y *RXRG* en el hígado¹⁶² y corazón¹⁶¹; así mismo, en ratones en ayuno, se observó un descenso en la expresión de *THRBI* e aumentó en la expresión de *DIO3* en el hígado¹⁶³.

La administración de leptina después del ayuno restableció los niveles de expresión de *DIO3*, mientras que los niveles de hormonas tiroideas en el suero y la expresión de *THRBI* en el hígado siguió siendo baja. Estos datos sugieren que el aumento de la expresión *DIO3* relacionado con el ayuno puede ser debido a los niveles bajos de leptina¹⁶³.

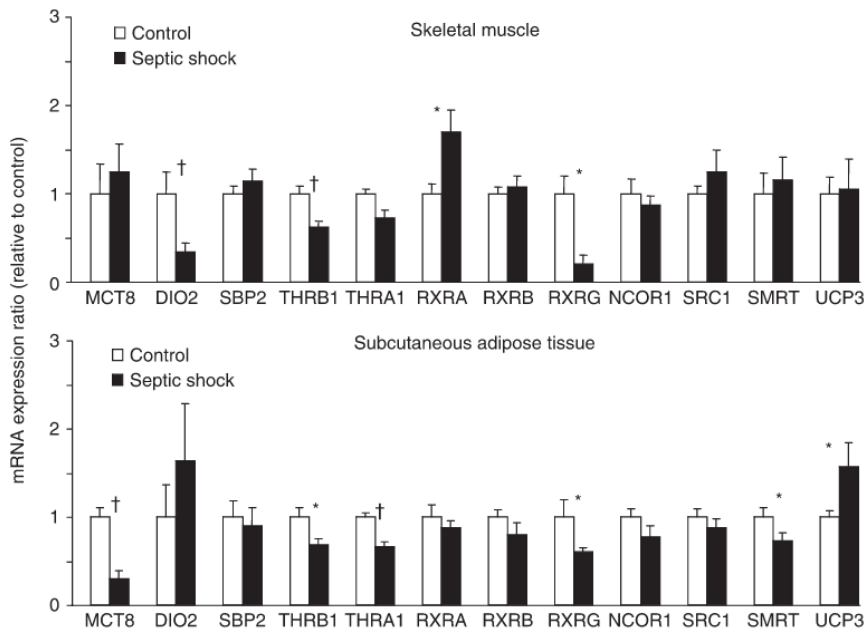


Figura 20: A, Expresión de ARNm del transportador 8 de monocarboxilatos (MCT8), dehidrogenasa 2 (DIO2), proteína fijadora de SECIS tipo 2 (SBP2), receptores de hormonas tiroideas (THRBI, THRA1), receptores X retinoide (RXRA, RXRB, RXRG), correpresor 1 de receptor nuclear (NCOR1), coactivador 1 de los receptores esteroides (SRC1), mediador silenciador de los receptores de hormonas tiroideas y retinoides (SMRT), y proteína desacopladora mitocondrial 3 (UCP3) en el músculo y el tejido adiposo de los pacientes con NTIS respecto al grupo control. (* $P < 0.05$, † $P < 0.01$) (Tomado de: Rodríguez-Perez, A. et al. Identification of molecular mechanisms related to nonthyroidal illness syndrome in skeletal muscle and adipose tissue from patients with septic shock. Clin Endocrinol (Oxf) 68, 821-827, 2008)

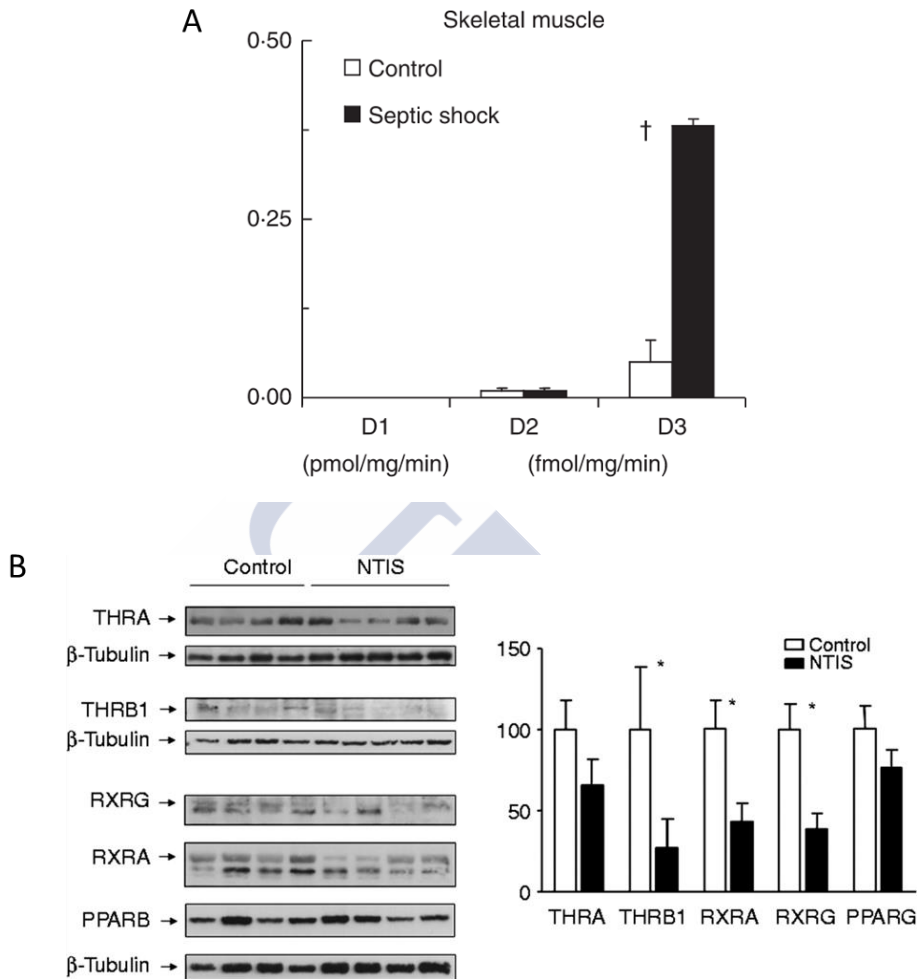


Figura 21: A, Actividad de yodinasas en el músculo de los pacientes con NTIS respecto al grupo control. (Tomado de: Rodríguez-Pérez, A. et al. Identification of molecular mechanisms related to nonthyroidal illness syndrome in skeletal muscle and adipose tissue from patients with septic shock. *Clin Endocrinol (Oxf)* 68, 821-827, 2008) B, Expresión proteica de THRA, THRB, RXRG, RXRA y PPARB en el músculo de pacientes con NTIS respecto al grupo control. (Tomado de: Lado-Abeal J, et al. Thyroid hormone receptors are down-regulated in skeletal muscle of patients with non-thyroidal illness syndrome secondary to non-septic shock. *Eur J Endocrinol*. 163(5):765-73, 2010)

El factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) está implicado en la inhibición del gen *DIO1*, a través de la activación del factor de transcripción NF- κ B, el cual una vez activado interfiere en la unión del complejo T3-TR con el elemento HRE del gen *DIO1*, inhibiendo así su expresión¹⁶⁴. En la línea celular hepática HepG2, IL-1 inhibe la expresión de *DIO1* y *THRBI*¹⁶⁵. La inhibición de la expresión de *THRBI* es debida exclusivamente a la vía de NF- κ B, mientras que la inhibición de la expresión de *DIO1* es necesaria la cooperación de la vía de NF κ B y AP-1¹⁶⁵.

Shock séptico como modelo de enfermedad severa.

Sepsis se define como la presencia probable o documentada de infección unido a una respuesta inflamatoria sistémica (SRIS), que puede dar lugar a disfunción aguda de órganos -sepsis severa- e hipotensión (presión arterial sistólica <90 mmHg, o presión arterial media <70 mm Hg, o un descenso en la presión arterial sistólica >40 mmHg) que no responde a la administración de fluidos -shock séptico-¹⁶⁶. La sepsis severa y shock séptico son la causa más frecuente de mortalidad en las unidades de cuidados intensivos, con una mortalidad intrahospitalaria del 30%, que aumenta al 70% en casos de disfunción miocárdica¹⁶⁷⁻¹⁶⁹. En USA estas situaciones clínicas son las que acarrear un mayor gasto sanitario, con un costo anual superior a 20,000 millones de USD.

Los pacientes con SRIS presentan al menos 2 de las siguientes manifestaciones: anormalidades en la temperatura corporal (hipotermia o hipertermia), taquicardia, taquipnea, y en el recuento de linfocitos (leucocitosis o leucopenia)¹⁷⁰. El SRIS es la respuesta del organismo a

múltiples insultos, incluyendo la infección, isquemia, politraumatismo o shock hemorrágico,

La iniciación de la respuesta del huésped durante la sepsis o daño tisular está asociada a la activación de los *receptores de reconocimiento de patrones* (RRP), como son los receptores TLR (del inglés, *toll-like receptor*), por secuencias de moléculas encontradas en patógenos denominadas *patrones moleculares asociados a patógenos* (PAMPs). Estos receptores inician la respuesta inmune innata y regulan la respuesta inmune adaptativa. La expresión de TLR4 aumenta significativamente en pacientes con sepsis, modelos animales de sepsis y trauma, incluyendo trauma térmico¹⁷¹.

Los modelos animales de sepsis se pueden dividir en 3 categorías: a) inyección de una toxina exógena como LPS, b) alteración de la barrera protectora endógena del animal como el modelo de ligación y punción cecal y c) administración o inoculación de bacterias por vía intravenosa o intracavitaria.

La administración de LPS induce inflamación sistémica que mimetiza muchas de las características iniciales de la sepsis, incluyendo el incremento de citoquinas proinflamatorias como TNF- α y IL-1, pero sin bacteriemia. El modelo de ligación y punción cecal induce sepsis con un perfil de citoquinas similar al humano y mimetiza la inmunosupresión característica de la fase tardía de la sepsis. La reproducción de este modelo es complicada ya que esta manipulación quirúrgica hace que múltiples especies de bacterias estén presentes en el torrente sanguíneo y el tratamiento de apoyo con fluidos y antibióticos varía entre laboratorios.

La administración de bacterias puede ayudar en el caso del estudio de sepsis producidas por un patógeno en concreto como neumonía causada por infección nosocomial¹⁷⁰. El modelo estudiado con más frecuencia es el de la administración exógena de endotoxina a través de diferentes vías, intravenosa, intraperitoneal o intratraqueal. Este modelo es el más sencillo de realizar, produce la mayor homogeneidad y es relativamente fácil de replicar¹⁷².

Una consideración a tener en cuenta al elaborar estos modelos es la especie animal en la que se realiza. En fisiopatología humana, lo ideal es el empleo de especies que se asemejan lo máximo posible al ser humano. Aunque el uso de ratas y ratones es muy común debido a la facilidad de cría y su coste relativamente bajo, existen importantes diferencias en fisiología tiroidea entre estos animales y humanos. Además, los roedores son relativamente resistentes a la endotoxemia¹⁷².

En este trabajo hemos elegido 1) el shock séptico como modelo de enfermedad debido a su importancia y frecuencia en el medio hospitalario, 2) el LPS como medio para crear el shock debido a su contrastada efectividad y reproducibilidad así como fácil manejo y bajo costo, y 3) el cerdo doméstico como animal de experimentación por ser un animal grande, con una fisiología extrapolable a la humana al menos en cuanto a respuesta cardiovascular a la sepsis, de bajo coste y fácil disponibilidad en nuestra institución.



2. OBJETIVOS

El principal objetivo del presente trabajo es el de establecer un modelo porcino de shock séptico con la finalidad de estudiar el hipotiroidismo causado por enfermedad. En concreto, pretendemos evaluar 1) los efectos del shock séptico sobre los niveles de hormonas tiroideas en suero y tejidos, y 2) cambios de la expresión génica de los genes relacionados con el metabolismo de hormonas tiroideas y 3) la relación entre el factor de transcripción NF- κ B y el descenso de la expresión del receptor de hormonas tiroideas *THRB* durante la sepsis.





3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. ANIMALES:

El uso de animales de experimentación fue aprobado por el Comité Institucional para el Uso y Cuidado de Animales (IACUC) de Texas Tech University.

Se estudiaron 20 hembras porcinas prepúberes, de 3 meses de edad, con un peso de 9.5 a 10.5 kg. Los animales se distribuyeron en dos grupos de 10 animales cada uno, grupo control y grupo sepsis.

Los animales se trasladaron desde el criadero al lugar de experimentación con al menos 24 horas de antelación a la cirugía, para facilitar su aclimatación. Los animales se estabularon en jaulas individuales, con comida y agua *ad libitum*, en una sala con control de temperatura ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$), humedad ($55\pm 5\%$), y ciclos de luz-oscuridad de 12 horas (Figura 22).

En cada animal se insertaron dos catéteres centrales a través de las venas yugulares, que se utilizaron para la extracción de sangre, y administración de sueros, medicación y LPS a los animales en libre movimiento. Los catéteres se prepararon en nuestro laboratorio con material de vinilo (SCI Scientific Commodities, AZ), con un diámetro interno de 1.40 mm y externo de 1.91 mm. En cada catéter se pegaron con silicona dos trozos de tubo de vinilo amarillo de diámetro 3.17 x 6.40 mm para facilitar la sujeción del catéter al músculo. Finalmente, el extremo del catéter por donde se extrajeron las muestras se preparó insertando con una aguja recortada de punción venosa de 19G.

Para la inserción de catéteres, los animales se sedaron con Tiletamina/Zolazepam, Ketamina y Xylazina, (0.022-0.044 mL/kg/i.m.),

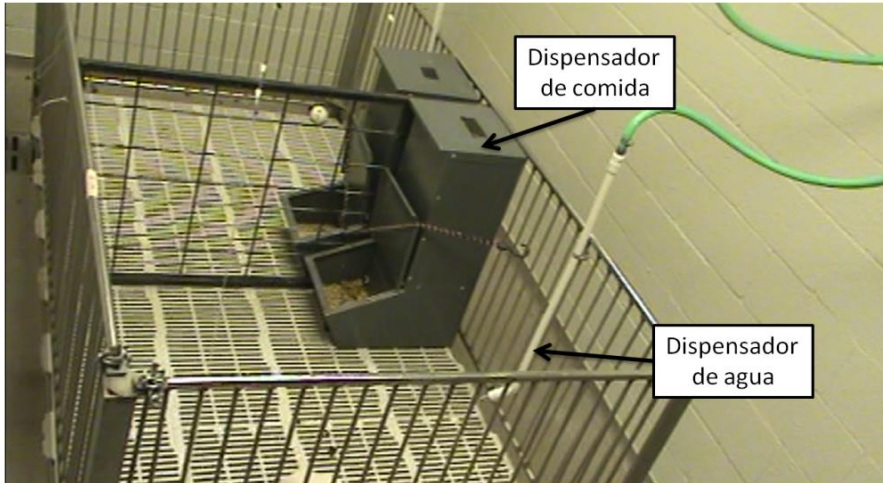


Figura 22. Detalle de las jaulas en las que se acomodaron los animales. En la imagen se observa los dispensadores de agua y comederos.

manteniéndose luego con isofluorano administrado mediante una máscara facial. La cirugía requirió incisión por planos del cuello, en el área comprendida entre la rama caudal mandibular, el tubérculo mayor del húmero y el manubrio del esternón (Figura 23A). Tras visualización y exposición de las venas yugulares externa o interna, se colocaron dos suturas a ambos lados de donde se va a realizar la incisión venosa para introducir el catéter (Figura 23B). Previamente a la introducción del catéter, éstos se llenaron de suero salino con heparina (10UI/mL) para evitar la formación de coágulos. Tras realizar la incisión e introducir el catéter se cerraron las suturas firmemente, la sutura anterior a la incisión evita el flujo de sangre y la sutura posterior sirve para sujetar el catéter en

la vena. Posteriormente se tunelizó el catéter por debajo de la piel hasta detrás de la oreja.

Tras la cirugía, se permitió la recuperación del animal durante al menos 24 horas, transcurridas las cuales se les aplicó un sistema de telemetría externo (Jacketed External Telemetry, Data Sciences International, MN, USA.), mediante el cual se registró de forma continua la temperatura y frecuencia cardíaca de los animales (Figura 23C).

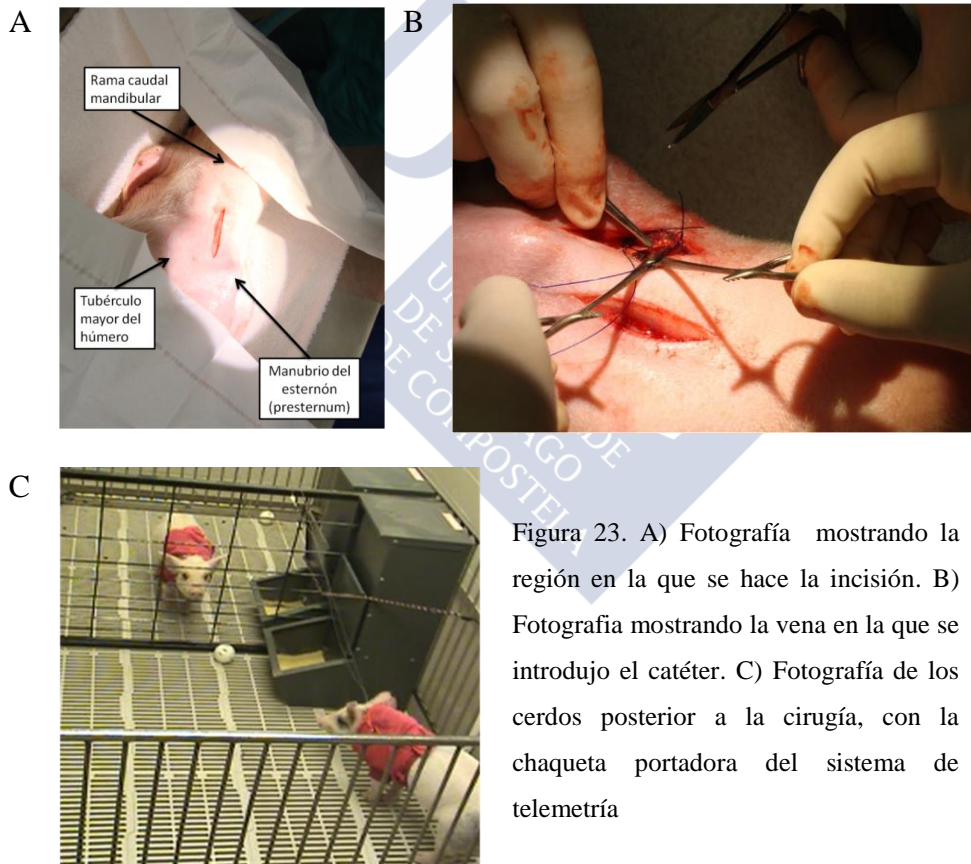


Figura 23. A) Fotografía mostrando la región en la que se hace la incisión. B) Fotografía mostrando la vena en la que se introdujo el catéter. C) Fotografía de los cerdos posterior a la cirugía, con la chaqueta portadora del sistema de telemetría

Los registros de temperatura y actividad cardíaca se iniciaron 12 horas antes de la fase experimental.

La administración de LPS se realizó en *bolus* a 3.5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{minuto}$ durante 5 minutos seguido de la infusión continua a 3.5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{hora}$ durante 12 horas. Si transcurridas 12 horas, el incremento de temperatura corporal se mantuvo por debajo de 2°C respecto a la temperatura inicial, la concentración de LPS a infundir se aumentó a 4 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{minuto}$ durante 5 minutos y se mantuvo a 4 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{hora}$ durante 12 horas. En caso de que la temperatura aumentó por encima de 2°C respecto a la inicial, se mantuvo la infusión al ritmo inicial, 3.5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{hora}$. Transcurridas las primeras 24 hrs, se procedió a dar otro *bolus* con un incremento en la concentración de 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ respecto a la previa, siempre que la temperatura corporal no superara los 41 °C. La administración de LPS se suspendió siempre que la temperatura corporal superara 41 °C.

Las muestras de sangre venosa se obtuvieron antes de empezar la infusión, y transcurridas 8, 16, 24, 32, 40 y 48 horas del inicio.

A las 48 horas desde el inicio de la infusión, los animales se sacrificaron mediante la administración de *Fatal Plus* (Vortech Pharmaceuticals, MI, USA). En el grupo LPS, algunos animales fallecieron o se decidió su sacrificio antes de las 48 horas debido a la gravedad clínica del shock.

3.2. DETERMINACIONES HORMONALES:

3.2.1. ANÁLISIS DE LOS NIVELES HORMONALES EN SUERO.

Los niveles séricos de FT4, FT3, rT3 y cortisol, se midieron en las muestras de sangre obtenidas a los tiempos 0 hrs y al final del estudio (grupo control: 48-hrs; grupo LPS: 48 hrs o momento de muerte según lo que ocurrió primero). La determinación de FT4, FT3 y cortisol se realizó mediante quimioluminiscencia usándose los inmunoensayos comerciales ADVIA Centaur (Bayer Diagnostics, Leverkusen, Alemania) para FT4 y FT3, e Immulite 2000 (DPC, Gwynedd, R.U.) para el cortisol. La determinación de rT3 se realizó mediante radioinmunoanálisis (RIA) comercial (Alpco Diagnostics, Salem, NH, USA.).

3.2.2. ANÁLISIS DE LOS NIVELES HORMONALES EN TEJIDO.

Los niveles de T4 y T3 en lóbulo frontal, pulmón, ventrículo izquierdo del corazón, hígado, corteza renal y músculo esquelético se midieron por RIA de desarrollo propio. Los tejidos (100-150 mg) se homogeneizaron en 10 volúmenes de metanol, a los que se añadieron 2000 cpm de [¹³¹I]-T4 y [¹²⁵I]-T3 por muestra como controles internos para evaluar la recuperación de T4 y T3. Las hormonas se extrajeron en una mezcla de cloroformo y metanol (2:1), a la que posteriormente se añadieron 0.25 volúmenes de Cl₂Ca al 0,005%. Los extractos se purificaron por cromatografía de intercambio iónico en columnas de resina Bio-Rad AG 1X2 (Bio-Rad Laboratories, USA.), eluyendo las yodotironinas de la columna con ácido acético al 70%. La radioactividad de cada eluido se cuantificó con un contador gamma (Packard Cobra Gamma Counter, Perkin Elmer, MA, USA.), medición que se empleó

para calcular la recuperación individual de cada hormona en cada una de las muestras analizadas. El eluido se concentró por evaporación hasta secarse por completo, resuspendiéndose luego en 100 μL de tampón de RIA (0.04M tampón fosfato pH 8.0, 0.2% BSA, 0.06 mM mertiolato) que contiene 6000 cpm de [^{125}I]-T4 ó [^{125}I]-T3 y 100 μl del antisuero específico (en una dilución 1/300000 para T4 y 1/150000 para T3). Después de 12-24 horas de incubación, se añadieron 1.5 mL de tampón de RIA con 90 mg de polietilenglicol 6000 y 45 μl de suero bovino. Las muestras se precipitaron por centrifugación y se contó la radiactividad del precipitado. Se realizaron las curvas estándar tanto para T3 como para T4. La curva patrón del RIA de T4 cubrió el rango de 2.5 a 320 pg, siendo el límite de detección de 2.5 pg/tubo. La curva patrón del RIA de T3 cubrió el rango de 1.5 a 100 pg, siendo el límite de detección de 1.5 pg/tubo. Cada muestra se procesó por duplicado.

