



Universidad de Buenos Aires
Facultad de Farmacia y Bioquímica



***“Alteraciones del desarrollo en el hipotiroidismo
congénito y su relación con el aumento perinatal
del óxido nítrico mitocondrial.”***

María Eugenia Elguero

**Tesis presentada para optar al título de
Doctor de la Universidad de Buenos Aires**

Director: Prof. Dra. María Cecilia Carreras

Laboratorio de Metabolismo del Oxígeno
Hospital de Clínicas “José de San Martín”. INIGEM - CONICET
INFIBIOC - Facultad de Farmacia y Bioquímica - UBA

Año 2014



Universidad de Buenos Aires
Facultad de Farmacia y Bioquímica



***“Alteraciones del desarrollo en el hipotiroidismo
congénito y su relación con el aumento perinatal
del óxido nítrico mitocondrial.”***

María Eugenia Elguero

**Tesis presentada para optar al título de
Doctor de la Universidad de Buenos Aires
en el área Ciencias de la Salud**

Director: Prof. Dra. María Cecilia Carreras

Laboratorio de Metabolismo del Oxígeno
Hospital de Clínicas “José de San Martín”. INIGEM - CONICET
INFIBIOC - Facultad de Farmacia y Bioquímica - UBA

Año 2014

RESUMEN

Alteraciones del desarrollo en el hipotiroidismo congénito y su relación con el aumento perinatal del óxido nítrico mitocondrial.

Las hormonas tiroideas (TH) coordinan muchas respuestas fisiológicas y procesos madurativos durante el desarrollo; sin embargo, todavía no se conocen claramente los mecanismos por los cuales su deficiencia conduce a alteraciones en el mismo. Las mitocondrias juegan un papel esencial en la fisiología celular como productoras de energía y actuando como organelas de señalización, y su actividad y estructura se ve altamente regulada por la acción de TH. En trabajos previos en nuestro laboratorio, observamos que el hipotiroidismo condujo a un confinamiento de la enzima óxido nítrico sintasa neuronal en mitocondrias y que el aumento del óxido nítrico (NO) mitocondrial se asocia a la disminución del metabolismo basal observado en el hipotiroidismo. Además de los cambios metabólicos producidos por el NO, el aumento matricial del mismo en mitocondria conduce a un aumento en los niveles de oxidantes y la activación de vías de señalización asociadas a proliferación, diferenciación o muerte celular. La hipótesis de este trabajo se basa en que la modulación positiva de la mtNOS en el desarrollo de la rata hipotiroidea y el concomitante aumento de NO mitocondrial podrían estar ligados a las alteraciones en el crecimiento observadas frente a la deficiencia de hormonas tiroideas durante el periodo perinatal, que en humanos, resulta en el retardo físico y mental, conocido como cretinismo. En esta tesis nos propusimos analizar la utilización mitocondrial de NO como causa de alteraciones moleculares y fenotípicas definitivas en el hipotiroidismo neonatal. Nuestros estudios en hígado y cerebro de rata confirmaron que el hipotiroidismo congénito conduce a una modificación del patrón de expresión de la enzima óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS) y su confinamiento mitocondrial respecto al desarrollo normal. Demostramos que en el hígado de rata, el hipotiroidismo alteró el metabolismo oxidativo a través del incremento de NO mitocondrial y estimuló la transcripción temprana de mitofusina 2 y tardía de Drp1, proteínas involucradas en la dinámica mitocondrial pero no afectó su localización mitocondrial. En este órgano la respuesta que ejerce el NO sobre la actividad de los complejos de la cadena respiratoria y la producción de oxidantes parece estar más relacionada a un efecto metabólico generado por la deficiencia de HT.

Resumen

Comprobamos que en el desarrollo perinatal del cerebro de rata, el incremento de NO mitocondrial se efectúa de forma temprana, y a través de la producción de ROS, aumenta la expresión de la proteína de fisión mitocondrial Drp1, la activación de JNK en la etapa perinatal tardía y la liberación de citocromo *c* al citosol que iniciaría la apoptosis por la vía mitocondrial. Estos resultados nos condujeron al análisis de apoptosis y proliferación hipocampales mediante las técnicas histológicas de BrdU y TUNEL donde se comprobó que el hipotiroidismo congénito generó una modificación del patrón apoptótico/proliferativo en el hipocampo de cerebro consecuente temporalmente con la liberación de citocromo *c*. En los días 5 y 30 perinatales los animales hipotiroideos presentaron aumento en la apoptosis hipocampal respecto al desarrollo eutiroides. Comprobamos que el tratamiento de los mismos con el inhibidor de la producción de NO fue capaz de revertir tanto la apoptosis observada a nivel mitocondrial como la muerte de células de hipocampo. Finalmente, ensayando la expresión de genes de estrés involucrados en el establecimiento de la memoria y aprendizaje comprobamos que se ven modificados por el hipotiroidismo en forma NO dependiente, y que finalmente algunos de los trastornos conductuales del hipotiroidismo como ansiedad y memoria espacial pueden ser regulados por el NO y revertidos por el tratamiento con inhibidor. Estos hallazgos nos permiten establecer nuevos mecanismos de acción para el NO mitocondrial en vías de señalización específicas durante el desarrollo perinatal en el hipotiroidismo congénito.

Palabras claves: hipotiroidismo congénito, óxido nítrico sintasa neuronal, mitocondria, estrés oxidativo, desarrollo perinatal.

A mi familia

Agradezco a la facultad Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires por brindarme la oportunidad de desarrollar este trabajo de Tesis de Doctorado.