Las concentraciones de cada hormona en la muestra inicial se calcularon teniendo en cuenta el peso de la muestra original homogeneizada, la recuperación de los trazadores durante el proceso de extracción y el volumen de cada alícuota, y se expresaron en ng por mg de tejido

Las hormonas [^{131}I]-T4, [^{125}I]-T3 and [^{125}I]-T4 con una alta actividad específica ($\geq 3000 \mu\text{Ci}/\mu\text{g}$) se sintetizaron en el laboratorio de la Profesora María Jesús Obregón (Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid).

3.3. CUANTIFICACIÓN DE EXPRESIÓN GÉNICA.

La expresión de los genes estudiados se cuantificó mediante PCR en tiempo real a partir de muestras tisulares de ARN total. Este procedimiento se realizó en tres pasos: extracción del ARN total, síntesis del ADN complementario (ADNc) y PCR en tiempo real.

3.3.1. EXTRACCIÓN DEL ARN TOTAL.

El ARN de tejidos se extrajo mediante TRIZOL (Reagent® Invitrogen™ Life Technologies). Para ello, muestras de 50 mg se homogeneizaron en 1.0 mL de TRIZOL®, mediante un Polytron PT (Kinematica AG). El tejido homogenizado se incubó 5 minutos a temperatura ambiente para permitir la completa disociación de los complejos de nucleoproteínas. A continuación, se añadieron 200 µL de cloroformo frío, se agitó vigorosamente durante 15 segundos y se incubó 3 minutos en hielo. Posteriormente la muestra se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 min a 4°C; en este paso se forman dos fases por la diferencia de densidad; la fase fenólica orgánica, contiene el ADN y los restos de proteínas desnaturalizadas y la fase superior acuosa contiene el ARN en cloroformo. La fase acuosa se transfirió a un tubo de 1.5 mL y se añadieron 500 µL de isopropanol, para precipitar el ARN. El ARN así precipitado se lavó con 1 mL de etanol al 75%, y se centrifugó 5 minutos a 7,500 rpm a 4°C. En el último lavado, el etanol se eliminó y el ARN precipitado se secó al aire aproximadamente 10 minutos. Finalmente el ARN se resuspendió en 30-50 µL de agua libre de ARNasas.

La concentración y pureza del ARN se determinó en un espectrofotómetro (Nanodrop, Thermo Scientific, IL, USA.). Se tomó una

alícuota de 2 μ L del ARN obtenido mediante la extracción con Trizol y se midió la absorbancia a 260 nm para determinar la concentración y la razón de las absorbancias a 260/280 nm para determinar la pureza en un espectrofotómetro. En este estudio se descartaron las muestras con relación 260/280 < 1.8.

3.3.2. SÍNTESIS ADN COMPLEMENTARIO POR TRANSCRIPCIÓN REVERSA.

ADN complementario se sintetizó a partir del ARN total por medio de transcripción reversa usando la enzima retrotranscriptasa M-MLV RT (del inglés, “*Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase*”). El procedimiento se realizó en un tubo de 200 μ L estéril, al que se le añadieron 10 μ L de la siguiente mezcla: 1.5 μ g ARN, 1 μ L hexámeros aleatorios (Sigma, USA.) y H₂O. La reacción se sometió a un ciclo de desnaturalización a 70°C durante 5 minutos en un termociclador (Mastercycler® pro PCR thermal cycler, Eppendorf, USA.), transcurridos los cuales los tubos se transfirieron a hielo, se centrifugaron y se agregaron 5 μ L de Buffer de reacción 5X M-MLV RT (Promega, USA.), 1 μ L de 10 mM dNTP's (Sigma, USA), 1 μ L de la transcriptasa reversa M-MLV (Promega, USA.) y 3 μ L de H₂O. La mezcla resultante se incubó 10 minutos a temperatura ambiente, trasladándose luego al termociclador donde se sometieron a un ciclo de síntesis de ADNc a 37°C durante 60 minutos y a un ciclo final de 90°C durante 10 minutos en el que se desnaturaliza la enzima.

3.3.3. PCR EN TIEMPO REAL.

La cuantificación de los genes se realizó mediante PCR en tiempo real usando RT2SBYR green ROX master mix (Qiagen, USA.). Para cada reacción se usaron 5 μL de 5X RT² Fast SYBR[®] Green Mastermix (Quiagen, USA.), 4.8 μL de H₂O, 1 μL de cebadores específicos a concentración 10 μM y 1 μL de ADNc en un volumen total de 10 μL en cada pocillo del plato (MicroAmp[®] Optical 96-Well Reaction Plate, Applied Biosystems[®]). La amplificación de ADNc se realizó en el termociclador a tiempo real (7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems, USA) bajo las siguientes condiciones: 95°C 5 minutos, 40 ciclos de 95°C 20 segundos y 60°C 30 segundos seguidos de una curva de disociación para confirmar la especificidad del producto amplificado. Los valores obtenidos se normalizaron usando el gen control RPL4 mediante el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ ¹⁷³.

El diseño de los oligonucleótidos para la amplificación por PCR en tiempo real se realizó mediante el programa Primer 3 (<http://primer3.wi.mit.edu/>). Para el diseño se consideró que el producto de PCR debería tener entre 70-200 bp, que los oligonucleótidos no formasen dímeros, para evitar que el fluoroforo SYBR green se uniera a ellos, y que los oligonucleótidos estuviesen situados en las uniones exón-exón para evitar la amplificación de ADN genómico que produciría un resultado falso positivo¹⁷⁴ (Figura 24).

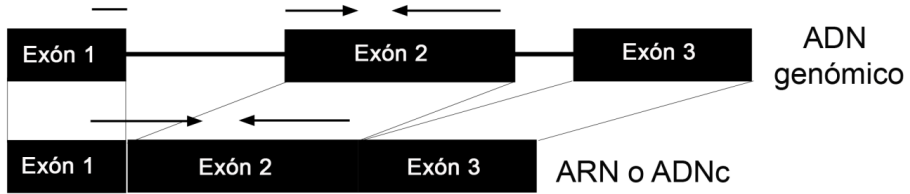


Figura 24. Esquema del diseño de los oligonucleótidos. Los oligonucleótidos, representados con las flechas, se situaron en las unión de dos exones para evitar la amplificación de ADN genómico.

Los genes y secuencias de oligonucleótidos utilizados se muestran en la siguiente tabla:

Gen	Secuencia Sentido	Secuencia anti-sentido
Proteína ribosómica LA (<i>RPL4</i>)	5'-CCGAATCCAGCGCAGGGGAC-3'	5'-CGTCCCACATGCCACCAGG-3'
Receptor de HT β (<i>THRB</i>)	5'-ATCAGTGCCAGGAATGTCGC-3'	5'-GATCAGCTTCCTCTTGGCCA-3'
Receptor de HT α1 (<i>THRA1</i>)	5'-CACTGCCCCGTCCTCCTCA-3'	5'-GCCACGGTCTCCATCCCCT-3'
Receptor de HT α2 (<i>THRA2</i>)	5'-GTACAAGGGGGCAGCGGCAG-3'	5'-TGCTGCTCAAGTGCCGGAC-3'
Deiodinasa 1 (<i>DIO1</i>)	5'-GCCCGTGGTGGTGACACA-3'	5'-GGGTGGTAGTTCAGGGGCCA-3'
Deiodinasa 2 (<i>DIO2</i>)	5'-TCGATGCCTACAAACAGGTGA-3'	5'-TTGGCAAAGTCCAGAAGGTG-3'
Transportador MCT8 (<i>SLC16A2</i>)	5'-GTGGAGTTCCAAGCAGCATGG-3'	5'-CCCCCGCGTTGCTGTGATT-3'
Coactivador receptor nuclear 1 (<i>NCoA1</i>)	5'-CATTGGCATCAAGCACTGAAA-3'	5'-GCTGTCAATGTCACTGATGTTGG-3'
Receptor X-retinoide α (<i>RXRα</i>)	5'-CTGGTGGAGTGGCCAAAGCG-3'	5'-CGTTCAGCCTGCCCTCAGC-3'
Receptor X-retinoide β (<i>RXRβ</i>)	5'-TAGCGGCAGCAGCCGAATG-3'	5'-TCCAGCCTGCCCTAGCAGT-3'
Prostaglandina-endoperoxido sintasa 2 (<i>PTGS2</i>)	5'-GGCTGATACTGATAGGAGAAACG-3'	5'-GGAATTGCTGGTTGAAAAGC-3'
Factor 1 inducible por hipoxia (<i>HIF-1</i>)	5'-ACCCTCTGACTTAGCCTGTAGACTC-3'	5'-GCTGCCTTGTATAGGAGCATTAAAC-3'

3.4. MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD DEYODINASA:

La actividad de las deydodinasas se cuantificó midiendo la deydodinación producida por la enzima correspondiente tras la incubación de los tejidos con una concentración elevada de hormona marcada y los substratos necesarios para cada enzima. Este procedimiento se realizó en tres pasos: purificación de la hormona marcada, preparación de la columna, y ensayo de actividad deydodinasas.

3.4.1. PURIFICACIÓN DE LA HORMONA MARCADA:

Las hormonas marcadas radiactivamente se purificaron mediante diálisis con el fin de eliminar el ^{125}I libre⁸⁵. Tras calcular la cantidad necesaria de hormona marcada para el ensayo⁸⁵, se procedió a purificar tres veces esta cantidad, ya que en este paso se pierde un 70%. A cada 15-20 μL de hormona marcada a purificar se añadieron 200 μL de suero libre de hormonas tiroideas. Esta mezcla se introdujo en una membrana de diálisis (Spectra/Por 1, Spectrumlabs, USA.) con un diámetro de malla que retiene elementos de peso molecular mayores de 6-8 kD. En la situación de equilibrio el I libre difunde hacia el exterior quedando la hormona marcada en el interior de la membrana (Figura 27).

En un matraz Erlenmeyer se añadió 500 mL del buffer de diálisis (0.15M fosfato potásico, pH 7.4 a 4°C) y se colocó la membrana de diálisis con la mezcla. La diálisis se realizó en una cámara fría (4°C), agitándose mediante una barra magnética. Trascorridos 60 min. se cambió el buffer de diálisis y se dializó de nuevo durante 1 hora. Al final de éste periodo se comprobó que la radiactividad de este buffer era menor de 200 cpm, si fuese mayor se volvería a cambiar el buffer y dializar otra hora. Al final del proceso, se extrajo la mezcla radiactiva de la membrana y se colocó en un tubo de 1.5 mL, añadiéndose 800 μL de etanol 100%, seguido de centrifugación a 14000 rpm durante 10 minutos. Se recogió el sobrenadante y se colocó en un tubo de 1.5 mL, se eliminó el etanol usando un secador de vacío. La hormona purificada se resuspendió en 100-200 μL del buffer de reacción y de los cuales se usó 1 μL para cuantificar la cantidad de hormona pura obtenida después de este proceso.

3.4.2. PREPARACIÓN DE LAS COLUMNAS DOWEX AG50WX2:

Para la elaboración de la columna se usó una resina de intercambio catiónico AG50WX2 (Bio-Rad, USA). Se humedeció la resina AG50WX2 con 10% de ácido acético 1.74 M empapándose completamente, y se conservó a 4°C. Se atemperó al menos 30 minutos antes de usarse. Las columnas se construyeron con una pipeta Pasteur de cristal y una bola de cristal, que se introdujo en la pipeta. Se marcó en la pipeta el nivel del volumen de 1 mL y se rellenó la columna con la resina hasta ese nivel. La columna se equilibró con 10 volúmenes (10 mL) de 10% de ácido acético 1.74 M, y se selló con parafilm en el extremo superior, hasta su uso.

3.4.3. ENSAYO DE LA ACTIVIDAD DEYODINASA:

Para la determinación de la actividad DIO1 y DIO2, los tejidos se homogenizaron en un tampón 0.1M fosfato potásico que contenía 2mM EDTA y 2mM DTT a pH 7.0. Para la determinación de la actividad DIO3 se utilizó el mismo tampón sustituyendo 2mM DTT por 10mM DTT. La concentración proteica se determinó mediante el método Bradford (Bio-rad, USA.). Para la cuantificación de proteína se elaboró una curva patrón con BSA, el rango lineal de BSA para este ensayo es 1.25 a 10 µg/mL. Se pipetearon los estándares de BSA (de concentraciones entre 1.25 y 10 µg/mL), los blancos (no contienen proteína) y las muestras a cuantificar en los pocillos del microplato. Los estándares, los blancos y las muestras se realizaron por triplicado. Se añadió 150 µL del colorante 1X, la muestra o el estándar y agua hasta un volumen final de 250 µL. La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos. La lectura

de la absorbancia se realizó a 595 nm en un lector de placa (BIO-RAD Model 550 Microplate reader, USA.).

El ensayo de DIO1 se realizó a 37°C durante 1 hora, con 25-50 mg de proteína del tejido homogenizado en una reacción que contenía los siguientes componentes:

- **Reacción DIO1** (Volumen total 100µL): [¹²⁵I]-rT3 (100000cpm/tubo), 400 nM rT3 y 2mM DTT.
- **Reacción DIO1 con propiltiouracilo (PTU)** (Volumen total 100µL): [¹²⁵I]-rT3 (100000cpm/tubo), 400 nM rT3, 2mM DTT y 1mM PTU. Esta reacción se utilizó para evaluar la actividad real de DIO1, ya que PTU es un inhibidor de DIO1.

Las muestras se analizaron por duplicado y los resultados se expresaron en pmol/min/mg de proteína.

El ensayo de DIO2 se realizó a 37°C durante 2 horas, con 50 mg de proteína del tejido homogenizado en una reacción que contenía los siguientes componentes:

- **Reacción DIO2** (Volumen total 100µL): [¹²⁵I]-T4 (200000cpm/tubo), 1 µM T3 (para inhibir la actividad DIO3), 20mM DTT, 1mM PTU (para inhibir la actividad DIO1) y 2nM de T4.
- **Reacción para saturar DIO2** (Volumen total 100µL): [¹²⁵I]-T4 (200000cpm/tubo), 1 µM T3, 20mM DTT, 1mM PTU y 500nM de T4.

Para cuantificar la actividad inespecífica de la enzima se realizó otra reacción con las mismas condiciones en la que se sustituyó 2 nM T4 por 500 nM T4. Todas las muestras se analizaron por duplicado y los resultados se expresaron en fmol/min/mg de proteína.

El ensayo DIO3 se realizó a 37C durante 2 horas, con 50 mg de proteína del tejido homogenizado y la reacción contenía:

- **Reacción DIO3** (Volumen total 100µL): [¹²⁵I]-T3 (200000cpm/tubo), 1 nM T3, 10mM DTT, 2mM EDTA y 1mM PTU.
- **Reacción para saturar DIO3** (Volumen total 100µL): [¹²⁵I]-T3 (200000cpm/tubo), 1 µM T3, 10mM DTT, 2mM EDTA y 1mM PTU.

Para cuantificar la actividad inespecífica de la enzima se realizó otra reacción con las mismas condiciones en la que se sustituyó 1 nM T3 por 1 µM T3. Todas las muestras se analizaron por duplicado y los resultados se expresaron en fmol/min/mg de proteína.

Las reacciones DIO1 y DIO2 se pararon añadiendo 100 uL de 2 % BSA fría y 800 µL de 10 % de ácido tricloroacético, se centrifugaron y se recogió 800 µL del sobrenadante. Este se transfirió a las columnas AG 50W-X2 previamente preparadas como se describió arriba. El ¹²⁵I se eluyó de la columna añadiendo a esta 10% de ácido acético glacial y se midió en un contador gamma (Packard Cobra Gamma Counter, Perkin Elmer, MA, USA.).

Las reacciones DIO3 se pararon añadiendo 100µL de metanol frío, se centrifugaron y el sobrenadante se inyectó a una columna analítica 250 x 4.6 mm ID, 5µm Viva C18 conectada a un sistema HPLC Rainin HPXL. Para la elución de la columna se empleó el método isocrático con una solución de metanol y H₂O (55:45) pH 3.0 con un flujo de 1mL/min. Se recogieron fracciones cada 0.3 minutos y se midieron en un contador gamma.

El límite de detección de cada ensayo se realizó en las muestras blanco analizadas por cuadruplicado, en la que se sustituyó el tejido homogenizado por el buffer de homogenización. El límite de detección del ensayo se calculó como la media de ¹²⁵I (DIO1 y DIO2) o [¹²⁵I]-T2 (DIO3) producido por los blancos y multiplicado por 3.3 veces la desviación estándar. Este valor se restó al valor obtenido por las muestras.

3.5. ENSAYO DE RETARDO EN GEL DE POLIACRILAMIDA O "ELECTROPHORETIC MOBILITY SHIFT ASSAY" (EMSA):

El análisis de la unión de NF-κB al ADN se realizó mediante EMSA. El procedimiento se realizó en tres pasos: obtención de los extractos nucleares, preparación del oligonucleótido marcado y ensayo de retardo en gel.

3.5.1. OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS NUCLEARES

Se obtuvieron extractos proteicos nucleares de lóbulo frontal, cerebelo, ventrículo izquierdo del corazón, pulmón, hígado, corteza renal, bazo, glándula suprarrenal y músculo esquelético. Para ello se utilizó un kit de extracción nuclear (Signosis, Inc, USA), empleando

homogenizados de 20-100 mg. Después de la homogenización, el tejido se centrifugó a 500 X g durante 5 minutos a 4°C, eliminándose el sobrenadante y resuspendiéndose el precipitado con 1 ml del buffer I (Signosis, Inc, USA). La muestra se agitó en hielo a 200 rpm durante 10 minutos, centrifugó a 10,000 X g durante 5 minutos a 4°C, y eliminó el sobrenadante completamente, añadiéndose 100 µL del buffer II (Signosis, Inc, USA). La muestra se agitó de nuevo en hielo durante dos horas, centrifugó a 12,000 rpm durante 5 minutos a 4°C, y el sobrenadante obtenido es el extracto nuclear que se utilizó para realizar los experimentos.

Como control positivo se usó extracto nuclear obtenido de células HepG2 tratadas con TNF α , citoquina proinflamatoria que activa NF- κ B. La células HepG2 se cultivaron en medio EMEM (*Eagle's minimum essential médium*, ATCC, USA) al que se añadió 10% de suero bovino fetal (*FBS*, Atlanta Biologicals, USA) y 50 µg/mL de gentamicina (Atlanta Biologicals, USA). El medio de cultivo se cambió 24 horas antes del tratamiento, por un medio EMEM sin FBS. Las células se trataron con TNF α , 50 ng/mL, durante 30 minutos, tras lo cual se procedió a la obtención del extracto nuclear. Las células se resuspendieron en Buffer A (10mM HEPES, 10mM KCl, 0.2mM EDTA, 0.1mM EGTA y 1mM DTT) y se lisaron con ayuda de una aguja de 27G, el lisado se pasó 6 veces a través de la jeringa. Tras una centrifugación a 12,700 g durante 5 minutos a 4°C el sobrenadante (extracto nuclear) se almacenó a -80°C.

La cuantificación de la proteína obtenida se realizó mediante el método Bradford.

3.5.2. PREPARACIÓN DEL OLIGONUCLEÓTIDO MARCADO

Se diseñaron oligonucleótidos con una secuencia consenso para su unión al factor NF- κ B, 5'-AGTTGAGGGGACTTCCCAGGC-3', y con la secuencia mutada que evita así su unión a NF- κ B, 5'-AGTTGAATTCACTTCCAGGC-3'.

Los oligonucleótidos (Invitrogen, USA) se anillaron para obtener una sonda de doble cadena; para ello, se mezclaron en tubo de 1.5 mL los siguientes componentes: 20 μ L de cada oligonucleótido 25 pmol/ μ L (sentido y anti-sentido), 5 μ L de 10X buffer ligasa y 5 μ L de agua. Esta mezcla se calentó a 95°C durante 5 minutos en un bloque térmico y se dejó en el bloque térmico apagado para permitir que se enfriase lentamente hasta alcanzar la temperatura ambiente. La sonda de ADN se marcó enzimáticamente usando la T4-Polinucleótido-kinasa (PNK) (New England Biolabs, USA). Esta enzima cataliza la transferencia del 32 Pi en la posición γ del ATP al grupo hidroxilo del extremo 5' terminal del oligonucleótido. Los oligonucleótidos ya anillados se diluyeron a la concentración 1.75 pmol/ μ L. En un tubo de 1.5 mL se mezclaron los siguientes componentes: 4 μ L de los oligonucleótidos 1.75 pmol/ μ L, 1 μ L del tampón 10X PNK, 3 μ L H₂O, 1 μ L de la enzima PNK y 1 μ L de [γ - 32 P] ATP (3000Ci/mmol at 10mCi/mL, Perkin Elmer). Esta mezcla se incubó a 37°C durante 1 hora, se paró la reacción añadiendo 1 μ L de EDTA 0.5M y se añadió 89 μ L de agua obteniéndose un volumen final de 100 μ L. El oligonucleótido marcado se purificó usando columnas de exclusión molecular de Sephadex G-50 (Illustra ProbeQuant, GE

Healthcare, NJ, USA) mediante centrifugación a 735g durante 2 minutos a 4°C.

3.5.3. ENSAYO DE RETARDO EN GEL

Se utilizó un gel no desnaturizante de 6% de poliacrilamida en 0.5X TBE buffer. El gel se realizó mezclando 6% Acrilamida/Bisacrilamida (37.5:1), tampón TBE (90 mM Tris-Base, 90 mM Ácido Bórico, 2mM EDTA pH 8.0), 0.25% Nonidet P-40 (10%) (Sigma, USA), 0.055% Persulfato amónico (Bio-Rad, USA) y 0.002% TEMED (Gibco BRL, USA). La reacción de unión es necesaria para permitir la formación de los complejos ADN-proteína. Es necesario ajustar las condiciones de incubación a cada oligonucleótido y tipo de extracto nuclear. Para realizar las reacciones de unión se mezclaron en un tubo de 1.5 mL los siguientes componentes: 10 µg de extracto nuclear, 0.25 mg/ml poly(dI-dC), oligonucleótido marcado en 1X Tampón de unión (5 mM MgCl₂, 2.5 mM EDTA, 2.5 mM DTT, 250 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 y 20 % glicerol). Esta mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 20 minutos. Para los experimentos de competencia, que permiten analizar la especificidad de los complejos formados entre las proteínas nucleares y las sondas marcadas radiactivamente, a la mezcla de unión se añade el nucleótido sin marcar o frío (100X), durante la incubación previa a la reacción de unión. De esta forma, todos los complejos inespecíficos con ADN marcado no se desplazan y los complejos que permanecen unidos a la sonda representan las asociaciones específicas. Esto se confirma por la desaparición del complejo en presencia de exceso de sonda fría.

El ensayo EMSA es lo suficientemente sensible como para añadir un anticuerpo específico que causa un retardo en la migración o “super-retardamiento” al unirse este anticuerpo a la proteína que está unida al oligonucleótido. La movilidad del complejo anticuerpo-proteína-oligonucleótido es mucho menor a la del complejo proteína-oligonucleótido. Para los experimentos de “super-retardamiento” se añadió 0.4 µg del anticuerpo p50 o p65 (Santa Cruz, USA) al buffer de unión con la proteína 20 minutos antes de añadir poly(dI-dC) y la sonda marcada. Se realizó una pre-electroforesis del gel (anterior a la carga de las muestras, para equilibrar el gel y eliminar las trazas de acrilamida y radicales libres que pueden interferir en la unión ADN-proteína) a 130V durante 45 min usando como tampón TBE 0.5X. Se cargaron las muestras (reacciones de unión) y 2 µL de tampón de carga no desnaturizante (15% glicerol y 0.1 % azul de bromofenol). La electroforesis se realizó en TBE 0.5X durante 2 horas a 250V. El gel se secó al vacío a 80°C durante 2 horas en un secador de geles (Hoefler SE 1160 GEL DRYER).

El gel seco se introdujo en un casete con una placa de radiografía (Thermo Scientific, USA) y se expuso a -80°C (Figura 25).

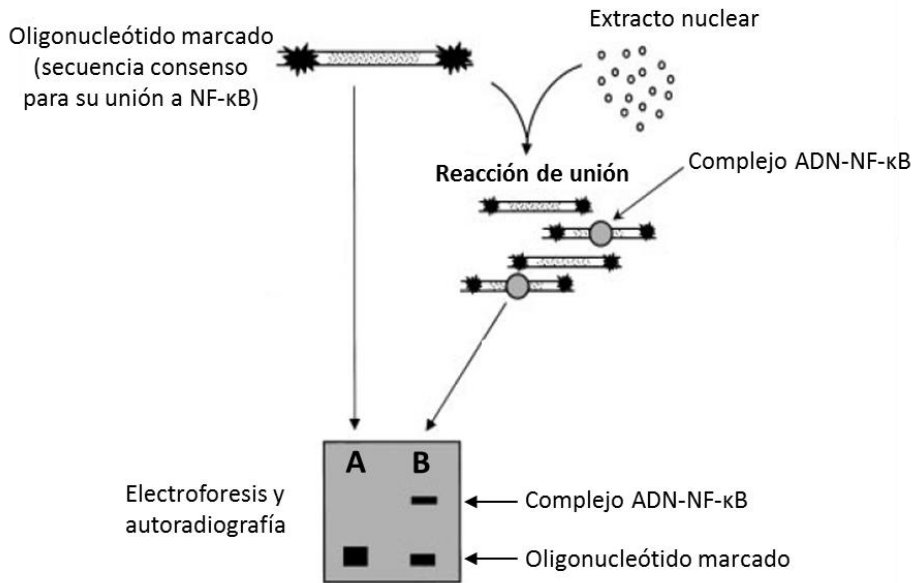


Figura 25. Esquema del ensayo EMSA para NF-κB. El oligonucleótido marcado, que contiene la secuencia consenso para su unión al factor de transcripción NF-κB, se incuba con el extracto nuclear (reacción de unión) para formar los complejos ADN-proteína. Estas reacciones se analizan mediante electroforesis y se visualizan por autorradiografía. En la muestra A del gel se observa el oligonucleótido marcado y en la muestra B se observan dos bandas, la banda correspondiente al oligonucleótido marcado y otra banda más retardada que corresponde al complejo ADN-NF-κB. (Imagen modificada de Knight JC. Functional implications of genetic variation in non-coding DNA for disease susceptibility and gene regulation. *Clin Sci*. 104(5):493-501. 2003)

4. RESULTADOS

4.1 EFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN DE LPS SOBRE LA FISIOLÓGÍA ANIMAL.

La administración de LPS causó cambios en la conducta y parámetros fisiológicos de los animales. LPS aumentó la temperatura corporal y frecuencia cardíaca (Figuras 26A y 26B), disminución de la ingesta de nutrientes, aumento de la ingesta de agua, vómitos, diarrea y letargia.

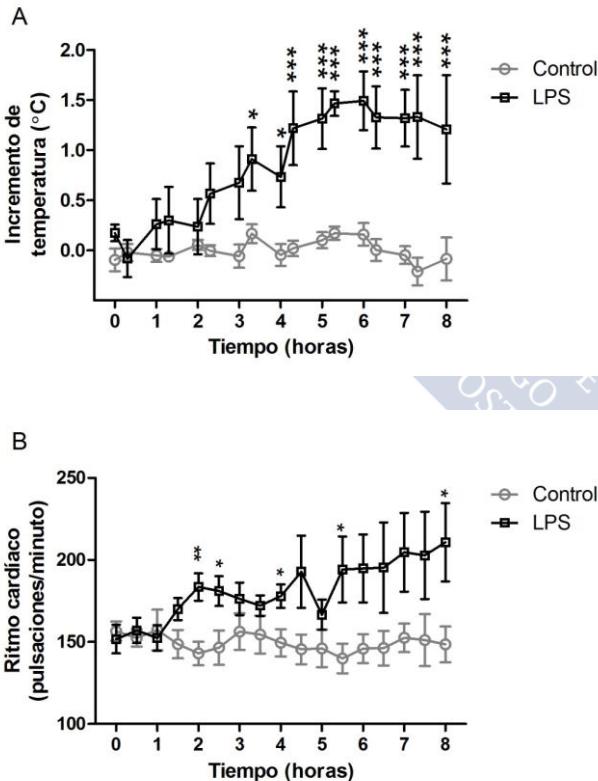


Figura 26. A) La infusión de LPS causó fiebre. El incremento se expresó como la media de la temperatura cada 30 minutos desde el inicio de la infusión. *, $P < 0.05$; ***, $P < 0.001$ control vs LPS. B) Registro de las medias de la frecuencia cardíaca de los grupos control y LPS cada 30 min desde el inicio de la infusión: *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$ control vs LPS

LPS causó a una elevada mortalidad temprana y sólo tres de los nueve cerdos sobrevivieron 48 horas de infusión. Dos animales murieron en las primeras 5 horas, tres entre 6-8 horas, y uno a las 12 horas del inicio de la infusión (Figura 27). Los dos cerdos que murieron en las primeras cinco horas se excluyeron del análisis estadístico.

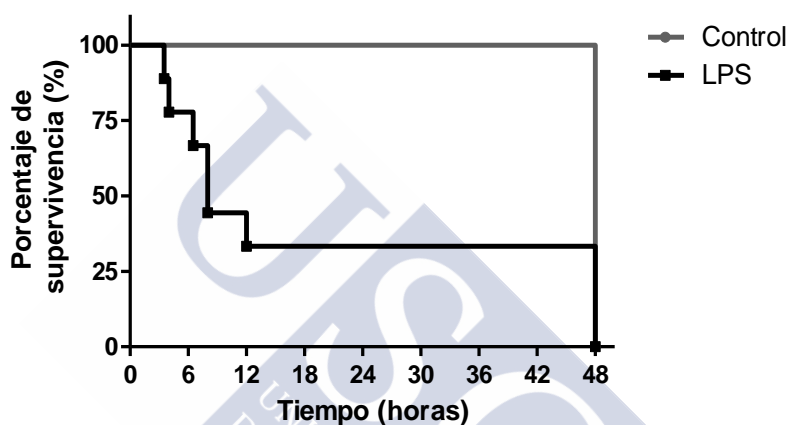


Figura 27. Curva de supervivencia de los cerdos tratados con LPS (n=9) y los cerdos control (n=8).

4.2. EFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN DE LPS SOBRE LOS NIVELES SÉRICOS Y TISULARES DE HORMONAS TIROIDEAS.

La infusión de LPS causó la disminución en los niveles séricos de T4 y T3 libres, y un aumento de los niveles séricos de cortisol en comparación con el grupo control. No se observaron cambios significativos entre el grupo control y LPS en los niveles séricos de rT3 (Figura 28); sin embargo, en el grupo LPS si se observó un aumento de la relación rT3/T4 libre al final del periodo de infusión (valor previo al

inicio de la infusión: 0.30 ± 0.06 , valor al final de la infusión: 0.92 ± 0.30 , $P < 0.005$).

La administración de LPS se asoció también a una disminución en la concentración tisular de T4 y T3, excepto en pulmón para T4 y lóbulo frontal para T3 (Figura 29).

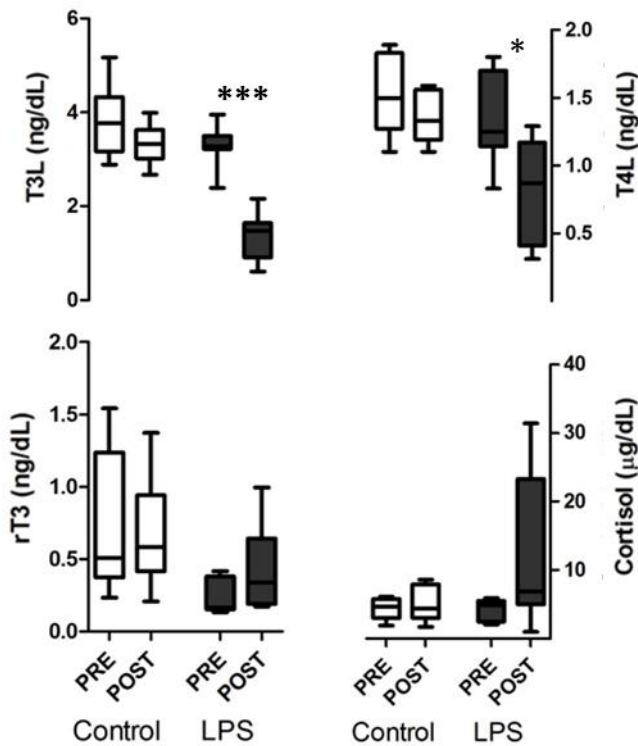


Figura 28. Niveles séricos de las hormonas tiroideas y cortisol en el grupo control y el grupo tratado con LPS previos al inicio de la infusión de LPS (PRE) y después de la infusión (POST). El grupo tratado con LPS muestra una disminución en los niveles de T3 y T4. *, $P < 0.05$; ***, $P < 0.001$.

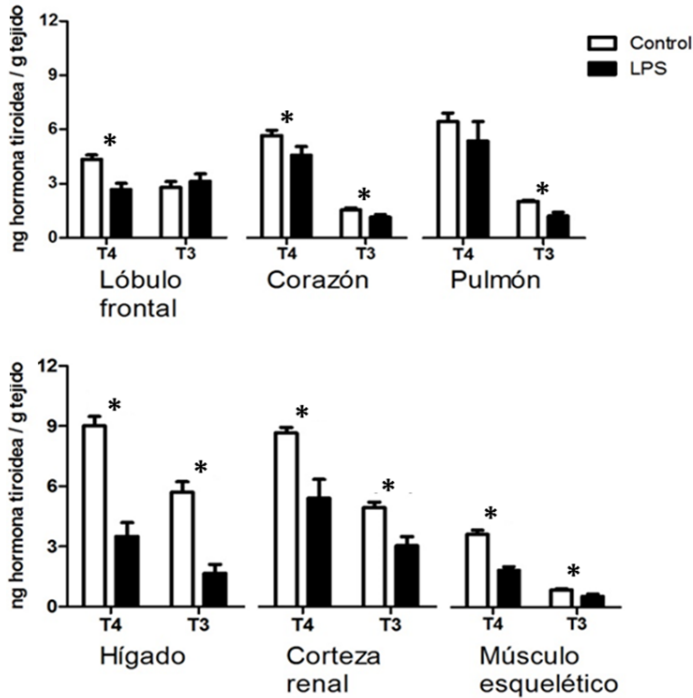


Figura 29. Niveles tisulares de las hormonas tiroideas en el grupo control y el grupo tratado con LPS. La infusión de LPS se asoció a la disminución de las hormonas tiroideas en los tejidos estudiados. *, P<0.05

4.3. EFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN DE LPS SOBRE LA EXPRESIÓN GÉNICA Y ACTIVIDAD DE LAS DEYODINASAS.

1. Deyodinasas tipo 1 (DIO1).

Se detectó expresión del gen *DIO1* en todos los tejidos estudiados, aunque las diferencias en los niveles de expresión fueron notables entre los diferentes tejidos analizados (Figura 30A). Los tejidos que presentaron mayor expresión fueron el hígado y el córtex y médula renal. Los restantes tejidos mostraron un grado de expresión baja. La infusión de LPS se asoció a una disminución estadísticamente significativa en la expresión *DIO1* en el hígado, córtex renal y médula renal (Figura 30B).

Los únicos tejidos en los que se detectó actividad DIO1 fueron hígado y riñón, lo que se corresponde además con los tejidos de mayor expresión de DIO1. La administración de LPS se asoció a un descenso en la actividad DIO1 tanto en hígado como en corteza y médula renales, aunque sólo alcanzó significación estadística en corteza renal (Figura 30C).

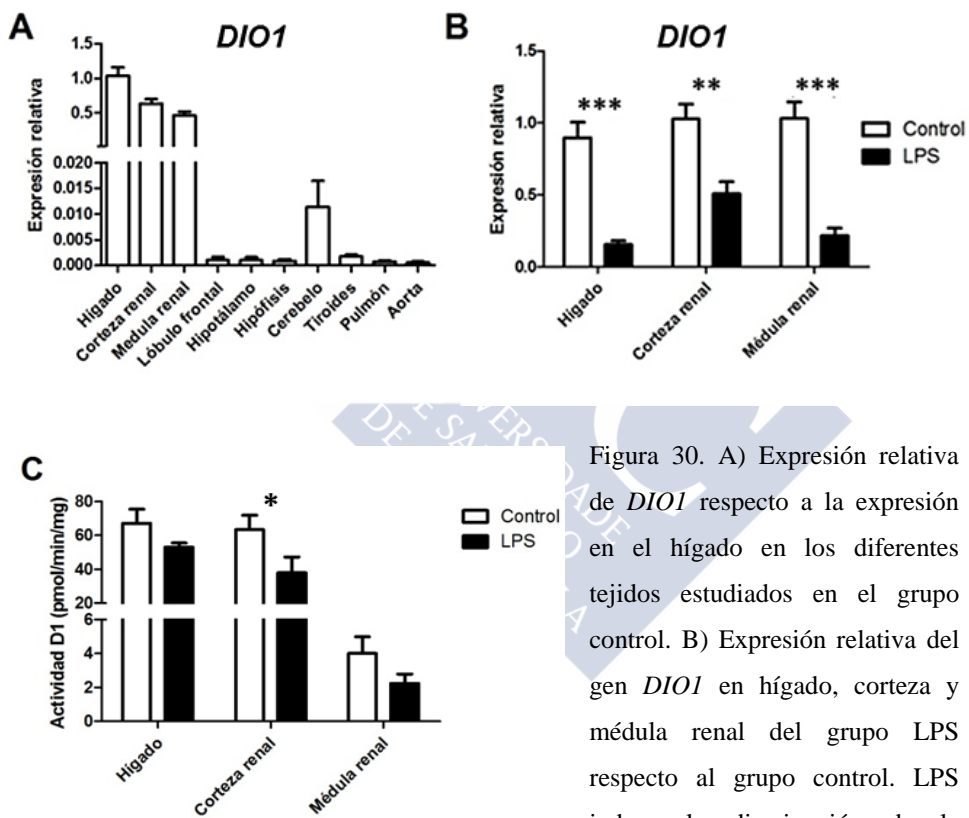


Figura 30. A) Expresión relativa de *DIO1* respecto a la expresión en el hígado en los diferentes tejidos estudiados en el grupo control. B) Expresión relativa del gen *DIO1* en hígado, corteza y médula renal del grupo LPS respecto al grupo control. LPS induce la disminución de la expresión del gen *DIO1* en hígado

y riñón. Hígado: ***, $P < 0.001$; corteza renal: **, $P < 0.01$; médula renal: ***, $P < 0.001$.

C) Actividad enzimática de DIO1 en grupo control, y LPS, *, $P < 0.05$

2. Deyodinasas tipo 2 (DIO2).

Al igual que con *DIO1*, también se detectó expresión del gen *DIO2* en todos los tejidos analizados. Los tejidos que presentaron mayor expresión fueron el lóbulo frontal, la hipófisis y el hígado (Figura 31A). La infusión de LPS indujo una disminución significativa en la expresión *DIO2* en el hígado, y un aumento en el córtex renal (Figura 31B).

La actividad enzimática DIO2 se detectó en la hipófisis y, a niveles muy bajos, en hipotálamo y tiroides. No se encontraron diferencias significativas en actividad DIO2 tras la infusión de LPS (Figura 31C).

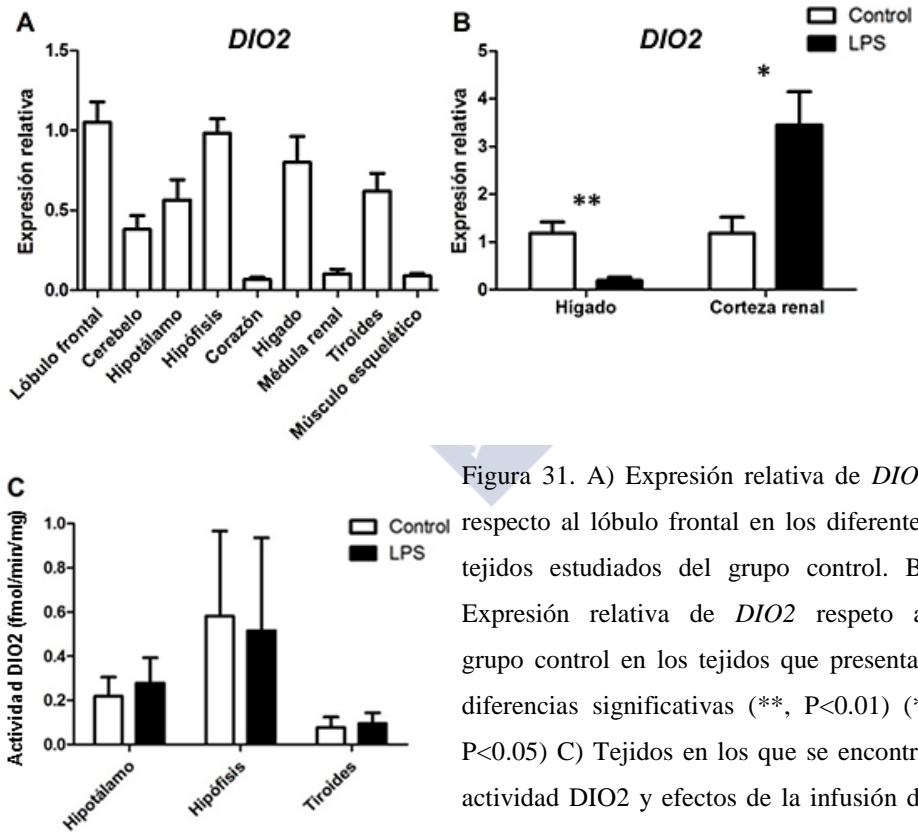


Figura 31. A) Expresión relativa de *DIO2* respecto al lóbulo frontal en los diferentes tejidos estudiados del grupo control. B) Expresión relativa de *DIO2* respecto al grupo control en los tejidos que presentan diferencias significativas (**, $P < 0.01$) (*, $P < 0.05$) C) Tejidos en los que se encontró actividad DIO2 y efectos de la infusión de LPS

3. Deyodinasa tipo 3 (DIO3).

La actividad enzimática DIO3 se detectó en todos los tejidos controles estudiados con la excepción del músculo cardíaco y bazo. Los tejidos con mayor actividad DIO3 fueron el lóbulo frontal, hipotálamo, hipófisis y glándula suprarrenal (Figura 32A). La administración de LPS se asoció a un aumento significativo de la actividad DIO3 en hipotálamo, hígado y glándula tiroides (Figura 32B).

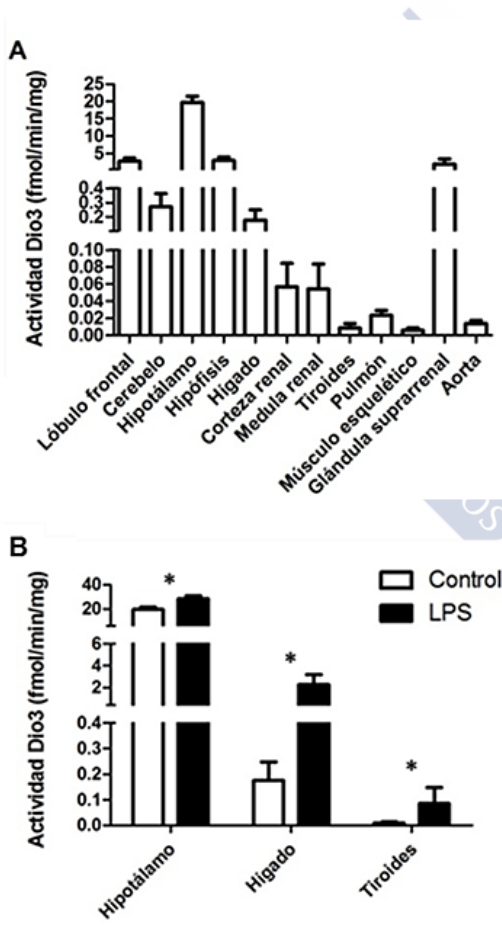


Figura 32. Actividad de la enzima DIO3 en tejidos del grupo control. A) Actividad DIO3 en los diferentes tejidos estudiados. B) Aumento de la actividad DIO3 respecto al grupo control en hipotálamo (*, P<0.05), hígado (*, P<0.05) y tiroides (*, P<0.05)

4.4. LA ADMINISTRACIÓN DE LPS INDUCE CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN GÉNICA DE LOS RECEPTORES DE HORMONAS TIROIDEAS, COFACTORES Y EN EL TRANSPORTADOR DE HORMONAS TIROIDEAS MCT8 DE FORMA TEJIDO-ESPECÍFICA.

La expresión de *THRB*, *THRA1* y *THRA2*, se detectó en todos los tejidos analizados, aunque con importantes diferencias en sus niveles de expresión. En la figura 33 se puede ver los niveles de expresión relativa de estos receptores respecto al lóbulo frontal en los tejidos del grupo control.

La administración de LPS se asoció a una disminución de la expresión de los receptores de hormonas tiroideas de forma tejido dependiente. *THRB* disminuyó de forma significativa en lóbulo frontal, hipófisis, corazón, hígado, riñón y glándula suprarrenal (Figura 34). *THRA1* disminuyó en la médula renal y la glándula suprarrenal (Figura 34). *THRA2* disminuyó únicamente en la glándula suprarrenal (Figura 34). En estos tejidos la disminución de la expresión para los tres genes fue aproximadamente del 50% con respecto al control.

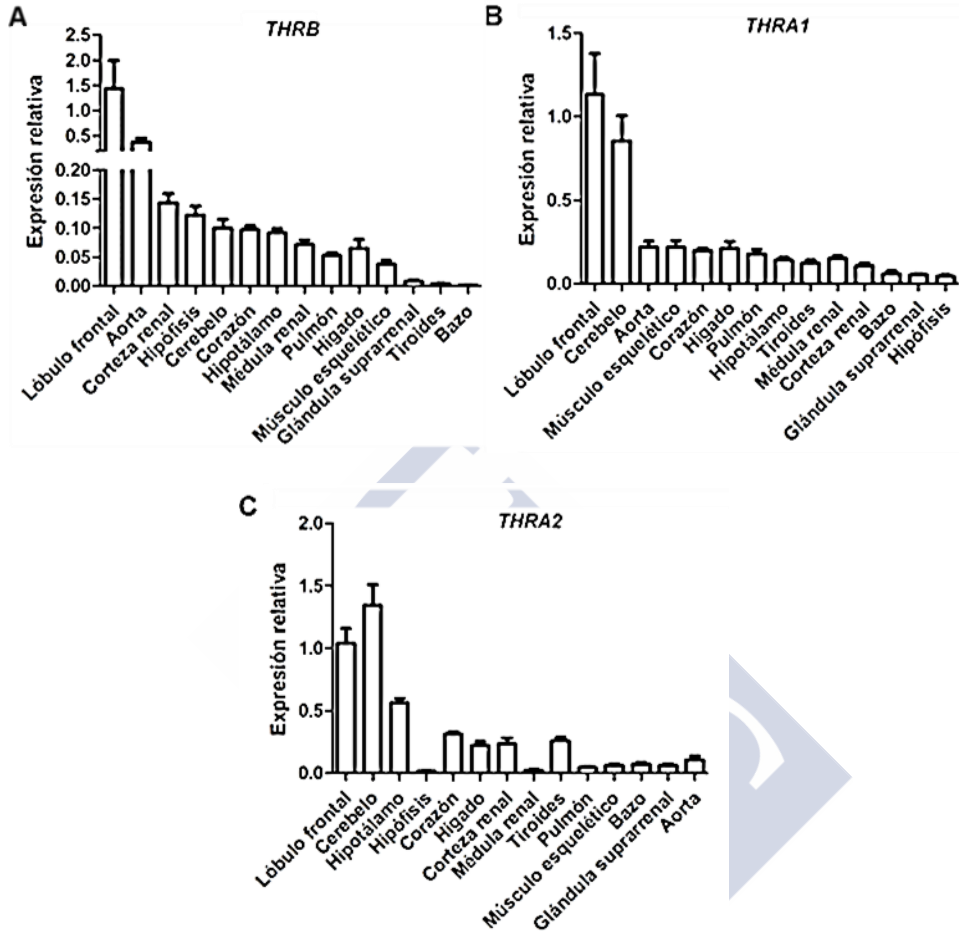


Figura 33. A) Expresión relativa de *THR*B en los tejidos estudiados procedentes del grupo control respecto al lóbulo frontal. B) Expresión relativa de *THRA1* en los tejidos estudiados del grupo control respecto al lóbulo frontal. C) Expresión relativa de *THRA2* en los tejidos estudiados respecto al lóbulo frontal

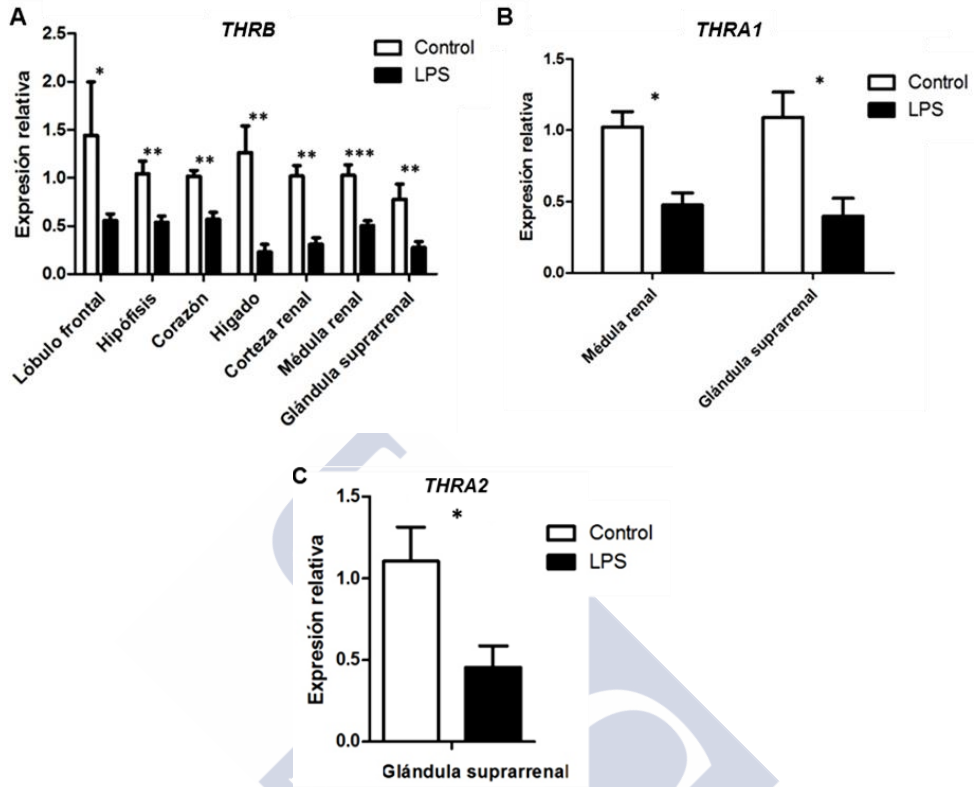


Figura 34. A) Disminución de la expresión de *THR B* respecto al grupo control tras la administración de LPS, en los tejidos que presentan diferencias significativas (**, $P < 0.01$) (*, $P < 0.05$). B) Disminución de la expresión de *THRA 1* respecto al grupo control tras la administración de LPS, en los tejidos que presentan diferencias significativas (*, $P < 0.05$). C) Disminución de la expresión de *THRA 2* respecto al grupo control tras la administración de LPS en la glándula suprarrenal, único tejido que mostró diferencias significativas (*, $P < 0.05$).

La expresión relativa respecto al lóbulo frontal de los cofactores de los receptores nucleares de hormonas tiroideas, *RXRalpha*, *RXRbeta* y *NCoA*, se muestra en las figuras 35 y 36. *RXRalpha* mostró una expresión elevada en la médula renal como el músculo esquelético (Figura 35),

RXRbeta se expresa principalmente en la médula renal (Figura 35), y *NCoA* en el lóbulo frontal (Figura 36)

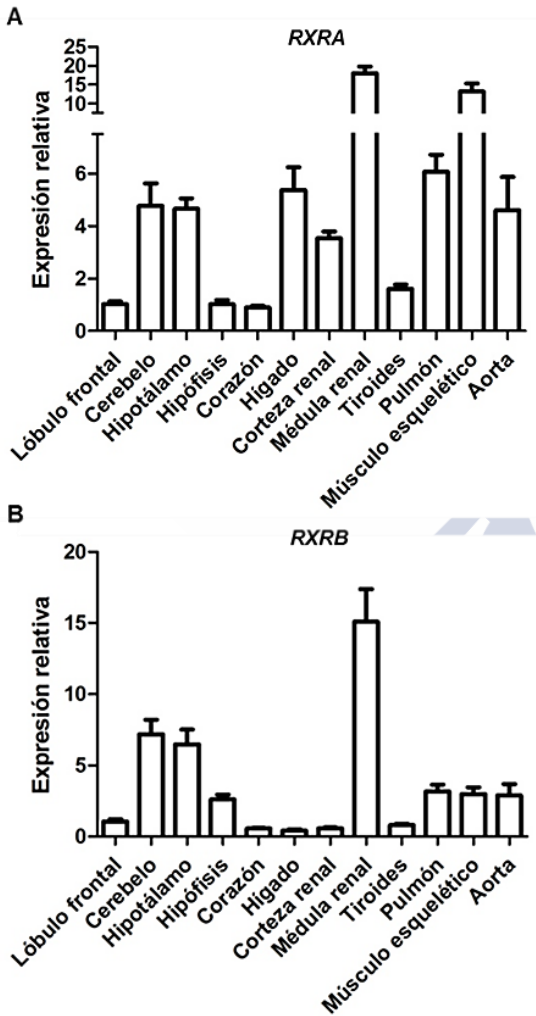


Figura 35: A) Expresión relativa de *RXRalfa* respecto al lóbulo frontal en los diferentes tejidos estudiados. B) Expresión relativa de *RXRbeta* respecto al lóbulo frontal en los diferentes tejidos estudiados

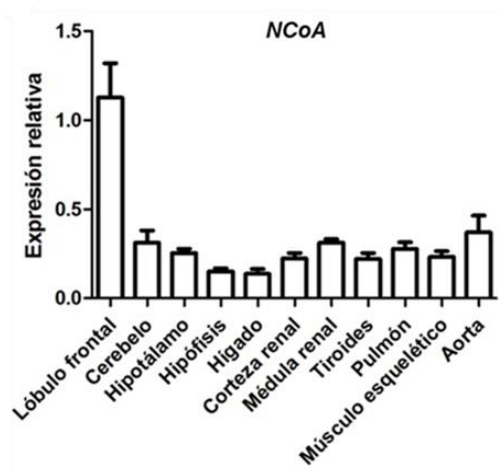


Figura 36. Expresión relativa de *NCoA* respecto al lóbulo frontal en los diferentes tejidos estudiados

La administración de LPS se asoció una disminución estadísticamente significativa de *RXRalfa* en el corazón, hígado y corteza renal (Figura 37A), y de *RXRbeta* en el corazón, pulmón y glándula suprarrenal (Figura 37B). No se observaron cambios significativos en la expresión de *NCoA* tras la administración de LPS.

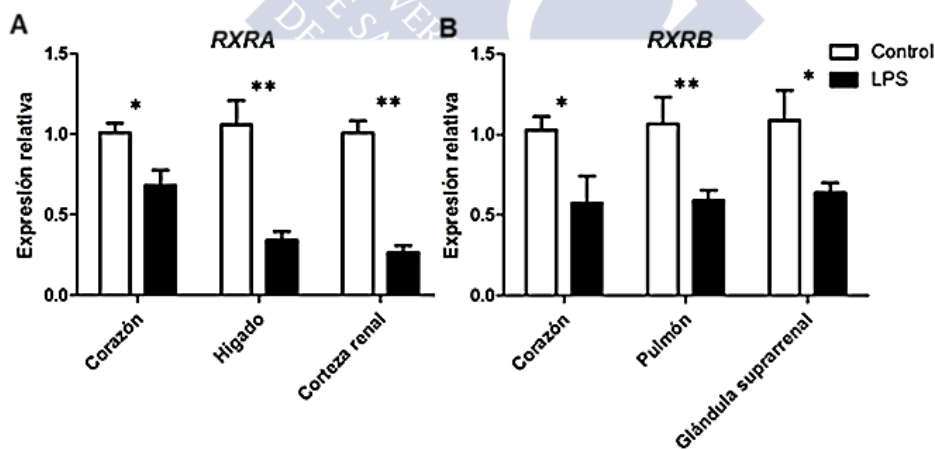


Figura 37. A). LPS se asoció a una disminución significativa de la expresión de *RXRalfa* en corazón, hígado y corteza renal B) LPS se asoció la disminución significativa de la expresión de *RXRbeta* en el corazón, en el pulmón y la glándula suprarrenal. (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$)

La expresión relativa del transportador de hormonas tiroideas *MCT8* respecto al lóbulo frontal se representa en la figura 38. En el tejido que se observó mayor expresión fue la corteza renal, seguido del cerebelo, hipotálamo e hipófisis (Figura 38A). La infusión de LPS indujo una disminución de la expresión de *MCT8* en la hipófisis, el corazón, el hígado, el pulmón, la glándula suprarrenal y la corteza renal (Figura 38B).

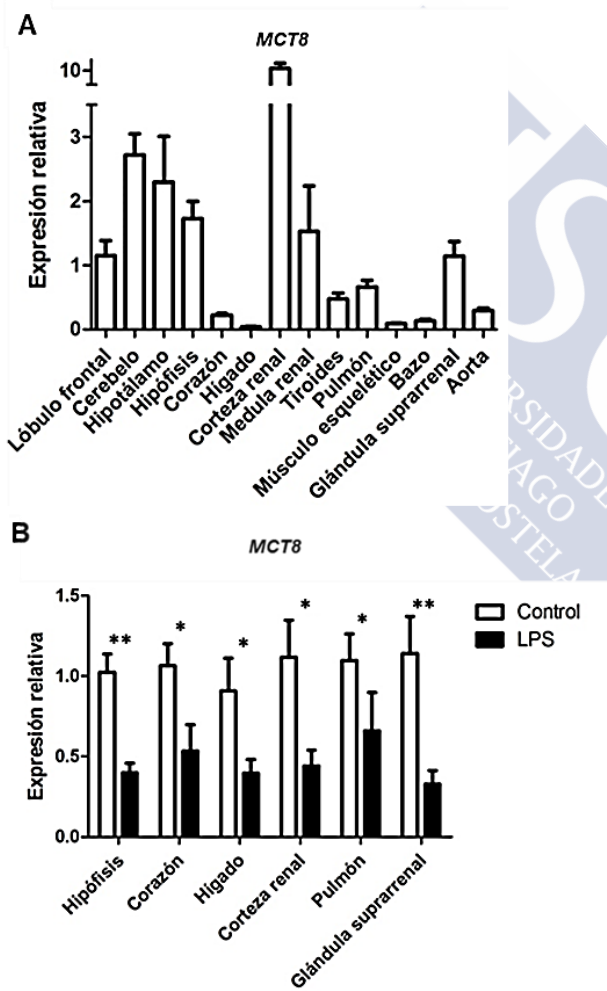


Figura 38. A) Expresión relativa de *MCT8* respecto al lóbulo frontal en los diferentes tejidos estudiados. B) Disminución de la expresión de *MCT8* respecto al grupo control tras la administración de LPS, en los tejidos que presentan diferencias significativas (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$)

4.5. LA ADMINISTRACIÓN DE LPS SE ASOCIA A LA ACTIVACIÓN Y AUMENTO EN LA UNIÓN DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN NF- κ B A SUS ELEMENTOS DE RESPUESTA DEL ADN.

En el análisis de la unión del complejo NF- κ B-ADN observamos que la incubación del oligonucleótido que contiene la secuencia consenso de unión a NF- κ B con el extracto nuclear de los tejidos estudiados produce al menos dos bandas. Para comprobar la especificidad de la unión se realizó la incubación con el oligonucleótido mutado, que produjo la desaparición de una de las bandas (unión específica a NF- κ B) mientras que la otra banda no cambio su intensidad (unión no específica). Además, tras la incubación del extracto nuclear con la combinación de oligonucleótido marcado y un exceso de oligonucleótido mutado no marcado observamos la banda específica de unión a NF- κ B y la desaparición de la banda no específica por competición con el oligonucleótido mutado (Figura 39). Para analizar la composición de estos complejos se incubó el extracto nuclear con los anticuerpos p50 y p65. Con ambos anticuerpos observamos una disminución en la intensidad de la banda específica de unión a NF- κ B y una nueva banda más retardada (super-retardo) que confirma que el complejo que se une a la secuencia consenso en estos tejidos es el heterodímero p50/p65 (NFKB1/RELA) (Figura 39).

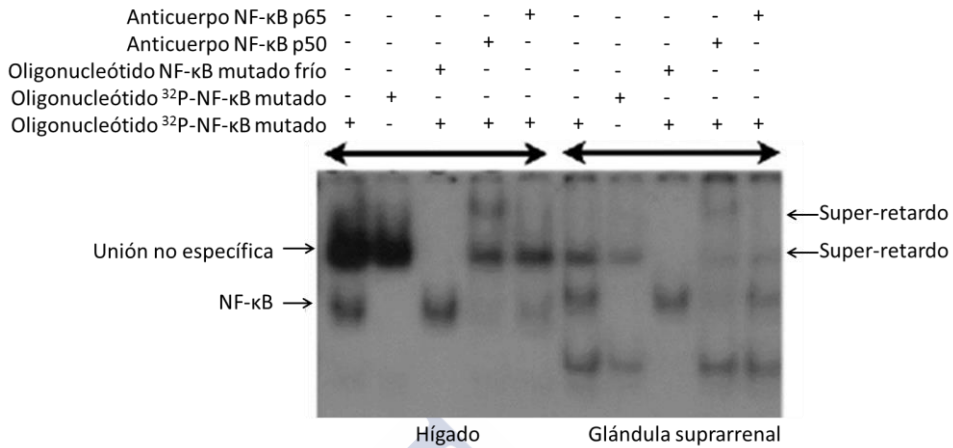


Figura 39. Análisis de la unión de NF-κB a su elemento de respuesta mediante EMSA. La unión específica de NF-κB a la secuencia consenso se observa en las muestras 3 y 8 del gel. Bandas de unión no específica, identificadas con el uso de un oligonucleótido que contiene la secuencia consenso mutada, se observan en las muestras 2 y 7 del gel. La identificación de las proteínas que forman el complejo NF-κB se realizó mediante super-retardo con los anticuerpos p50 y p60, muestras 4, 5, 9 y 10 del gel.

La unión NF-κB p50-p65 a oligonucleótido con secuencia consenso, se detectó en todos los extractos tisulares analizados, lóbulo frontal, corazón, pulmón, hígado, bazo, glándula suprarrenal y corteza renal con excepción de cerebelo y músculo esquelético (Figura 40). El tejido con mayor activación NF-κB p50-p65 fue el bazo. LPS causó aumento en NF-κB p50-p65 activación en extractos de lóbulo frontal, pulmón, corteza renal y glándula suprarrenal (Figura 40). Sin embargo, no se observó mayor activación NF-κB p50-p65 activación en corazón, hígado y bazo.

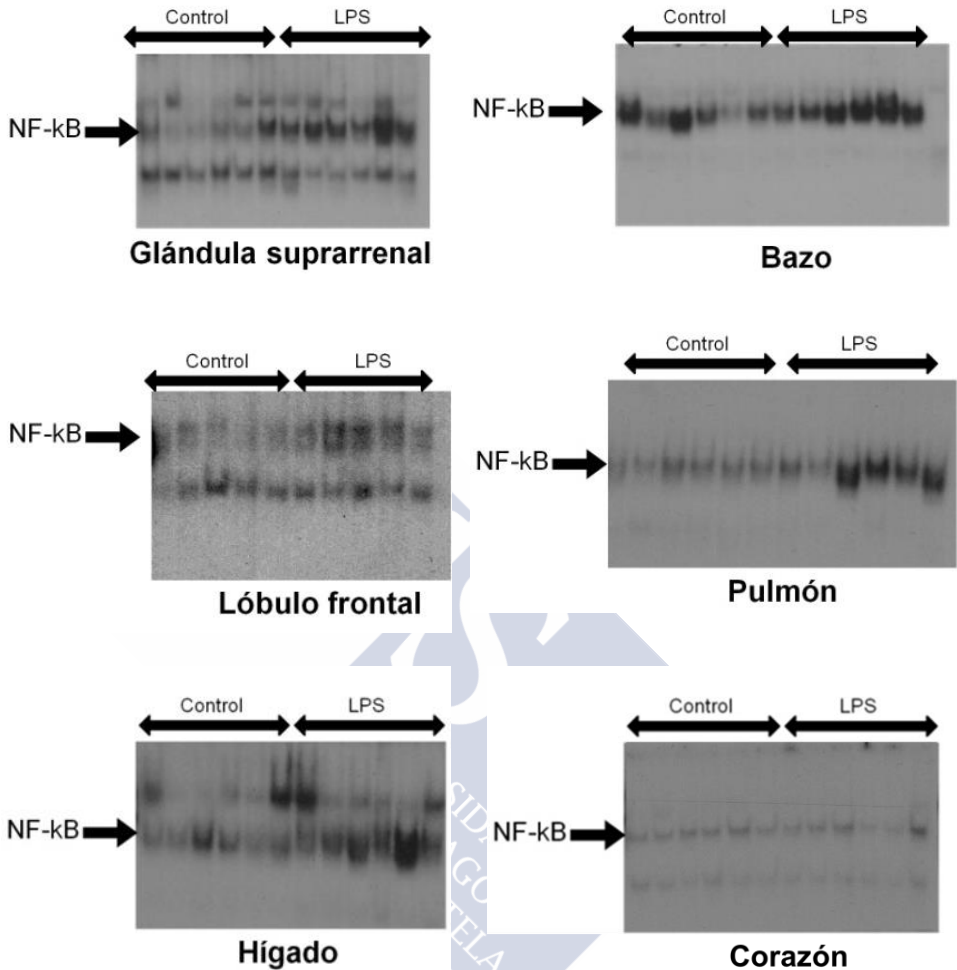


Figura 40. Análisis mediante EMSA de la formación de complejos ADN-NF- κ B utilizando un oligonucleótido marcado que contiene la secuencia consenso de unión de NF- κ B. La administración de LPS se asoció a un aumento de la unión de NF κ B en la glándula suprarrenal, el lóbulo frontal y el pulmón, y no se observan diferencias en el bazo, el corazón o el hígado

No se observó una relación directa entre la activación de NF- κ B y la disminución de la expresión del gen *THRB* tras LPS (Figura 41).

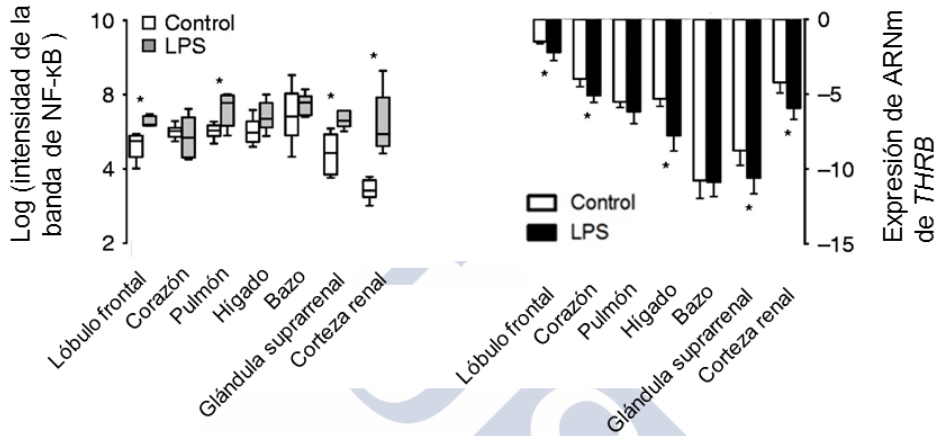


Figura 41. Estudio de la relación entre activación NF- κ B y la disminución de la expresión de *THRB* en los tejidos estudiados. La infusión de LPS indujo activación NF- κ B y disminución de la expresión de *THRB* en el lóbulo frontal y la glándula suprarrenal. Sin embargo, el aumento en la activación NF- κ B en pulmón no se asoció a cambios en la expresión de *THRB*. En hígado, la disminución de la expresión de *THRB* tras LPS no se vio acompañada por cambios en la activación NF- κ B.

4.6. EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE LPS EN LA EXPRESIÓN DE LOS GENES *PTGS2* Y *HIF-1*.

La expresión relativa del gen *prostaglandina-endoperoxido sintasa 2* (*PTGS2*), también llamado COX-2, respecto al lóbulo frontal se representa en la figura 42A. Los tejidos en los que se observó mayor expresión fueron el lóbulo frontal, la medula renal y el pulmón. La administración de LPS aumentó significativamente la expresión de *PTGS2* en doce de los tejidos estudiados: hipotálamo, hipófisis, cerebelo,

corazón, aorta, pulmón, hígado, bazo, córtex y médula renal, glándula suprarrenal y músculo esquelético (Figura 42B).

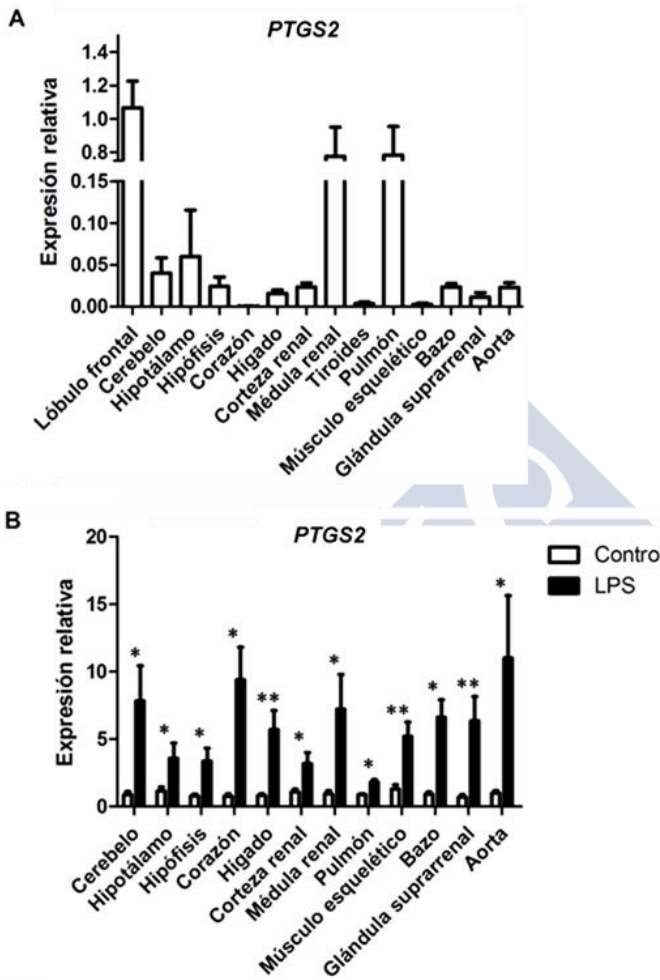


Figura 42.

A) Expresión relativa de *PTGS2* respecto al lóbulo frontal en los diferentes tejidos estudiados.

B) Aumento de la expresión de *PTGS2* respecto al grupo control tras la administración de LPS, en los tejidos que presentan diferencias significativas

(*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$)

La expresión relativa del gen *factor 1 inducible por hipoxia (HIF-1)* respecto al lóbulo frontal se representa en la figura 43A. En el tejido que se observó mayor expresión fue la medula renal. La administración de

LPS indujo la expresión del gen *HIF-1* en cinco tejidos: hipotálamo, hígado, bazo, suprarrenal y músculo (Figura 43B).

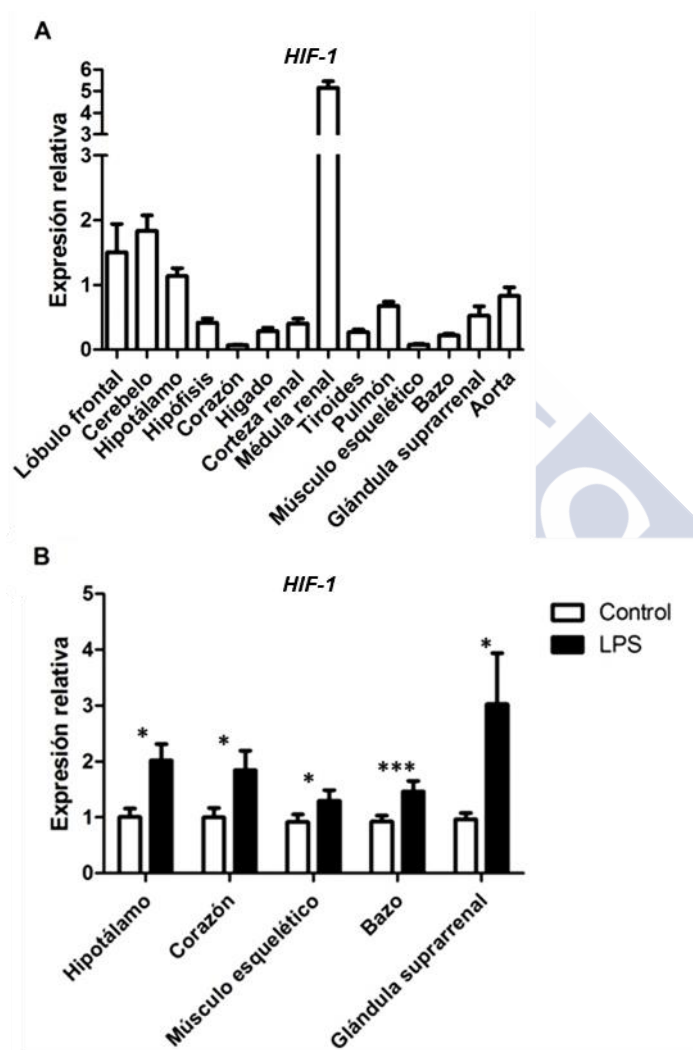


Figura 43.

A) Expresión relativa de *HIF-1* respecto al lóbulo frontal en los diferentes tejidos estudiados.

B) Expresión relativa del gen *HIF-1* en grupo control y LPS en los tejidos que presentan diferencias significativas.

(*; $P < 0.05$;

***, $P < 0.001$.)

En conjunto, hígado, riñón y glándula adrenal fueron los tejidos en donde se observó un mayor número de cambios en la expresión génica tras la infusión de LPS (tabla 1). En estos tres tejidos observamos un incremento de la expresión de *PTGS-2* a la vez que se produce una

disminución de la expresión de *THRB* y *MCT8*. Esta disminución de la expresión de *MCT8* en el riñón solo se observó en la corteza renal pero no en la médula renal (tabla 1).

	<i>DIO1</i>	<i>DIO2</i>	<i>DIO3</i>	<i>THRB</i>	<i>THRA1</i>	<i>THRA2</i>	<i>MCT8</i>	<i>TLR4</i>	<i>PTGS-2</i>	<i>HIF-1</i>
Hígado	Red	Red	Green	Red	White	White	Red	Green	Green	White
Corteza renal	Red	Green	White	Red	White	White	Red	Green	Green	White
Médula renal	Red	White	White	Red	Red	White	White	White	Green	White
Glándula suprarrenal	White	White	Green	Red	Red	Red	Red	White	Green	Green

Tabla 1: Resumen de los cambios en la expresión génica asociados a la infusión de LPS en el hígado, la corteza renal, la médula renal y la glándula suprarrenal. Color verde indica aumento, rojo disminución y blanco no cambios.

5. DISCUSIÓN

El hipotiroidismo asociado a la enfermedad o NTIS es la causa más frecuente de hipotiroidismo en sujetos hospitalizados, por ser una complicación presente de forma universal en sujetos con enfermedad de intensidad moderada o severa. Durante la etapa aguda de la enfermedad crítica se observa un descenso en la T3 circulante que obedece a una menor conversión de T4 en T3 –por descenso en la actividad DIO1^{88,150}–, y a un mayor catabolismo tisular de la T3 –por aumento en la actividad DIO3⁸⁸–. La menor actividad DIO1 se atribuye a un efecto inhibitorio del aumento de cortisol endógeno, ácidos grasos y citoquinas proinflamatorias¹⁵². En la enfermedad prolongada existe además un descenso en suero de la TSH y mayor descenso de la T4 que se relacionan con una supresión de eje hipotálamo hipofisario¹⁵².

Dado que el hipotiroidismo asociado a la enfermedad se considera por muchos una respuesta adaptativa, lo habitual es que estos enfermos no reciban tratamiento sustitutivo con hormona tiroidea. De hecho, la Asociación Americana de Tiroides (ATA) en su *Guidelines for the Treatment of Hypothyroidism de 2014*¹⁷⁵, recomienda no administrar ni levotiroxina (*recomendación fuerte basada en evidencias de moderada calidad*) ni liotironina (*recomendación débil basada en evidencias de calidad moderada*) a pacientes enfermos que presentan NTIS. Esta recomendación se basa en que “*el pequeño número de ensayos clínicos bien controlados y aleatorizados comparando la terapia con levotiroxina respecto a no tratamiento, no han demostrado beneficio clínico significativo, y de hecho sugieren que su administración podría no ser*

segura” y *“aunque la administración de dosis pequeñas de liotironina no se ha relacionado con ningún efecto nocivo, no existen datos de su efecto clínico beneficioso”*. Los autores de esta guía reconocen sin embargo, que los ensayos clínicos aleatorizados son escasos y que incluyen un número pequeño de pacientes con situaciones clínicas críticas muy heterogéneas. Reconocen también que aunque no se haya observado un aumento de la supervivencia, el poder estadístico de estos estudios es bajo. Aunque comentan que en algunos casos la administración de hormona tiroidea puede ser perjudicial, en particular con dosis altas de T3, no dan ninguna referencia bibliográfica al respecto. Así mismo comentan que en un estudio en enfermos con fallo renal agudo la administración de T4 se asoció a aumento de mortalidad¹⁷⁶; en dicho trabajo, Acker et al. estudiaron dos grupos de pacientes con fallo renal agudo a los que administraron 150 µg de levotiroxine i.v. cada 12 horas durante 48 horas –grupo tratado- o placebo –control-. La mortalidad en el grupo control fue del 13% y en el grupo tratado con levotiroxina del 43%, diferencia que se observó al cabo de varias semanas y no se pudo relacionar con ningún efecto agudo de T4. De todas las variables analizadas, la única que se relacionó de forma significativa con mortalidad fue el nivel de TSH al inicio del estudio, observándose que los sujetos que fallecieron presentaron niveles más bajos de TSH con independencia de su inclusión en uno u otro grupo. Aunque los autores no encontraron diferencias en la puntuación APACHE II entre los dos grupos, hoy sabemos que cuanto más severa es la enfermedad, más disminuye la TSH debido a una mayor activación de DIO2. Es posible pues que los niveles de TSH al inicio del cuadro clínico sean indicadores

sensibles de gravedad, algo que necesita estudios confirmatorios. Por último, y a nuestro entender el dato más relevante del estudio de *Acker et al.*, fue que la mortalidad por fallo renal agudo del 13% en el grupo control es muy inferior a lo publicado para mortalidad intra-hospitalaria por la misma institución en donde trabajaban los autores, y por muchos otros grupos para esta situación, que se sitúa en un 40-50%. Los mismos autores comentan que la mortalidad de su grupo control fue inferior a la publicada previamente por su institución, al contrario de la mortalidad en el grupo tratado que, con una mortalidad del 43%, fue similar a lo esperado. Todo parece apuntar que en el citado trabajo existió un sesgo en la selección de los pacientes y que los niveles séricos de TSH pudieran usarse como marcadores de gravedad. La ATA en la citadas recomendaciones menciona que la administración de T3 se asocia a efectos beneficiosos en alguno de los parámetros estudiados, a pesar de lo cual concluyen que *“en la práctica actual, la mayoría de los médicos interpretan los datos publicados como que la administración de hormona tiroidea no es beneficiosa, y que aceptan el dogma de que es una respuesta adaptativa”*, y otra vez lo escriben sin dar ninguna referencia que pruebe que esto es así. Los autores de esta guía clínica de la ATA concluyen que el estudio más reciente al respecto fue publicado en 2004, y que para estas recomendaciones se basaron en cinco estudios en los que se utilizó T4 y en dos estudios en que se utilizó T3. En base a lo expuesto, creemos que la postura de la ATA en contra de la administración de hormona tiroidea en enfermos con NTIS no se sostiene en ensayos clínicos controlados, ya que simplemente no existen, y se basa más en creencias que en evidencias científicas.

En humanos, existen pocos estudios sobre los mecanismos moleculares implicados en el hipotiroidismo asociado a la enfermedad. Estudios realizados en biopsias de hígado obtenidas de sujetos que fallecieron a consecuencia de enfermedad severa, y en biopsias de tejido adiposo y músculo esquelético obtenidas en pacientes internados en la unidad de enfermos críticos, se observó una disminución en la expresión de los receptores de hormonas tiroideas^{88,144} y del transportador de hormonas tiroideas¹⁷⁷ así como alteraciones en la actividad de las enzimas deiodinasas^{88,150}. Respecto a éstas, se encontró un descenso en la actividad DIO1 en el hígado¹⁵⁰ y expresión de DIO2 en el músculo esquelético⁸⁸, así como un aumento de la actividad DIO3 en ambos tejidos^{88,150}, cambios que concuerdan con la disminución de T3 y el aumento de rT3 observado en los pacientes. En el tejido adiposo no se encontraron cambios en la actividad DIOs lo que sugiere que en este tejido pudiera haber una disminución de la captación de hormona tiroidea –menor expresión *MCT8*- y acciones genómicas –descenso de expresión *THRA* y *THRB*- pero no en la metabolización de hormonas tiroideas. Estos estudios sugieren que en el hipotiroidismo asociado a la enfermedad existen cambios en el metabolismo y acción de hormonas tiroideas que son tejido específicos.

Las limitaciones inherentes a la investigación en humanos se pueden solventar en parte con modelos animales. La investigación en animales grandes presenta la ventaja de poder reproducir no sólo los cambios observados en humanos sino también protocolizar e implementar un manejo de situaciones clínicas similar a lo que se aplica en humanos. Entre las desventajas están el coste en cuanto al precio de los animales,

instalaciones y personal implicado en el manejo, complejidad de los protocolos, y un mayor rechazo por parte de la comunidad a este tipo de investigaciones. Esto supone la redacción de protocolos de complejidad a veces superior a estudios en humanos, asociados a controles muy estrictos por parte de veterinarios institucionales y nacionales, y controles de seguimiento también muy estrictos por parte de comités éticos.

En el presente trabajo se logró desarrollar hipotiroidismo secundario a shock séptico en el cerdo doméstico, y hemos demostrado que éste modelo es de utilidad para investigar los mecanismos moleculares implicados en el desarrollo del NTIS.

Los niveles séricos de hormonas tiroideas FT4, FT3, rT3 y de cortisol el cerdo doméstico son similares a los humanos. No hemos determinado los niveles séricos de TSH debido a la falta un ensayo que además de específico, sea barato y rápido como podría ser un radio- o inmunoensayo. La administración de LPS causó los efectos esperados de fiebre, taquicardia, náusea, vómitos e hipotensión asociado a una elevada mortalidad de animales en las primeras 24 horas. Es importante reseñar que en un estudio preliminar observamos que la reducción en la dosis de LPS en 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$, causó fiebre pero no shock, no se observó mortalidad animal, y tampoco se observaron cambios en los niveles séricos de hormonas tiroideas entre el inicio y final de la administración de LPS ni respecto al grupo control. Se puede concluir que en cerdos, el margen en la concentración de LPS en μg por kg de peso para inducir shock séptico es muy pequeño. Este modelo de shock séptico inducido por LPS (que podríamos calificar de sepsis sin manejo intensivo en cuanto a fluidos, vía

aérea y vasopresores), se asoció a un descenso significativo en los niveles séricos de FT4 y FT3 y un aumento muy notable en los niveles de cortisol sérico al final de la administración respecto al nivel basal, y también respecto al grupo control. No se observó un aumento en los niveles séricos de rT3, lo que obedece a que el nivel sérico FT4 (precursor de rT3) fue muy bajo; sin embargo, el cociente rT3/FT4 fue muy superior en animales tratados con LPS, lo que indica que existe una mayor producción o una menor degradación de rT3, incluso en situaciones en las que su precursor, FT4, está bajo. Dado que T4 tiene una vida media larga, el hecho de que en el grupo tratado haya habido animales que a las 12 horas presenten un descenso en los niveles de FT4 unido a un aumento en el cociente rT3/FT4, sugiere un aumento en la metabolización de FT4 inducido por LPS.

Estudios post-mortem en pacientes críticos mostraron una disminución de los niveles de T3 en corteza cerebral, el hipotálamo, la hipófisis anterior, el hígado, el riñón y el pulmón¹⁵⁹, observándose además una correlación positiva entre los niveles séricos y tisulares de T3¹⁷⁸. De acuerdo a estos estudios, en el presente trabajo también observamos que los animales en shock séptico tenían un descenso en los niveles tisulares de T4 y T3, con las excepciones de T4 en pulmón y T3 en la corteza cerebral. La observación de que los niveles de T3 en cerebro se mantienen a pesar de un descenso en los niveles de T4 cerebral fue desconcertante, e incluso ignorado durante cierto tiempo, debido a la dificultad para su explicación, y más cuando este resultado no fue producto de un error en el ensayo ya que el análisis se repitió en dos ocasiones arrojando resultados similares. Estos resultados indican que en

el shock séptico, al menos durante 12-48 horas, el cerebro es capaz de mantener niveles de T3 similar a los controles, a pesar de un descenso en los niveles séricos y cerebrales de T4. De acuerdo con nuestras observaciones, estudios en conejos con enfermedad crítica también han encontrado que niveles séricos bajos de T4 y T3 se asocian con niveles bajos de T4 pero normales de T3 dentro del hipotálamo¹⁶⁰. Aunque todavía no hemos realizado experimentos al respecto, creemos que la explicación podría residir en una mayor expresión y actividad de la DIO2. En roedores, durante estados de inflamación, tanto la expresión como la actividad DIO2 aumentan en leptomeninges, plexos coroideos, vasos sanguíneos cerebrales y tanicitos a través de la activación de NF- κ B^{157,158}. A este respecto, nosotros hemos presentado evidencias clínicas en humanos de que el sistema *feedback* de regulación de TRH-TSH se mantiene activado, y posiblemente incluso aumentado, en sujetos con enfermedad severa. En concreto, en un grupo de sujetos con hipotiroidismo primario sin tratamiento y hospitalizados por enfermedad severa, hemos observado que los niveles séricos de TSH estaban muy elevados, y que tras la administración de levotiroxina a dosis altas estos niveles de TSH disminuyeron, elevándose también los niveles de rT3¹⁴⁵. Esta observación clínica sugiere que existe un aumento de la conversión de T4 a rT3 en la periferia (razón por la que se necesita administrar niveles altos de levotiroxina), y que la respuesta inhibitoria de la levotiroxina a nivel central está conservada. En base a estas observaciones, proponemos la hipótesis de que durante la enfermedad crítica se ponen en marcha mecanismos centrales destinados a mantener niveles adecuados de hormona tiroidea cuya consecuencia sería evitar un

aumento de los niveles de TRH-TSH, y que es probable que existan otras funciones todavía por descubrir.

Estudios en humanos^{88,144,150} y en modelos de roedores^{151,152,179-181} habían mostrado cambios en la expresión y la actividad de las enzimas DIOs en un número limitado de tejidos, y se ha sugerido que estos cambios serían en parte responsables del descenso de T3 y del aumento de rT3 en suero. Sin embargo, hasta el presente trabajo no había ningún estudio que hubiera estudiado la expresión y actividad de las tres DIOs en conjunto con la extensión que nosotros presentamos. Si bien *DIO1* se expresó en todos los tejidos analizados, sólo se detectó actividad enzimática en el hígado y en córtex y médula renales, tejidos que presentaron además la mayor expresión del gen *DIO1*; es de reseñar que no se encontró actividad DIO1 en la glándula tiroides. En cuanto a *DIO2*, encontramos expresión en todos los tejidos analizados, aunque sólo se detectó actividad enzimática en hipotálamo, hipófisis y, a niveles muy bajos, en la glándula tiroides. Por el contrario, detectamos actividad DIO3 en todos los tejidos analizados, siendo hipotálamo, lóbulo frontal, hipófisis y glándula adrenal los tejidos que presentaron mayor actividad. La administración de LPS en el cerdo produjo una disminución de la expresión y la actividad de la DIO1 en el hígado y el riñón, y a un aumento de actividad de DIO3 en hígado, la glándula tiroides y el hipotálamo. Sin embargo, no se observaron cambios en la actividad DIO2 en hipotálamo, hipófisis y glándula tiroides. Los cambios detectados en DIO1 (hígado y riñón) y DIO3 (hígado) posiblemente estén implicados en el descenso de los niveles de T3 y aumento en los niveles de rT3 en suero. El aumento de la actividad de DIO3 en tiroides podría contribuir al

descenso de los niveles de T4 al aumentar la conversión intratiroidea de T4 a rT3. El aumento de DIO3 en hipotálamo podría contribuir a limitar la conversión de T4 a T3. Ya se ha comentado con anterioridad que a pesar de que los niveles de T4 en suero y cerebro están bajos tras la administración de LPS, no se encontraron diferencias significativas en los niveles de T3 en cerebro entre controles y sépticos, lo que podría obedecer a una mayor conversión de T4 a T3 inducida por un aumento de actividad DIO2. Sin embargo, nosotros no hemos observado un aumento en la actividad DIO2 en hipotálamo ni en hipófisis, si bien esto pudiera obedecer a un problema de muestreo. La actividad DIO2 en hipotálamo se limita a tanicitos, astrocitos y endotelio capilar, y nosotros hemos analizado la actividad DIO2 en un bloque tisular amplio que incluyó todo el hipotálamo, por lo que podría ser necesario un enriquecimiento previo de estas células para observar diferencias; a este respecto, hay que reseñar que la actividad DIO2 medida fue muy baja, lo que sugiere la necesidad de un enriquecimiento con los elementos celulares citados.

Otros cambios relevantes asociados en la enfermedad grave que pudieran originar una menor sensibilidad a la acción de las hormonas tiroideas son cambios en la expresión de los transportadores de hormonas tiroideas, los receptores nucleares y sus cofactores.

La importancia fisiopatológica del transportador MCT8 se estableció tras el hallazgo que mutaciones en *MCT8* son responsables del Síndrome de Allan-Herdon-Dudley, un cuadro de retraso psicomotor severo ligado al cromosoma X⁸¹. MCT8 transporta T3 al interior de las neuronas, y ratones *knock-out* para *MCT8* muestran resistencia central a la acción de

las hormonas tiroideas¹⁸²; al contrario, en los tejidos periféricos MCT8 regula la salida de hormona tiroidea del interior de la célula a la circulación sanguínea^{183,184}. Por ello, un descenso en la expresión de MCT8 a nivel neuronal podría causar efectos similares al hipotiroidismo, debido a la imposibilidad de proveer hormona en cantidad adecuada a la neurona, mientras que en tejidos periféricos supondría una mayor retención intracelular de la hormona. En nuestro estudio observamos que el shock séptico inducido por LPS causó disminución de la expresión de MCT8 en la hipófisis, el corazón, el hígado, la corteza renal, el pulmón y la glándula suprarrenal. Sin embargo, no se observó una disminución en la expresión a nivel cerebral ni hipotalámica. Estos resultados concuerdan con nuestra hipótesis de que durante la enfermedad no existe hipotiroidismo central, sino todo lo contrario, que los niveles neuronales de T3 se mantienen. La disminución de *MCT8* en tejidos periféricos podría ser un mecanismo para retener la hormona en el tejido debido a su descenso en la circulación y en el propio tejido.

La información sobre la expresión de receptores de hormonas tiroideas en tejidos humanos durante la enfermedad es limitada. En un estudio previo, nuestro grupo encontró que en pacientes ingresados en una unidad de cuidados intensivos debido a enfermedad severa, incluido el shock séptico, la expresión de *THRB* y *THRA* disminuye en músculo esquelético y tejido adiposo^{88,144}. En este sentido, en el presente estudio también observamos una disminución en múltiples tejidos de la expresión de *THRB* y, en menor medida de *THRAs* y *RXR*s.

En conjunto, nuestros resultados sugieren que durante la enfermedad severa existe un hipotiroidismo tisular asociado a cambios en la metabolización de hormonas tiroideas (menor producción de T3) y una situación potencial de resistencia o menor sensibilidad a su acción, que es tejido específica, consecuencia de un descenso en la expresión de *THRB*, cuyas consecuencias fisiopatológicas se desconocen. Como ya hemos comentado anteriormente, la mortalidad por shock séptico aumenta al 70-90% en casos de disfunción miocárdica, lo que implica fallo sistólico (menor impulso) y diastólico (mayor rigidez). Por ello creemos obligado discutir, aunque sea en un plano hipotético, algunas consecuencias que el hipotiroidismo asociado a la enfermedad podría tener sobre la función cardíaca, y a partir de ahí inferir los posibles efectos de la administración de hormonas tiroideas sobre la dicha función durante la sepsis. En concreto, nos enfocaremos en los efectos de la hormona tiroidea sobre la contractilidad cardíaca y metabolismo energético.

Tanto productos bacterianos como citoquinas proinflamatorias aumentan la producción de óxido nítrico (NO)¹⁸⁵⁻¹⁸⁷ y especies de oxígeno reactivo (ROS)^{188,189} que pueden inhibir la función de proteínas implicadas en la contracción y relajación miocárdica^{189,190} como *Sarcoendoplasmic reticulum adenosine triphosphatase 2a* (SERCA2a) y el canal de calcio tipo L (LTCC). Lo que produce la disminución de la entrada de calcio en la célula y de la liberación de calcio del retículo sarcoplasmático y como consecuencia un acortamiento del sarcómero^{191,192}. Estos productos bacterianos y citoquinas proinflamatorias inhiben también, la expresión génica de *SERCA2a*¹⁹³,

reducen la sensibilidad del miofilamento al calcio¹⁹⁴, e inhiben la expresión y desensibilizan los receptores adrenérgicos (AR)^{195,196}.

Las hormonas tiroideas aumentan la contractilidad miocárdica regulando la disponibilidad de calcio, la expresión de proteínas necesarias para la contracción y la respuesta adrenérgica. En concreto, las hormonas tiroideas inducen la expresión de los genes *SERCA2a* y del receptor de ryanodina 2 (*RYR2*), inhiben la expresión del gen fosfolamban (*PLN*) e inducen la fosforilación de PLN. Estos cambios conllevan a un incremento en la amplitud y la velocidad de las ondas de calcio generadas por la liberación y entrada cíclica de calcio al retículo sarcoplasmático que aumenta la función miocárdica¹⁹⁷. Las hormonas tiroideas inducen la expresión de la cadena pesada de la miosina α codificada por el gen *MYH6* e inhiben la expresión de la cadena pesada de miosina β codificada por el gen *MYH7*¹⁹⁷. La MYH6 posee mayor actividad ATPasa comparado con la MYH7, por lo que un incremento en el la proporción de MYH6 conlleva a un aumento de la velocidad y de la fuerza de contracción del ventrículo izquierdo¹⁹⁸. Además, las hormonas tiroideas inducen la expresión de la alfa-actina esquelética (*SKA- α*), lo que también aumentaría la contractilidad del miocardio¹⁹⁹. La expresión de la proteína titina, componente del sarcómero, en el miocardio también es regulada por hormonas tiroideas²⁰⁰. En el miocardio se expresan dos isoformas de la titina, la isoforma N2BA y la isoforma N2B, isoforma más pequeña y rígida. En pacientes con hipotiroidismo se observó un incremento de la expresión de la isoforma N2BA que se relacionó con la disfunción diastólica asociada al hipotiroidismo²⁰¹.

Las hormonas tiroideas regulan el número y la afinidad de los receptores adrenérgicos y la actividad de la enzima adenilato ciclasa en el miocardio^{202,203}. El hipotiroidismo está relacionado con una disminución de la respuesta a agonistas beta-adrenérgicos^{204,205}, debido a la disminución de receptores adrenérgicos^{205,206} y al incremento de la expresión de las quinasas de receptores acoplados a proteínas G 2 (GRK2) y 5 (GRK5)²⁰⁷.

Además de sus efectos directos sobre la mecánica cardíaca, las hormonas tiroideas tienen importantes efectos sobre el metabolismo energético. Durante el shock séptico existe una disminución en la oxidación de ácidos grasos²⁰⁸ que no se compensa a expensas de aumentar la oxidación de glucosa, ya que la actividad del complejo piruvato deshidrogenasa también disminuye durante la sepsis^{209,210}, situación que predispone a un déficit de ATP. Aunque no existe acuerdo si durante el shock séptico existe de forma universal una menor generación de ATP, ya sea por defecto en la utilización de los sustratos energéticos, o por anomalías a la cadena de transporte energético mitocondrial, lo cierto es que en casos letales, los niveles de ATP tisular disminuyen²¹¹. Entre los factores responsables de la inhibición de la oxidación de ácidos grasos estarían la menor actividad CPTI (del inglés *fatty acyl-CoA transporter carnitine palmitoyltransferase-1*) y la disminución en la expresión de los receptores nucleares *PPAR- α* y *PGC-1 α* (del inglés *peroxisome proliferator-activated receptor gamma co-activator-1 α*)^{161,212}.

Las hormonas tiroideas aumentan la oxidación de ácidos grasos que podría compensar el descenso de la oxidación de glucosa observada en el shock séptico. T3 induce la actividad de la proteína quinasa activada por AMP (AMPK)¹⁴² lo que aumenta la expresión de transportadores de ácidos grasos en la membrana²¹³. Además, la activación de AMPK inhibe la acetil-CoA carboxilasa (ACC), provocando una disminución de los niveles de malonil coenzima A, inhibidor de la actividad CPT-1^{214,215}. T3 también induce la expresión génica de *CPT-1* y *PGC-1 α* y regula el ensamblaje y la degradación de la proteína trifuncional mitocondrial (MPT), un complejo enzimático asociado a la membrana mitocondrial interna²¹⁶⁻²¹⁸.

En nuestro estudio encontramos, que el miocardio porcino durante la sepsis es hipotiroideo, pero no observamos cambios encaminados a disminuir la síntesis de T3 (descenso de la actividad DIO2 y aumento de la actividad DIO3) o a aumentar su aclaramiento (aumento de DIO3). Además, la expresión de *THRA1*, principal receptor que controla los efectos genómicos de T3 sobre la contractilidad miocárdica, no se modificó en los animales sépticos respecto a los controles. Como consecuencia del hipotiroidismo miocárdico, sería de esperar una menor ocupación del TR α 1, que sin embargo no sería inocua ya que el TR α 1 sin unión a ligando no es inactivo y causa hipertrofia miocárdica y menor contractilidad. Las dos circunstancias, hipotiroidismo y menor ocupación de TR α 1 podrían originar disfunción miocárdica^{219,220}.

Nuestros hallazgos sugieren que el hipotiroidismo miocárdico asociado al shock séptico es consecuencia principalmente de un descenso

de los niveles de hormona a nivel sanguíneo y que, por tanto, debido a los efectos deletéreos del hipotiroidismo sobre la función miocárdica, su administración sería beneficiosa.

Los mecanismos moleculares implicados en el descenso de la expresión de los receptores nucleares para las hormonas tiroideas no se conocen. Uno de los posibles mediadores es NF- κ B, debido a su papel central en la respuesta inmune a la infección, a que la administración de LPS induce su activación, y a que TNF- α induce su activación y causa un descenso en la actividad *DIO1*²²¹. En este sentido, en estudios realizados en la línea celular de hígado HepG2 se observó que la activación de NF- κ B inducida por TNF- α bloquea el aumento de la expresión génica *DIO1* dependiente de T3¹⁶⁴. En el presente estudio observamos que la mayor expresión de *DIO1* la presentan hígado y riñón, únicos tejidos en los que se detectó actividad enzimática. La administración de LPS se asoció a mayor actividad NF- κ B en riñón pero no en hígado, por lo que no podemos concluir que exista una relación inversa causal entre activación NF- κ B y expresión *DIO1*. De igual manera, al igual que en hígado, tras la administración de LPS no observamos activación NF- κ B en corazón, tejidos en los que la expresión de *THRB* disminuyó. De los resultados obtenidos en nuestro estudio no podemos concluir que exista una relación directa entre mayor activación NF- κ B y menor expresión de *DIO1* y *THRB* en corazón e hígado.

El gen *PTGS-2* codifica para la enzima inducible prostaglandina-endoperóxido sintasa 2 (PTGS2), también conocida ciclooxigenasa 2 ó COX-2. COX-2 participa en la síntesis de prostanoïdes (prostaglandinas,

prostaciclina y tromboxanos) que juegan un papel importante en fisiopatología de la sepsis; de hecho, ratones knock-out de *PTGS-2* muestran un descenso de la mortalidad y de la inflamación inducida por sepsis²²². En nuestro estudio, la administración de LPS se asoció a un aumento muy notable en la expresión de COX-2 en casi todos tejidos estudiados, y de forma muy especial en aorta, miocardio, médula renal y cerebelo. Las implicaciones del aumento de expresión en COX-2 en nuestro modelo son desconocidas, aunque en el presente ya sabemos que el receptor para prostaglandina E2, EP4, se expresa en el miocardio porcino a niveles bajos, y que tras la administración de LPS se produce también un aumento superior a 10 veces en su expresión. El aumento en la expresión miocárdica de COX-2 y del receptor EP4 sugiere un aumento en la producción y actividad de prostaglandina E a nivel cardíaco cuyos efectos están por investigar. En un futuro esperamos medir los niveles de prostaglandinas tisulares e investigar su participación en el hipotiroidismo asociado a la enfermedad.

HIF-1 α es el principal mediador transcripcional de la respuesta celular a hipoxia²²³. Sin embargo, se ha demostrado que LPS induce la estabilización de HIF-1 incluso en condiciones de normoxia²²⁴. HIF-1 contribuye en la activación de citoquinas, los síntomas y la letalidad de la sepsis inducida por LPS. Los ratones que presentan la delección de *HIF-1* en macrófagos muestran menor mortalidad tras la infusión de LPS. Se ha descrito que hipoxia incrementa la actividad de la enzima DIO3 en múltiples tipos celulares incluyendo neuronas (células SK-N-AS), cardiomiocitos de rata neonatas, hepatocitos (células NCLP6E) y células de coriocarcinoma humano (JEG-3) pero no así en células de endometrio

(células ECC-1) o fibroblastos (células AG104526 humanas), indicando que el incremento en la actividad DIO3 inducido por hipoxia es dependiente del tipo celular.²²⁵. Previamente se ha establecido que HIF promueve supervivencia celular en situaciones de hipoxia ya que sus genes diana reducen el consumo de oxígeno. Las hormonas tiroideas estimulan el consumo de oxígeno, la regulación local de T3 en los tejidos afectados por hipoxia podría tener importancia fisiológica²²⁶. Sin embargo, nosotros sólo observamos una relación entre el aumento de expresión de *HIF-1* y el incremento de la actividad DIO3 en hipotálamo, por lo que el aumento en la actividad DIO3 tras la infusión de LPS está en relación a aumento de expresión en *HIF-1*.

HIF-1 regula también genes relacionados con apoptosis celular como p53 y la caspasa 3²²⁷. La activación de caspasa 3 juega un papel importante en la disfunción cardíaca inducida por endotoxinas, que puede estar relacionado con la respuesta de los miofilamentos a calcio, alteraciones en las proteínas contráctiles (degradación de troponina) y desorganización del sarcómero²²⁸. Durante el shock séptico se observa una disminución de la síntesis de vasopresina por el hipotálamo que se relaciona con vasodilatación y disfunción orgánica; el aumento de la expresión de caspasa 3 en el núcleo paraventricular y supraóptico del hipotálamo podría explicar este hallazgo²²⁹. En estudios realizados en páncreas de ratones diabéticos e *in vitro* en trofoblastos de placenta se observó que T3 reduce la activación de caspasa 3 que conlleva a una disminución de la apoptosis^{230,231}. En nuestro modelo observamos un aumento significativo de la expresión de *HIF-1* en ambos tejidos, por lo

que sería de alto interés investigar si se activaron estas vías, y si el tratamiento con T3 ejerce un efecto beneficioso en este sentido.



6. CONCLUSIONES

1. El shock séptico inducido mediante LPS provocó NTIS.
2. NTIS causó hipotiroidismo con disminución de la concentración de hormonas tiroideas a nivel tisular. Sin embargo, el lóbulo frontal mantuvo niveles normales de T3.
3. En los principales tejidos productores de T3, hígado y riñón, se produjo una disminución de expresión y actividad de DIO1 y aumento de la actividad DIO3.
4. No se observó un aumento en rT3 sérica, debido a que su producción está limitada por la disminución de su sustrato (T4).
5. En varios tejidos se produjeron cambios en una dirección que sugiere la posibilidad de una menor sensibilidad a la acción de las hormonas tiroideas.
6. No se encontró una relación clara entre la activación tisular de NFκ-B y el descenso en la expresión de *THRB* tisular.



7. BIBLIOGRAFÍA

1. Kaptein E. M., Robinson W. J., Grieb D. A. & Nicoloff J. T. Peripheral serum thyroxine, triiodothyronine and reverse triiodothyronine kinetics in the low thyroxine state of acute nonthyroidal illnesses. A noncompartmental analysis. *J Clin Invest* 69, 526-535, (1982).
2. Tibaldi J. M. & Surks M. I. Effects of nonthyroidal illness on thyroid function. *The Medical Clinics of North America* 69, 899-911, (1985).
3. McIver B. & Gorman C. A. Euthyroid sick syndrome: an overview. *Thyroid* 7, 125-132, (1997).
4. Chopra I. J., Chopra U., Smith S. R., Reza M. & Solomon D. H. Reciprocal changes in serum concentrations of 3,3',5-triiodothyronine (T3) in systemic illnesses. *J Clin Endocrinol Metab* 41, 1043-1049, (1975).
5. Van den Berghe G. Novel insights into the neuroendocrinology of critical illness. *Eur J Endocrinol* 143, 1-13, (2000).
6. De Groot L. J. Dangerous dogmas in medicine: the nonthyroidal illness syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 84, 151-164, (1999).
7. Chopra I. J. Clinical review 86: Euthyroid sick syndrome: is it a misnomer? *J Clin Endocrinol Metab* 82, 329-334, (1997).
8. Lechan R.M., Fekete C. Hypothalamic-pituitary-thyroid axis: organization, neural/endocrine control of TRH. In: Squire LR, ed. *edn*, 75–87 (*Encyclopedia of Neuroscience*. Academic Press, 2009).
9. Yamada M., Radovick S., Wondisford F. E., Nakayama Y., Weintraub B. D. & Wilber J. F. Cloning and structure of human genomic DNA and hypothalamic cDNA encoding human prepro thyrotropin-releasing hormone. *Mol Endocrinol* 4, 551-556, (1990).
10. Lechan R. M., Wu P., Jackson I. M., Wolf H., Cooperman S., Mandel G. & Goodman R. H. Thyrotropin-releasing

- hormone precursor: characterization in rat brain. *Science* 231, 159-161, (1986).
11. Nillni E. A. & Sevarino K. A. The biology of prothyrotropin-releasing hormone-derived peptides. *Endocr Rev* 20, 599-648, (1999).
 12. Perello M. & Nillni E. A. The biosynthesis and processing of neuropeptides: lessons from prothyrotropin releasing hormone (proTRH). *Front Biosci* 12, 3554-3565, (2007).
 13. Lechan R. M. & Jackson I. M. Immunohistochemical localization of thyrotropin-releasing hormone in the rat hypothalamus and pituitary. *Endocrinology* 111, 55-65, (1982).
 14. Merchenthaler I., Csernus V., Csontos C., Petrusz P. & Mess B. New data on the immunocytochemical localization of thyrotropin-releasing hormone in the rat central nervous system. *The American Journal of Anatomy* 181, 359-376, (1988).
 15. Brownstein M. J., Palkovits M., Saavedra J. M., Bassiri R. M. & Utiger R. D. Thyrotropin-releasing hormone in specific nuclei of rat brain. *Science* 185, 267-269, (1974).
 16. Hokfelt T., Fuxe K., Johansson O., Jeffcoate S. & White N. Distribution of thyrotropin-releasing hormone (TRH) in the central nervous system as revealed with immunohistochemistry. *Eur J Pharmacol* 34, 389-392, (1975).
 17. Le Dafniet M., Blumberg-Tick J., Gozlan H., Barret A., Joubert Bression D. & Peillon F. Altered balance between thyrotropin-releasing hormone and dopamine in prolactinomas and other pituitary tumors compared to normal pituitaries. *J Clin Endocrinol Metab* 69, 267-271, (1989).
 18. Le Dafniet M., Lefebvre P., Barret A., Mechain C., Feinstein M. C., Brandi A. M. & Peillon F. Normal and adenomatous human pituitaries secrete thyrotropin-releasing hormone in vitro: modulation by dopamine, haloperidol, and somatostatin. *J Clin Endocrinol Metab* 71, 480-486, (1990).
 19. Poulat P., Sandillon F., Marlier L., Rajaofetra N., Oliver C. & Privat A. Distribution of thyrotropin-releasing hormone in the rat spinal cord with special reference to sympathetic nuclei: a light- and electron-microscopic

- immunocytochemical study. *J Neurocytol* 21, 157-170, (1992).
20. Tsuruo Y., Hokfelt T. & Visser T. Thyrotropin releasing hormone (TRH)-immunoreactive cell groups in the rat central nervous system. *Exp Brain Res* 68, 213-217, (1987).
 21. Tsuruo Y., Hokfelt T. & Visser T. J. Thyrotropin-releasing hormone (TRH)-immunoreactive neuron populations in the rat olfactory bulb. *Brain Res* 447, 183-187, (1988).
 22. Iversen E., Weeke J. & Laurberg P. TRH immunoreactivity in the thyroid gland. *Scand J Clin Lab Invest* 44, 703-709, (1984).
 23. Shambaugh G., Kubek M. & Wilber J. F. Thyrotropin-releasing hormone activity in the human placenta. *J Clin Endocrinol Metab* 48, 483-486, (1979).
 24. Tsuruo Y., Hokfelt T., Visser T. J., Kimmel J. R., Brown J. C., Verhofstadt A. & Walsh J. TRH-like immunoreactivity in endocrine cells and neurons in the gastro-intestinal tract of the rat and guinea pig. *Cell Tissue Res* 253, 347-356, (1988).
 25. Leduque P., Aratan-Spire S., Scharfmann R., Basmaciogullari A., Czernichow P. & Dubois P. M. Coexistence of thyrotropin-releasing hormone and insulin in cultured fetal rat islets: a light and electron microscopic immunocytochemical study during islet neof ormation. *Biol Cell* 66, 291-296, (1989).
 26. Pekary A. E., Meyer N. V., Vaillant C. & Hershman J. M. Thyrotropin-releasing hormone and a homologous peptide in the male rat reproductive system. *Biochem Biophys Res Commun* 95, 993-1000, (1980).
 27. Montagne J. J., Ladram A., Grouselle D., Nicolas P. & Bulant M. Identification and cellular localization of thyrotropin-releasing hormone-related peptides in rat testis. *Endocrinology* 137, 185-191, (1996).
 28. Hashimoto K., Zanger K., Hollenberg A. N., Cohen L. E., Radovick S. & Wondisford F. E. cAMP response element-binding protein-binding protein mediates thyrotropin-releasing hormone signaling on thyrotropin subunit genes. *J Biol Chem* 275, 33365-33372, (2000).

29. Persani L. Hypothalamic thyrotropin-releasing hormone and thyrotropin biological activity. *Thyroid* 8, 941-946, (1998).
30. Harris A. R., Christianson D., Smith M. S., Fang S. L., Braverman L. E. & Vagenakis A. G. The physiological role of thyrotropin-releasing hormone in the regulation of thyroid-stimulating hormone and prolactin secretion in the rat. *J Clin Invest* 61, 441-448, (1978).
31. Lechan R. M. & Fekete C. The TRH neuron: a hypothalamic integrator of energy metabolism. *Prog Brain Res* 153, 209-235, (2006).
32. Freeman M. E., Kanyicska B., Lerant A. & Nagy G. Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. *Physiol Rev* 80, 1523-1631, (2000).
33. Perello M., Friedman T., Paez-Espinosa V., Shen X., Stuart R. C. & Nillni E. A. Thyroid hormones selectively regulate the posttranslational processing of prothyrotropin-releasing hormone in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Endocrinology* 147, 2705-2716, (2006).
34. Segerson T. P., Kauer J., Wolfe H. C., Mobtaker H., Wu P., Jackson I. M. & Lechan R. M. Thyroid hormone regulates TRH biosynthesis in the paraventricular nucleus of the rat hypothalamus. *Science* 238, 78-80, (1987).
35. Hollenberg A. N., Monden T., Flynn T. R., Boers M. E., Cohen O. & Wondisford F. E. The human thyrotropin-releasing hormone gene is regulated by thyroid hormone through two distinct classes of negative thyroid hormone response elements. *Mol Endocrinol* 9, 540-550, (1995).
36. Shen X., Li Q. L., Brent G. A. & Friedman T. C. Regulation of regional expression in rat brain PC2 by thyroid hormone/characterization of novel negative thyroid hormone response elements in the PC2 promoter. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 288, E236-245, (2005).
37. Harris M., Aschkenasi C., Elias C. F., Chandrankunnel A., Nillni E. A., Bjoorbaek C., Elmquist J. K., Flier J. S. & Hollenberg A. N. Transcriptional regulation of the thyrotropin-releasing hormone gene by leptin and melanocortin signaling. *J Clin Invest* 107, 111-120, (2001).

38. Perello M., Stuart R. C. & Nillni E. A. The role of intracerebroventricular administration of leptin in the stimulation of prothyrotropin releasing hormone neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinology* 147, 3296-3306, (2006).
39. Tapia-Arancibia L., Arancibia S. & Astier H. Evidence for alpha 1-adrenergic stimulatory control of in vitro release of immunoreactive thyrotropin-releasing hormone from rat median eminence: in vivo corroboration. *Endocrinology* 116, 2314-2319, (1985).
40. Schettini G., Quattrone A., Di Renzo G., Lombardi G. & Preziosi P. Effect of 6-hydroxydopamine treatment on TSH secretion in basal and cold-stimulated conditions in the rat. *Eur J Pharmacol* 56, 153-157, (1979).
41. Arancibia S., Tapia-Arancibia L., Astier H. & Assenmacher I. Physiological evidence for alpha 1-adrenergic facilitatory control of the cold-induced TRH release in the rat, obtained by push-pull cannulation of the median eminence. *Neurosci Lett* 100, 169-174, (1989).
42. Jinsi-Parimoo A. & Gershengorn M. C. Constitutive activity of native thyrotropin-releasing hormone receptors revealed using a protein kinase C-responsive reporter gene. *Endocrinology* 138, 1471-1475, (1997).
43. Drummond A. H. Bidirectional control of cytosolic free calcium by thyrotropin-releasing hormone in pituitary cells. *Nature* 315, 752-755, (1985).
44. Drummond A. H., Bushfield M. & Macphee C. H. Thyrotropin-releasing hormone-stimulated [3H]inositol metabolism in GH3 pituitary tumor cells. Studies with lithium. *Mol Pharmacol* 25, 201-208, (1984).
45. Gershengorn M. C. Mechanism of signal transduction by TRH. *Ann N Y Acad Sci* 553, 191-196, (1989).
46. Hershman J. Clinical application of thyrotropin-releasing hormone. *N Engl J Med* 290, 886-890, (1974).
47. Chiamolera M. I. & Wondisford F. E. Minireview: Thyrotropin-releasing hormone and the thyroid hormone feedback mechanism. *Endocrinology* 150, 1091-1096, (2009).

48. Shupnik M. A., Chin W. W., Habener J. F. & Ridgway E. C. Transcriptional regulation of the thyrotropin subunit genes by thyroid hormone. *J Biol Chem* 260, 2900-2903, (1985).
49. Scanlon M. F., Weightman D. R., Shale D. J., Mora B., Heath M., Snow M. H., Lewis M. & Hall R. Dopamine is a physiological regulator of thyrotrophin (TSH) secretion in normal man. *Clin Endocrinol (Oxf)* 10, 7-15, (1979).
50. Tanjasiri P., Kozbur X. & Florsheim W. H. Somatostatin in the physiologic feedback control of thyrotropin secretion. *Life Sci* 19, 657-660, (1976).
51. Brabant G., Brabant A., Ranft U., Ocran K., Kohrle J., Hesch R. D. & von zur Muhlen A. Circadian and pulsatile thyrotropin secretion in euthyroid man under the influence of thyroid hormone and glucocorticoid administration. *J Clin Endocrinol Metab* 65, 83-88, (1987).
52. Seoane L. M., Carro E., Tovar S., Casanueva F. F. & Dieguez C. Regulation of in vivo TSH secretion by leptin. *Regul Pept* 92, 25-29, (2000).
53. Haugen B. R. Drugs that suppress TSH or cause central hypothyroidism. Best practice & research. *Clinical Endocrinology & Metabolism* 23, 793-800, (2009).
54. Chowdhury I., Chien J. T., Chatterjee A. & Yu J. Y. Effects of leptin and neuropeptide-Y on transcript levels of thyrotropin beta and common alpha subunits of rat pituitary cells in vitro. *Life Sci* 75, 2897-2909, (2004).
55. Spaulding S. W. Biological actions of thyrotropin. *The Thyroid: A Fundamental and Clinical Text.* 227-233 (Lippincott Williams and Wilkins, 2000).
56. Wonerow P., Neumann S., Gudermann T. & Paschke R. Thyrotropin receptor mutations as a tool to understand thyrotropin receptor action. *J Mol Med (Berl)* 79, 707-721, (2001).
57. Laurent E., Mockel J., Van Sande J., Graff I. & Dumont J. E. Dual activation by thyrotropin of the phospholipase C and cyclic AMP cascades in human thyroid. *Mol Cell Endocrinol* 52, 273-278, (1987).
58. Rivolta C. M. & Targovnik H. M. Molecular advances in thyroglobulin disorders. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry* 374, 8-24, (2006).

59. Dai G., Levy O. & Carrasco N. Cloning and characterization of the thyroid iodide transporter. *Nature* 379, 458-460, (1996).
60. Coyle B., Coffey R., Armour J. A., Gausden E., Hochberg Z., Grossman A., Britton K., Pembrey M., Reardon W. & Trembath R. Pendred syndrome (goitre and sensorineural hearing loss) maps to chromosome 7 in the region containing the nonsyndromic deafness gene DFNB4. *Nat Genet* 12, 421-423, (1996).
61. Sheffield V. C., Kraiem Z., Beck J. C., Nishimura D., Stone E. M., Salameh M., Sadeh O. & Glaser B. Pendred syndrome maps to chromosome 7q21-34 and is caused by an intrinsic defect in thyroid iodine organification. *Nat Genet* 12, 424-426, (1996).
62. Libert F., Ruel J., Ludgate M., Swillens S., Alexander N., Vassart G. & Dinsart C. Thyroperoxidase, an auto-antigen with a mosaic structure made of nuclear and mitochondrial gene modules. *EMBO J* 6, 4193-4196, (1987).
63. Kimura S., Kotani T., McBride O. W., Umeki K., Hirai K., Nakayama T. & Ohtaki S. Human thyroid peroxidase: complete cDNA and protein sequence, chromosome mapping, and identification of two alternately spliced mRNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 5555-5559, (1987).
64. Kimura S., Hong Y. S., Kotani T., Ohtaki S. & Kikkawa F. Structure of the human thyroid peroxidase gene: comparison and relationship to the human myeloperoxidase gene. *Biochemistry* 28, 4481-4489, (1989).
65. Dupuy C., Ohayon R., Valent A., Noel-Hudson M. S., Deme D. & Virion A. Purification of a novel flavoprotein involved in the thyroid NADPH oxidase. Cloning of the porcine and human cdnas. *J Biol Chem* 274, 37265-37269, (1999).
66. De Deken X., Wang D., Many M. C., Costagliola S., Libert F., Vassart G., Dumont J. E. & Miot F. Cloning of two human thyroid cDNAs encoding new members of the NADPH oxidase family. *J Biol Chem* 275, 23227-23233, (2000).
67. Dunn J. T. & Dunn A. D. Update on intrathyroidal iodine metabolism. *Thyroid* 11, 407-414, (2001).

68. Kambe F. & Seo H. Thyroid-specific transcription factors. *Endocr J* 44, 775-784, (1997).
69. Damante G., Tell G., Leonardi A., Fogolari F., Bortolotti N., Di Lauro R. & Formisano S. Analysis of the conformation and stability of rat TTF-1 homeodomain by circular dichroism. *FEBS Lett* 354, 293-296, (1994).
70. Schussler G. C. The thyroxine-binding proteins. *Thyroid* 10, 141-149, (2000).
71. Refetoff S. Inherited thyroxine-binding globulin abnormalities in man. *Endocr Rev* 10, 275-293, (1989).
72. Friesema E. C., Jansen J., Milici C. & Visser T. J. Thyroid hormone transporters. *Vitam Horm* 70, 137-167, (2005).
73. Kinne A., Kleinau G., Hoefig C. S., Gruters A., Kohrle J., Krause G. & Schweizer U. Essential molecular determinants for thyroid hormone transport and first structural implications for monocarboxylate transporter 8. *J Biol Chem* 285, 28054-28063, (2010).
74. Friesema E. C., Jansen J., Jachtenberg J. W., Visser W. E., Kester M. H. & Visser T. J. Effective cellular uptake and efflux of thyroid hormone by human monocarboxylate transporter 10. *Mol Endocrinol* 22, 1357-1369, (2008).
75. Price N. T., Jackson V. N. & Halestrap A. P. Cloning and sequencing of four new mammalian monocarboxylate transporter (MCT) homologues confirms the existence of a transporter family with an ancient past. *Biochem J* 329 (Pt 2), 321-328, (1998).
76. Nishimura M. & Naito S. Tissue-specific mRNA expression profiles of human solute carrier transporter superfamilies. *Drug Metab Pharmacokinet* 23, 22-44, (2008).
77. Ritchie J. W. & Taylor P. M. Tryptophan and iodothyronine transport interactions in HepG2 human hepatoma cells. *Amino Acids* 38, 1361-1367, (2010).
78. Kim D. K., Kanai Y., Chairoungdua A., Matsuo H., Cha S. H. & Endou H. Expression cloning of a Na⁺-independent aromatic amino acid transporter with structural similarity to H⁺/monocarboxylate transporters. *J Biol Chem* 276, 17221-17228, (2001).
79. Kim D. K., Kanai Y., Matsuo H., Kim J. Y., Chairoungdua A., Kobayashi Y., Enomoto A., Cha S. H., Goya T. & Endou

- H. The human T-type amino acid transporter-1: characterization, gene organization, and chromosomal location. *Genomics* 79, 95-103, (2002).
80. Ramadan T., Camargo S. M., Summa V., Hunziker P., Chesnov S., Pos K. M. & Verrey F. Basolateral aromatic amino acid transporter TAT1 (Slc16a10) functions as an efflux pathway. *J Cell Physiol* 206, 771-779, (2006).
81. Dumitrescu A. On the mechanism producing the unusual thyroid phenotype in defects of the MCT8 gene. *Thyroid* 14, 761-761, (2004).
82. Meinhold H., Campos-Barros A. & Behne D. Effects of selenium and iodine deficiency on iodothyronine deiodinases in brain, thyroid and peripheral tissue. *Acta Medica Austriaca* 19 Suppl 1, 8-12, (1992).
83. Bermano G., Nicol F., Dyer J. A., Sunde R. A., Beckett G. J., Arthur J. R. & Hesketh J. E. Tissue-specific regulation of selenoenzyme gene expression during selenium deficiency in rats. *Biochem J* 311 (Pt 2), 425-430, (1995).
84. Bates J. M., Spate V. L., Morris J. S., St Germain D. L. & Galton V. A. Effects of selenium deficiency on tissue selenium content, deiodinase activity, and thyroid hormone economy in the rat during development. *Endocrinology* 141, 2490-2500, (2000).
85. Dumitrescu A. M., Liao X. H., Abdullah M. S., Lado-Abeal J., Majed F. A., Moeller L. C., Boran G., Schomburg L., Weiss R. E. & Refetoff S. Mutations in SECISBP2 result in abnormal thyroid hormone metabolism. *Nat Genet* 37, 1247-1252, (2005).
86. Baqui M. M., Gereben B., Harney J. W., Larsen P. R. & Bianco A. C. Distinct subcellular localization of transiently expressed types 1 and 2 iodothyronine deiodinases as determined by immunofluorescence confocal microscopy. *Endocrinology* 141, 4309-4312, (2000).
87. Bianco A. C., Salvatore D., Gereben B., Berry M. J. & Larsen P. R. Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases. *Endocr Rev* 23, 38-89, (2002).
88. Rodriguez-Perez A., Palos-Paz F., Kaptein E., Visser T. J., Dominguez-Gerpe L., Alvarez-Escudero J. & Lado-Abeal J.

- Identification of molecular mechanisms related to nonthyroidal illness syndrome in skeletal muscle and adipose tissue from patients with septic shock. *Clin Endocrinol (Oxf)* 68, 821-827, (2008).
89. Toyoda N., Zavacki A. M., Maia A. L., Harney J. W. & Larsen P. R. A novel retinoid X receptor-independent thyroid hormone response element is present in the human type 1 deiodinase gene. *Mol Cell Biol* 15, 5100-5112, (1995).
90. Maia A. L., Goemann I. M., Meyer E. L. & Wajner S. M. Deiodinases: the balance of thyroid hormone: type 1 iodothyronine deiodinase in human physiology and disease. *J Endocrinol* 209, 283-297, (2011).
91. Ishii H., Inada M., Tanaka K., Mashio Y., Naito K., Nishikawa M., Matsuzuka F., Kuma K. & Imura H. Induction of outer and inner ring monodeiodinases in human thyroid gland by thyrotropin. *J Clin Endocrinol Metab* 57, 500-505, (1983).
92. Beech S. G., Walker S. W., Arthur J. R., Lee D. & Beckett G. J. Differential control of type-I iodothyronine deiodinase expression by the activation of the cyclic AMP and phosphoinositol signalling pathways in cultured human thyrocytes. *J Mol Endocrinol* 14, 171-177, (1995).
93. Alcantara M. R., Salvatori R., Alcantara P. R., Nobrega L. M., Campos V. S., Oliveira E. C., Oliveira M. H., Souza A. H. & Aguiar-Oliveira M. H. Thyroid morphology and function in adults with untreated isolated growth hormone deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 91, 860-864, (2006).
94. Glynn N., Quisenberry L., Halsall D.J., Thompson C.J., O’Gorman D., Lado-Abeal J., Agha A. Alterations in thyroid hormone levels following growth hormone replacement are incompletely explained by changes in the activity of 5-deiodinase enzymes in subcutaneous fat. Irish Endocrine Society 39th Annual Meeting. Galway. Ireland. *Ir J Med Sci* (2014).
95. Croteau W., Davey J. C., Galton V. A. & St Germain D. L. Cloning of the mammalian type II iodothyronine deiodinase. A selenoprotein differentially expressed and regulated in human and rat brain and other tissues. *J Clin Invest* 98, 405-417, (1996).

96. Salvatore D., Bartha T., Harney J. W. & Larsen P. R. Molecular biological and biochemical characterization of the human type 2 selenodeiodinase. *Endocrinology* 137, 3308-3315, (1996).
97. Bartha T., Kim S. W., Salvatore D., Gereben B., Tu H. M., Harney J. W., Rudas P. & Larsen P. R. Characterization of the 5'-flanking and 5'-untranslated regions of the cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-responsive human type 2 iodothyronine deiodinase gene. *Endocrinology* 141, 229-237, (2000).
98. Salvatore D., Tu H., Harney J. W. & Larsen P. R. Type 2 iodothyronine deiodinase is highly expressed in human thyroid. *J Clin Invest* 98, 962-968, (1996).
99. Murakami M., Araki O., Hosoi Y., Kamiya Y., Morimura T., Ogiwara T., Mizuma H. & Mori M. Expression and regulation of type II iodothyronine deiodinase in human thyroid gland. *Endocrinology* 142, 2961-2967, (2001).
100. Imai Y., Toyoda N., Maeda A., Kadobayashi T., Fangzheng G., Nishikawa M. & Iwasaka T. Type 2 iodothyronine deiodinase expression is upregulated by the protein kinase A-dependent pathway and is downregulated by the protein kinase C-dependent pathway in cultured human thyroid cells. *Thyroid* 11, 899-907, (2001).
101. Gereben B., Goncalves C., Harney J. W., Larsen P. R. & Bianco A. C. Selective proteolysis of human type 2 deiodinase: a novel ubiquitin-proteasomal mediated mechanism for regulation of hormone activation. *Mol Endocrinol* 14, 1697-1708, (2000).
102. St Germain D. L. The effects and interactions of substrates, inhibitors, and the cellular thiol-disulfide balance on the regulation of type II iodothyronine 5'-deiodinase. *Endocrinology* 122, 1860-1868, (1988).
103. Burmeister L. A., Pachucki J. & St Germain D. L. Thyroid hormones inhibit type 2 iodothyronine deiodinase in the rat cerebral cortex by both pre- and posttranslational mechanisms. *Endocrinology* 138, 5231-5237, (1997).
104. Gereben B., Kollar A., Harney J. W. & Larsen P. R. The mRNA structure has potent regulatory effects on type 2

- iodothyronine deiodinase expression. *Mol Endocrinol* 16, 1667-1679, (2002).
105. Gereben B., Salvatore D., Harney J. W., Tu H. M. & Larsen P. R. The human, but not rat, *dio2* gene is stimulated by thyroid transcription factor-1 (TTF-1). *Mol Endocrinol* 15, 112-124, (2001).
106. Zeold A., Doleschall M., Haffner M. C., Capelo L. P., Menyhart J., Liposits Z., da Silva W. S., Bianco A. C., Kacsokovics I., Fekete C. & Gereben B. Characterization of the nuclear factor-kappa B responsiveness of the human *dio2* gene. *Endocrinology* 147, 4419-4429, (2006).
107. 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* 84, 3293-3300, (1999).
108. Baqui M., Botero D., Gereben B., Curcio C., Harney J. W., Salvatore D., Sorimachi K., Larsen P. R. & Bianco A. C. Human type 3 iodothyronine selenodeiodinase is located in the plasma membrane and undergoes rapid internalization to endosomes. *J Biol Chem* 278, 1206-1211, (2003).
109. Huang T. S., Beredo A., Solomon D. H. & Chopra I. J. The inner ring (5-) monodeiodination of thyroxine (T4) in cerebral cortex during fetal, neonatal, and adult life. *Metabolism* 35, 272-277, (1986).
110. Van der Geyten S., Sanders J. P., Kaptein E., Darras V. M., Kuhn E. R., Leonard J. L. & Visser T. J. Expression of chicken hepatic type I and type III iodothyronine deiodinases during embryonic development. *Endocrinology* 138, 5144-5152, (1997).
111. Bates J. M., St Germain D. L. & Galton V. A. Expression profiles of the three iodothyronine deiodinases, D1, D2, and D3, in the developing rat. *Endocrinology* 140, 844-851, (1999).
112. Gereben B., Zeold A., Dentice M., Salvatore D. & Bianco A. C. Activation and inactivation of thyroid hormone by deiodinases: local action with general consequences. *Cell Mol Life Sci* 65, 570-590, (2008).
113. Esfandiari A., Gagelin C., Gavaret J. M., Pavelka S., Lennon A. M., Pierre M. & Courtin F. Induction of type III-

- deiodinase activity in astroglial cells by retinoids. *Glia* 11, 255-261, (1994).
114. Hernandez A. & Obregon M. J. Presence of growth factors-induced type III iodothyronine 5-deiodinase in cultured rat brown adipocytes. *Endocrinology* 136, 4543-4550, (1995).
115. Simonides W. S., Mulcahey M. A., Redout E. M., Muller A., Zuidwijk M. J., Visser T. J., Wassen F. W., Crescenzi A., da-Silva W. S., Harney J., Engel F. B., Obregon M. J., Larsen P. R., Bianco A. C. & Huang S. A. Hypoxia-inducible factor induces local thyroid hormone inactivation during hypoxic-ischemic disease in rats. *J Clin Invest* 118, 975-983, (2008).
116. Lamirand A., Pallud-Mothre S., Ramage M., Pierre M. & Courtin F. Oxidative stress regulates type 3 deiodinase and type 2 deiodinase in cultured rat astrocytes. *Endocrinology* 149, 3713-3721, (2008).
117. Moreno M., Kaptein E., Goglia F. & Visser T. J. Rapid glucuronidation of tri- and tetraiodothyroacetic acid to ester glucuronides in human liver and to ether glucuronides in rat liver. *Endocrinology* 135, 1004-1009, (1994).
118. Maia A. L., Kim B. W., Huang S. A., Harney J. W. & Larsen P. R. Type 2 iodothyronine deiodinase is the major source of plasma T3 in euthyroid humans. *J Clin Invest* 115, 2524-2533, (2005).
119. Bianco A. C. & Kim B. W. Deiodinases: implications of the local control of thyroid hormone action. *J Clin Invest* 116, 2571-2579, (2006).
120. Heemstra K. A., Soeters M. R., Fliers E., Serlie M. J., Burggraaf J., van Doorn M. B., van der Klaauw A. A., Romijn J. A., Smit J. W., Corssmit E. P. & Visser T. J. Type 2 iodothyronine deiodinase in skeletal muscle: effects of hypothyroidism and fasting. *J Clin Endocrinol Metab* 94, 2144-2150, (2009).
121. Schneider M. J., Fiering S. N., Thai B., Wu S. Y., St Germain E., Parlow A. F., St Germain D. L. & Galton V. A. Targeted disruption of the type 1 selenodeiodinase gene (Dio1) results in marked changes in thyroid hormone economy in mice. *Endocrinology* 147, 580-589, (2006).

122. Cheng S. Y., Leonard J. L. & Davis P. J. Molecular aspects of thyroid hormone actions. *Endocr Rev* 31, 139-170, (2010).
123. Brent G.A. & Larsen P.R. Thyroid hormone regulation of gene expression. *Ann Rev Physiol*, 17-35, (1991).
124. Amma L. L., Campos-Barros A., Wang Z., Vennstrom B. & Forrest D. Distinct tissue-specific roles for thyroid hormone receptors beta and alpha in regulation of type 1 deiodinase expression. *Mol Endocrinol* 15, 467-475, (2001).
125. Lazar M.A., Darling D.S. & Chin W.W. Identification of a rat c-erbA alpha-related protein which binds deoxyribonucleic acid but does not bind thyroid hormone. *Molecular Endocrinology*, 893-901, (1988).
126. Mitsuhashi T. & Nikodem V.M. Alternative splicing generates messages encoding rat c-erbA proteins that do not bind thyroid hormone. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 5804-5808, (1988).
127. Sap J., Munoz A., Damm K., Goldberg Y., Ghysdael J., Leutz A., Beug H. & Vennstrom B. The c-erb-A protein is a high-affinity receptor for thyroid hormone. *Nature* 324, 635-640, (1986).
128. Weinberger C., Thompson C. C., Ong E. S., Lebo R., Gruol D. J. & Evans R. M. The c-erb-A gene encodes a thyroid hormone receptor. *Nature* 324, 641-646, (1986).
129. Lazar M. A. Thyroid hormone receptors: multiple forms, multiple possibilities. *Endocrine Reviews* 14, 184-193, (1993).
130. Tagami T., Yamamoto H., Moriyama K., Sawai K., Usui T., Shimatsu A. & Naruse M. Identification of a novel human thyroid hormone receptor beta isoform as a transcriptional modulator. *Biochem Biophys Res Commun* 396, 983-988, (2010).
131. Pessemesse L., Lepourry L., Bouton K., Levin J., Cabello G., Wrutniak-Cabello C. & Casas F. p28, a truncated form of TRalpha1 regulates mitochondrial physiology. *FEBS Lett* 588, 4037-4043, (2014).
132. Carazo A., Levin J., Casas F., Seyer P., Grandemange S., Busson M., Pessemesse L., Wrutniak-Cabello C. & Cabello G. Protein sequences involved in the mitochondrial import of

- the 3,5,3'-L-triiodothyronine receptor p43. *J Cell Physiol* 227, 3768-3777, (2012).
133. Gomberg-Maitland M. & Frishman W. H. Thyroid hormone and cardiovascular disease. *Am Heart J* 135, 187-196, (1998).
134. Farach-Carson M. C. & Davis P. J. Steroid hormone interactions with target cells: cross talk between membrane and nuclear pathways. *J Pharmacol Exp Ther* 307, 839-845, (2003).
135. Bassett J. H., Harvey C. B. & Williams G. R. Mechanisms of thyroid hormone receptor-specific nuclear and extra nuclear actions. *Mol Cell Endocrinol* 213, 1-11, (2003).
136. Saelim N., John L. M., Wu J., Park J. S., Bai Y., Camacho P. & Lechleiter J. D. Nontranscriptional modulation of intracellular Ca²⁺ signaling by ligand stimulated thyroid hormone receptor. *J Cell Biol* 167, 915-924, (2004).
137. Bergh J. J., Lin H. Y., Lansing L., Mohamed S. N., Davis F. B., Mousa S. & Davis P. J. Integrin alphaVbeta3 contains a cell surface receptor site for thyroid hormone that is linked to activation of mitogen-activated protein kinase and induction of angiogenesis. *Endocrinology* 146, 2864-2871, (2005).
138. Lin H. Y., Sun M., Tang H. Y., Lin C., Luidens M. K., Mousa S. A., Incerpi S., Drusano G. L., Davis F. B. & Davis P. J. L-Thyroxine vs. 3,5,3'-triiodo-L-thyronine and cell proliferation: activation of mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase. *Am J Physiol Cell Physiol* 296, C980-991, (2009).
139. Shih A., Lin H. Y., Davis F. B. & Davis P. J. Thyroid hormone promotes serine phosphorylation of p53 by mitogen-activated protein kinase. *Biochemistry* 40, 2870-2878, (2001).
140. Lin H. Y., Davis F. B., Gordinier J. K., Martino L. J. & Davis P. J. Thyroid hormone induces activation of mitogen-activated protein kinase in cultured cells. *Am J Physiol* 276, C1014-1024, (1999).
141. Davis F. B., Mousa S. A., O'Connor L., Mohamed S., Lin H. Y., Cao H. J. & Davis P. J. Proangiogenic action of thyroid hormone is fibroblast growth factor-dependent and is initiated at the cell surface. *Circulation Research* 94, 1500-1506, (2004).

142. Hiroi Y., Kim H. H., Ying H., Furuya F., Huang Z., Simoncini T., Noma K., Ueki K., Nguyen N. H., Scanlan T. S., Moskowitz M. A., Cheng S. Y. & Liao J. K. Rapid nongenomic actions of thyroid hormone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 14104-14109, (2006).
143. Kinlaw W. B., Schwartz H. L. & Oppenheimer J. H. Decreased serum triiodothyronine in starving rats is due primarily to diminished thyroidal secretion of thyroxine. *J Clin Invest* 75, 1238-1241, (1985).
144. Lado-Abeal J., Romero A., Castro-Piedras I., Rodriguez-Perez A. & Alvarez-Escudero J. Thyroid hormone receptors are down-regulated in skeletal muscle of patients with non-thyroidal illness syndrome secondary to non-septic shock. *Eur J Endocrinol* 163, 765-773, (2010).
145. Lado-Abeal J. Thyroid hormones are needed to sustain "inappropriately" normal TSH during non-thyroidal illness syndrome: a clinical observation in severely ill patients with primary hypothyroidism. *Neuro Endocrinology Letters* 36, (2015).
146. Berry M. J., Grieco D., Taylor B. A., Maia A. L., Kieffer J. D., Beamer W., Glover E., Poland A. & Larsen P. R. Physiological and genetic analyses of inbred mouse strains with a type I iodothyronine 5' deiodinase deficiency. *J Clin Invest* 92, 1517-1528, (1993).
147. Schoenmakers C. H., Pigmans I. G., Poland A. & Visser T. J. Impairment of the selenoenzyme type I iodothyronine deiodinase in C3H/He mice. *Endocrinology* 132, 357-361, (1993).
148. Schneider M. J., Fiering S. N., Pallud S. E., Parlow A. F., St Germain D. L. & Galton V. A. Targeted disruption of the type 2 selenodeiodinase gene (DIO2) results in a phenotype of pituitary resistance to T4. *Mol Endocrinol* 15, 2137-2148, (2001).
149. Rosene M. L., Wittmann G., Arrojo e Drigo R., Singru P. S., Lechan R. M. & Bianco A. C. Inhibition of the type 2 iodothyronine deiodinase underlies the elevated plasma TSH associated with amiodarone treatment. *Endocrinology* 151, 5961-5970, (2010).

150. Peeters R. P., Wouters P. J., Kaptein E., van Toor H., Visser T. J. & Van den Berghe G. Reduced activation and increased inactivation of thyroid hormone in tissues of critically ill patients. *J Clin Endocrinol Metab* 88, 3202-3211, (2003).
151. Boelen A., Kwakkel J., Alkemade A., Renckens R., Kaptein E., Kuiper G., Wiersinga W. M. & Visser T. J. Induction of type 3 deiodinase activity in inflammatory cells of mice with chronic local inflammation. *Endocrinology* 146, 5128-5134, (2005).
152. Boelen A., Kwakkel J. & Fliers E. Beyond low plasma T3: local thyroid hormone metabolism during inflammation and infection. *Endocr Rev* 32, 670-693, (2011).
153. Fliers E., Guldenaar S. E., Wiersinga W. M. & Swaab D. F. Decreased hypothalamic thyrotropin-releasing hormone gene expression in patients with nonthyroidal illness. *J Clin Endocrinol Metab* 82, 4032-4036, (1997).
154. Van den Berghe G., de Zegher F., Baxter R. C., Veldhuis J. D., Wouters P., Schetz M., Verwaest C., Van der Vorst E., Lauwers P., Bouillon R. & Bowers C. Y. Neuroendocrinology of prolonged critical illness: effects of exogenous thyrotropin-releasing hormone and its combination with growth hormone secretagogues. *J Clin Endocrinol Metab* 83, 309-319, (1998).
155. Bartalena L., Bogazzi F., Brogioni S., Grasso L. & Martino E. Role of cytokines in the pathogenesis of the euthyroid sick syndrome. *Eur J Endocrinol* 138, 603-614, (1998).
156. van Haasteren G. A., van der Meer M. J., Hermus A. R., Linkels E., Klootwijk W., Kaptein E., van Toor H., Sweep C. G., Visser T. J. & de Greef W. J. Different effects of continuous infusion of interleukin-1 and interleukin-6 on the hypothalamic-hypophysial-thyroid axis. *Endocrinology* 135, 1336-1345, (1994).
157. Fekete C., Gereben B., Doleschall M., Harney J. W., Dora J. M., Bianco A. C., Sarkar S., Liposits Z., Rand W., Emerson C., Kacsokovics I., Larsen P. R. & Lechan R. M. Lipopolysaccharide induces type 2 iodothyronine deiodinase in the mediobasal hypothalamus: implications for the

- nonthyroidal illness syndrome. *Endocrinology* 145, 1649-1655, (2004).
158. Wittmann G., Harney J. W., Singru P. S., Nouriel S. S., Reed Larsen P. & Lechan R. M. Inflammation-inducible type 2 deiodinase expression in the leptomeninges, choroid plexus, and at brain blood vessels in male rodents. *Endocrinology* 155, 2009-2019, (2014).
159. Arem R., Wiener G. J., Kaplan S. G., Kim H. S., Reichlin S. & Kaplan M. M. Reduced tissue thyroid hormone levels in fatal illness. *Metabolism* 42, 1102-1108, (1993).
160. Mebis L., Debaveye Y., Ellger B., Derde S., Ververs E. J., Langouche L., Darras V. M., Fliers E., Visser T. J. & Van den Berghe G. Changes in the central component of the hypothalamus-pituitary-thyroid axis in a rabbit model of prolonged critical illness. *Crit Care* 13, R147, (2009).
161. Feingold K., Kim M. S., 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* 286, E201-207, (2004).
162. Beigneux A. P., Moser A. H., Shigenaga J. K., Grunfeld C. & Feingold K. R. Sick euthyroid syndrome is associated with decreased TR expression and DNA binding in mouse liver. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 284, E228-236, (2003).
163. Boelen A., van Beeren M., Vos X., Surovtseva O., Belegri E., Saaltink D. J., Vreugdenhil E., Kalsbeek A., Kwakkel J. & Fliers E. Leptin administration restores the fasting-induced increase of hepatic type 3 deiodinase expression in mice. *Thyroid* 22, 192-199, (2012).
164. Nagaya T., Fujieda M., Otsuka G., Yang J. P., Okamoto T. & Seo H. A potential role of activated NF-kappa B in the pathogenesis of euthyroid sick syndrome. *J Clin Invest* 106, 393-402, (2000).
165. Kwakkel J., Wiersinga W. M. & 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* 189, 37-44, (2006).

166. Dellinger R. P., Levy M. M., Rhodes A., Annane D., Gerlach H., Opal S. M., Sevransky J. E., Sprung C. L., Douglas I. S., Jaeschke R., Osborn T. M., Nunnally M. E., Townsend S. R., Reinhart K., Kleinpell R. M., Angus D. C., Deutschman C. S., Machado F. R., Rubenfeld G. D., Webb S. A., Beale R. J., Vincent J. L., Moreno R. & Surviving Sepsis Campaign Guidelines Committee including the Pediatric Subgroup. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2012. *Critical Care Medicine* 41, 580-637, (2013).
167. Stevenson E. K., Rubenstein A. R., Radin G. T., Wiener R. S. & Walkey A. J. Two decades of mortality trends among patients with severe sepsis: a comparative meta-analysis*. *Critical Care Medicine* 42, 625-631, (2014).
168. Poelaert J., Declerck C., Vogelaers D., Colardyn F. & Visser C. A. Left ventricular systolic and diastolic function in septic shock. *Intensive Care Medicine* 23, 553-560, (1997).
169. Landesberg G., Gilon D., Meroz Y., Georgieva M., Levin P. D., Goodman S., Avidan A., Beeri R., Weissman C., Jaffe A. S. & Sprung C. L. Diastolic dysfunction and mortality in severe sepsis and septic shock. *European Heart Journal* 33, 895-903, (2012).
170. Doi K., Leelahavanichkul A., Yuen P. S. & Star R. A. Animal models of sepsis and sepsis-induced kidney injury. *J Clin Invest* 119, 2868-2878, (2009).
171. Cinel I. & Opal S. M. Molecular biology of inflammation and sepsis: a primer. *Critical Care Medicine* 37, 291-304, (2009).
172. Dyson A. & Singer M. Animal models of sepsis: why does preclinical efficacy fail to translate to the clinical setting? *Critical Care Medicine* 37, S30-37, (2009).
173. Livak K. J. & Schmittgen T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25, 402-408, (2001).
174. Bustin S. A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology* 25, 169-193, (2000).
175. Jonklaas J., Bianco A. C., Bauer A. J., Burman K. D., Cappola A. R., Celi F. S., Cooper D. S., Kim B. W., Peeters

- R. P., Rosenthal M. S., Sawka A. M. & American Thyroid Association Task Force on Thyroid Hormone Replacement. Guidelines for the treatment of hypothyroidism: prepared by the american thyroid association task force on thyroid hormone replacement. *Thyroid* 24, 1670-1751, (2014).
176. Acker C. G., Singh A. R., Flick R. P., Bernardini J., Greenberg A. & Johnson, J. P. A trial of thyroxine in acute renal failure. *Kidney International* 57, 293-298, (2000).
177. Mebis L., Paletta D., Debaveye Y., Ellger B., Langouche L., D'Hoore A., Darras V. M., Visser T. J. & Van den Berghe G. Expression of thyroid hormone transporters during critical illness. *Eur J Endocrinol* 161, 243-250, (2009).
178. Peeters R. P., van der Geypen S., Wouters P. J., Darras V. M., van Toor H., Kaptein E., Visser T. J. & Van den Berghe G. Tissue thyroid hormone levels in critical illness. *J Clin Endocrinol Metab* 90, 6498-6507, (2005).
179. Debaveye Y., Ellger B., Mebis L., Van Herck E., Coopmans W., Darras V. & Van den Berghe G. Tissue deiodinase activity during prolonged critical illness: effects of exogenous thyrotropin-releasing hormone and its combination with growth hormone-releasing peptide-2. *Endocrinology* 146, 5604-5611, (2005).
180. Harris A. R., Fang S. L., Vagenakis A. G. & Braverman L. E. Effect of starvation, nutriment replacement, and hypothyroidism on in vitro hepatic T4 to T3 conversion in the rat. *Metabolism* 27, 1680-1690, (1978).
181. Boelen A., Kwakkel J., Wiersinga W. M. & Fliers E. Chronic local inflammation in mice results in decreased TRH and type 3 deiodinase mRNA expression in the hypothalamic paraventricular nucleus independently of diminished food intake. *J Endocrinol* 191, 707-714, (2006).
182. Heuer H. & Visser T. J. Minireview: Pathophysiological importance of thyroid hormone transporters. *Endocrinology* 150, 1078-1083, (2009).
183. Liao X. H., Di Cosmo C., Dumitrescu A. M., Hernandez A., Van Sande J., St Germain D. L., Weiss R. E., Galton V. A. & Refetoff S. Distinct roles of deiodinases on the phenotype of Mct8 defect: a comparison of eight different mouse genotypes. *Endocrinology* 152, 1180-1191, (2011).

184. Trajkovic-Arsic M., Visser T. J., Darras V. M., Friesema E. C., Schlott B., Mittag J., Bauer K. & Heuer H. Consequences of monocarboxylate transporter 8 deficiency for renal transport and metabolism of thyroid hormones in mice. *Endocrinology* 151, 802-809, (2010).
185. Finkel M. S., Oddis C. V., Jacob T. D., Watkins S. C., Hattler B. G. & Simmons R. L. Negative inotropic effects of cytokines on the heart mediated by nitric oxide. *Science* 257, 387-389, (1992).
186. Schulz R., Nava E. & Moncada S. Induction and potential biological relevance of a Ca(2+)-independent nitric oxide synthase in the myocardium. *Br J Pharmacol* 105, 575-580, (1992).
187. Ziolo M. T., Kohr M. J. & Wang H. Nitric oxide signaling and the regulation of myocardial function. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 45, 625-632, (2008).
188. Rudiger A. & Singer M. Mechanisms of sepsis-induced cardiac dysfunction. *Critical Care Medicine* 35, 1599-1608, (2007).
189. Werdan K., Schmidt H., Ebel H., Zorn-Pauly K., Koidl B., Hoke R. S., Heinroth K. & Muller-Werdan U. Impaired regulation of cardiac function in sepsis, SIRS, and MODS. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 87, 266-274, (2009).
190. Pagani F. D., Baker L. S., Hsi C., Knox M., Fink M. P. & Visner M. S. Left ventricular systolic and diastolic dysfunction after infusion of tumor necrosis factor-alpha in conscious dogs. *J Clin Invest* 90, 389-398, (1992).
191. Yokoyama T., Vaca L., Rossen R. D., Durante W., Hazarika P. & Mann D. L. Cellular basis for the negative inotropic effects of tumor necrosis factor-alpha in the adult mammalian heart. *J Clin Invest* 92, 2303-2312, (1993).
192. Hobai I. A., Buys E. S., Morse J. C., Edgecomb J., Weiss E. H., Armoundas A. A., Hou X., Khandelwal A. R., Siwik D. A., Brouckaert P., Cohen R. A. & Colucci W. S. SERCA Cys674 sulphonylation and inhibition of L-type Ca²⁺ influx contribute to cardiac dysfunction in endotoxemic mice, independent of cGMP synthesis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 305, H1189-1200, (2013).

193. Kao Y. H., Chen Y. C., Cheng C. C., Lee T. I., Chen Y. J. & Chen S. A. Tumor necrosis factor- α decreases sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase expressions via the promoter methylation in cardiomyocytes. *Critical Care Medicine* 38, 217-222, (2010).
194. Goldhaber J. I., Kim K. H., Natterson P. D., Lawrence T., Yang P. & Weiss J. N. Effects of TNF- α on $[\text{Ca}^{2+}]_i$ and contractility in isolated adult rabbit ventricular myocytes. *Am J Physiol* 271, H1449-1455, (1996).
195. Gulick T., Chung M. K., Pieper S. J., Lange L. G. & Schreiner G. F. Interleukin 1 and tumor necrosis factor inhibit cardiac myocyte beta-adrenergic responsiveness. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 6753-6757, (1989).
196. Balligand J. L., Ungureanu D., Kelly R. A., Kobzik L., Pimental D., Michel T. & Smith T. W. Abnormal contractile function due to induction of nitric oxide synthesis in rat cardiac myocytes follows exposure to activated macrophage-conditioned medium. *J Clin Invest* 91, 2314-2319, (1993).
197. Arsanjani R., McCarren M., Bahl J. J. & Goldman S. Translational potential of thyroid hormone and its analogs. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 51, 506-511, (2011).
198. Gupta M. P. Factors controlling cardiac myosin-isoform shift during hypertrophy and heart failure. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 43, 388-403, (2007).
199. Machackova J., Barta J. & Dhalla N. S. Molecular defects in cardiac myofibrillar proteins due to thyroid hormone imbalance and diabetes. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 83, 1071-1091, (2005).
200. Kruger M., Sachse C., Zimmermann, W. H., Eschenhagen, T., Klede, S. & Linke, W. A. Thyroid hormone regulates developmental titin isoform transitions via the phosphatidylinositol-3-kinase/ AKT pathway. *Circulation Research* 102, 439-447, (2008).
201. Kruger M. & Linke W. A. Titin-based mechanical signalling in normal and failing myocardium. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 46, 490-498, (2009).

202. Silva J. E. & Bianco S. D. Thyroid-adrenergic interactions: physiological and clinical implications. *Thyroid* 18, 157-165, (2008).
203. Bilezikian J. P. & Loeb J. N. The influence of hyperthyroidism and hypothyroidism on alpha- and beta-adrenergic receptor systems and adrenergic responsiveness. *Endocr Rev* 4, 378-388, (1983).
204. Arioglu E., Guner S., Ozakca I., Altan V. M. & Ozcelikay A. T. The changes in beta-adrenoceptor-mediated cardiac function in experimental hypothyroidism: the possible contribution of cardiac beta3-adrenoceptors. *Molecular and Cellular Biochemistry* 335, 59-66, (2010).
205. Dowell R. T., Atkins F. L. & Love S. Beta-adrenergic receptors, adenylate cyclase activation, and myofibril enzyme activity in hypothyroid rats. *Am J Physiol* 266, H2527-2534, (1994).
206. Revelli J. P., Pescini R., Muzzin P., Seydoux J., Fitzgerald M. G., Fraser C. M. & Giacobino J. P. Changes in beta 1- and beta 2-adrenergic receptor mRNA levels in brown adipose tissue and heart of hypothyroid rats. *Biochem J* 277 (Pt 3), 625-629, (1991).
207. Penela P., Barradas M., Alvarez-Dolado M., Munoz A. & Mayor F. Effect of hypothyroidism on G protein-coupled receptor kinase 2 expression levels in rat liver, lung, and heart. *Endocrinology* 142, 987-991, (2001).
208. Langley R. J., Tsalik E. L., van Velkinburgh J. C., Glickman S. W., Rice B. J., Wang C., Chen B., Carin L., Suarez A., Mohney R. P., Freeman D. H., Wang M., You J., Wulff J., Thompson J. W., Moseley M. A., Reisinger S., Edmonds B. T., Grinnell B., Nelson D. R., Dinwiddie D. L., Miller N. A., Saunders C. J., Soden S. S., Rogers A. J., Gazourian L., Fredenburgh L. E., Massaro A. F., Baron R. M., Choi A. M., Corey G. R., Ginsburg G. S., Cairns C. B., Otero R. M., Fowler V. G., Rivers E. P., Woods C. W. & Kingsmore S. F. An integrated clinico-metabolomic model improves prediction of death in sepsis. *Science Translational Medicine* 5, 195ra195, (2013).
209. Crossland H., Constantin-Teodosiu D., Gardiner S. M., Constantin D. & Greenhaff P. L. A potential role for

- Akt/FOXO signalling in both protein loss and the impairment of muscle carbohydrate oxidation during sepsis in rodent skeletal muscle. *The Journal of Physiology* 586, 5589-5600, (2008).
210. Singer M. The role of mitochondrial dysfunction in sepsis-induced multi-organ failure. *Virulence* 5, 66-72, (2014).
 211. Brealey D., Brand M., Hargreaves I., Heales S., Land J., Smolenski R., Davies N. A., Cooper C. E. & Singer M. Association between mitochondrial dysfunction and severity and outcome of septic shock. *Lancet* 360, 219-223, (2002).
 212. Drosatos K., Drosatos-Tampakaki Z., Khan R., Homma S., Schulze P. C., Zannis V. I. & Goldberg I. J. Inhibition of c-Jun-N-terminal kinase increases cardiac peroxisome proliferator-activated receptor alpha expression and fatty acid oxidation and prevents lipopolysaccharide-induced heart dysfunction. *J Biol Chem* 286, 36331-36339, (2011).
 213. Heather L. C., Cole M. A., Atherton H. J., Coumans W. A., Evans R. D., Tyler D. J., Glatz J. F., Luiken J. J. & Clarke K. Adenosine monophosphate-activated protein kinase activation, substrate transporter translocation, and metabolism in the contracting hyperthyroid rat heart. *Endocrinology* 151, 422-431, (2010).
 214. Kudo N., Barr A. J., Barr R. L., Desai S. & Lopaschuk G. D. High rates of fatty acid oxidation during reperfusion of ischemic hearts are associated with a decrease in malonyl-CoA levels due to an increase in 5'-AMP-activated protein kinase inhibition of acetyl-CoA carboxylase. *J Biol Chem* 270, 17513-17520, (1995).
 215. Goldenthal M. J., Ananthakrishnan R. & Marin-Garcia J. Nuclear-mitochondrial cross-talk in cardiomyocyte T3 signaling: a time-course analysis. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 39, 319-326, (2005).
 216. Handschin C. & Spiegelman B. M. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 coactivators, energy homeostasis, and metabolism. *Endocr Rev* 27, 728-735, (2006).
 217. McClure T. D., Young M. E., Taegtmeier H., Ning X. H., Buroker N. E., Lopez-Guisa J. & Portman M. A. Thyroid hormone interacts with PPARalpha and PGC-1 during

- mitochondrial maturation in sheep heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289, H2258-2264, (2005).
218. Chocron E. S., Sayre N. L., Holstein D., Saelim N., Ibdah J. A., Dong L. Q., Zhu X., Cheng S. Y. & Lechleiter J. D. The trifunctional protein mediates thyroid hormone receptor-dependent stimulation of mitochondria metabolism. *Mol Endocrinol* 26, 1117-1128, (2012).
219. Kahaly G. J. & Dillmann W. H. Thyroid hormone action in the heart. *Endocr Rev* 26, 704-728, (2005).
220. Kinugawa K., Jeong M. Y., Bristow M. R. & Long C. S. Thyroid hormone induces cardiac myocyte hypertrophy in a thyroid hormone receptor alpha1-specific manner that requires TAK1 and p38 mitogen-activated protein kinase. *Mol Endocrinol* 19, 1618-1628, (2005).
221. Hashimoto H., Igarashi N., Miyawaki T. & Sato T. Effects of tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1 beta, and interleukin-6 on type I iodothyronine 5'-deiodination in rat thyroid cell line, FRTL-5. *Journal of Interferon & Cytokine Research : the Official Journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* 15, 367-375, (1995).
222. Ejima K., Layne M. D., Carvajal I. M., Kritek P. A., Baron R. M., Chen Y. H., Vom Saal J., Levy B. D., Yet S. F. & Perrella M. A. Cyclooxygenase-2-deficient mice are resistant to endotoxin-induced inflammation and death. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 17, 1325-1327, (2003).
223. Ratcliffe P. J. From erythropoietin to oxygen: hypoxia-inducible factor hydroxylases and the hypoxia signal pathway. *Blood Purif* 20, 445-450, (2002).
224. Stroka D. M., Burkhardt T., Desbaillets I., Wenger R. H., Neil D. A., Bauer C., Gassmann M. & Candinas D. HIF-1 is expressed in normoxic tissue and displays an organ-specific regulation under systemic hypoxia. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 15, 2445-2453, (2001).
225. Simonides W. S., Mulcahey M. A., Redout E. M., Muller A., Zuidwijk M. J., Visser T. J., Wassen F. W., Crescenzi A., da-Silva W. S., Harney J., Engel F. B., Obregon M. J., Larsen P. R., Bianco A. C. & Huang S. A. Hypoxia-inducible factor

- induces local thyroid hormone inactivation during hypoxic-ischemic disease in rats. *J Clin Invest* 118, 975-983, (2008).
226. Gereben B., Zavacki A. M., Ribich S., Kim B. W., Huang S. A., Simonides W. S., Zeold A. & Bianco A. C. Cellular and molecular basis of deiodinase-regulated thyroid hormone signaling. *Endocr Rev* 29, 898-938, (2008).
227. Van Hoecke M., Prigent-Tessier A. S., Garnier P. E., Bertrand N. M., Filomenko R., Bettaieb A., Marie C. & Beley A. G. Evidence of HIF-1 functional binding activity to caspase-3 promoter after photothrombotic cerebral ischemia. *Molecular and Cellular Neurosciences* 34, 40-47, (2007).
228. Lancel S., Joulin O., Favory R., Goossens J. F., Kluza J., Chopin C., Formstecher P., Marchetti P. & Neviere R. Ventricular myocyte caspases are directly responsible for endotoxin-induced cardiac dysfunction. *Circulation* 111, 2596-2604, (2005).
229. Oliveira-Pelegrin G. R., Basso P. J., Soares A. S., Martinez M. R., Riester K. D. & Rocha M. J. Cleaved caspase-3 expression in hypothalamic magnocellular neurons may affect vasopressin secretion during experimental polymicrobial sepsis. *Journal of Neuroimmunology* 258, 10-16, (2013).
230. Verga Falzacappa C., Mangialardo C., Madaro L., Ranieri D., Lupoi L., Stigliano A., Torrisi M. R., Bouche M., Toscano V. & Misiti S. Thyroid hormone T3 counteracts STZ induced diabetes in mouse. *PloS One* 6, e19839, (2011).
231. Laoag-Fernandez J. B., Matsuo H., Murakoshi H., Hamada A. L., Tsang B. K. & Maruo T. 3,5,3'-Triiodothyronine down-regulates Fas and Fas ligand expression and suppresses caspase-3 and poly (adenosine 5'-diphosphate-ribose) polymerase cleavage and apoptosis in early placental extravillous trophoblasts in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 89, 4069-4077, (2004).