Agradezco a mis directores, la Dra. María Cecilia Carreras, y el Dr. Juan José Poderoso por permitirme formar parte de su grupo de trabajo, brindarse cada día ante mis inquietudes y no permitir que el camino de la ciencia me amedrente, por estar para mí hasta el último día durante esta experiencia, pero especialmente por permitirme crecer.

A mis padres por ser mi apoyo incondicional, porque me enseñaron que para el amor no hay sacrificios. A través de su amor, cariño y sabiduría me brindan la voluntad, confianza, apoyo y principios que me constituyen día a día como persona y para los cuales no alcanzan las palabras de agradecimiento.

A Belen, Fede y Joe por ser mi familia, amigos y brindar siempre aliento en todo momento y porque gracias a ellos siento que estoy cerca de mi hogar.

A mis tíos y primos que siempre estuvieron compartiendo mis éxitos y que a pesar de la distancia continúan brindando su apoyo y confianza a través de las experiencias vividas y consejos.

A mis amigas Yael, Andru, Femi y Nadia por compartir consejos y vivencias en los momentos buenos y no tan buenos, por estar siempre a mi lado. Gracias a ellas cambiar y crecer no cuesta tanto.

Al grupo del laboratorio Paola, Belky, Mariana, Ines, Juani, Jorge, Analía, Silvia por vivir juntos estos primeros pasos en el camino de la ciencia.

A mis amigos que surgieron en diferentes etapas de mi vida Hernán, Juanjo, Nico, Luciano, Martín, la Pato, Gonza, el Negro, Checho, Mario y Clau, los que aportaron alegrías, tristezas pero por sobretodo con los que compartimos esta linda experiencia que es la vida.

Gracias a mis compañeros más recientes en este trayecto Juani, Juampi, Lucho, Bocha, Pedro, Maru, Diana, Karen y Pauli que bancaron toda mi ansiedad, dudas, alegrías y porque me brindaron en cada momento una visión diferente de las cosas.

Agradezco a Pachi, Ariel, Marcelo, Ana y Victor por su generosidad para compartir conocimientos, aparatos y reactivos que permitieron desarrollar este trabajo.

Agradezco a los chicos del bioterio Ceci, Caro, Diego y Alma por asistirme siempre y brindar la mejor predisposición en todo momento.

Agradezco al Dr. Medina y a Ceci por cooperar con sus conocimientos, ensayos y entusiasmo para este trabajo.

Quiero Agradecer finalmente todas las personas que participaron de uno u otro modo en el desarrollo y culminación de este momento tan importante en mi vida.

Gracias!!

PUBLICACIONES

ABREVIATURAS

INTRODUCCIÓN

1	HORMONAS TIROIDEAS.....	6
1.1	Síntesis de Hormonas.	7
1.2	Acción periférica de las hormonas tiroideas	8
1.3	Efectos no-genómicos de las hormonas tiroideas.....	10
1.4	Hormonas tiroideas y la mitocondria	11
1.5	Hormonas tiroideas y el desarrollo.....	14
1.5.1	HT en la función y desarrollo hepático.....	14
1.5.2	HT en el desarrollo del cerebro	16
1.6	Patología causada por alteraciones de HT: Hipotiroidismo Congénito.....	17
1.6.1	Hipotiroidismo congénito. Metimazol como modelo.	19
2	LA MITOCONDRIA.....	20
2.1	Estructura mitocondrial	20
2.1.2	Fosforilación oxidativa y la cadena de transporte de electrones.	23
2.1.3	Translocación de proteínas a mitocondria.....	26
2.2	La mitocondria, producción y eliminación de ROS	28
2.3	Regulación mitocondrial de la muerte celular.....	29
2.4	Dinámica mitocondrial.....	31
2.4.1	Fusión mitocondrial.....	31
2.4.2	Fisión mitocondrial	32
2.4.3	Coordinación de fisión y fusión mitocondrial en la fisiología celular.....	33
3	EL ÓXIDO NÍTRICO	34

3.1	Efecto de NO en la mitocondria.....	36
3.2	Las óxido nítrico sintasas.	38
3.2.1	Estructura de las NOS.....	39
3.2.2	Isoformas de NOS.....	40
3.2.3	Inhibidores de nNOS.....	43
3.2.4	Localización mitocondrial de NOS.....	44
3.2.5	mtNOS, NO y desarrollo neuronal.....	44
3.2.6	Regulación de plasticidad sináptica mediada por NO.....	45
4	ESTRUCTURA DEL CÓRTEX CEREBRAL, PLASTICIDAD SINÁPTICA Y ESTABLECIMIENTO DE LA MEMORIA.	46
4.1	Potenciación a largo plazo y componentes principales.....	48
4.2	Objetivo general.....	53
5	MATERIALES.....	55
5.1	Reactivos y drogas.....	55
5.2	Anticuerpos.....	55
5.3	Oligonucleótidos.....	57
6	MÉTODOS.....	58
6.1	Modelos animales de experimentación.....	58
6.1.1	Generación de los grupos de trabajo.....	58
6.1.2	Generación del grupo Hipotiroideo + L-NAME por infusión continua.....	59
6.2	Extracción de sangre para determinación de TSH.....	60
6.3	Obtención de homogenatos, citosol y mitocondrias purificadas.....	60
6.3.1	Tratamiento de la fracción mitocondrial con proteinasa K.....	62
6.4	Cuantificación de proteínas por el Método de Bradford.	62
6.4.1	Preparación del reactivo.....	62
6.4.2	Curva de calibración.....	62

6.4.3	Ensayo de muestras, controles y <i>pooles</i>	62
6.5	SDS-PAGE y Western blot para detección de proteínas	63
6.6	Ensayos Enzimáticos	64
6.7	Aislamiento de células de hígado y cerebro	66
6.7.1	Aislamiento de hepatocitos.....	66
6.7.2	Aislamiento de células de cerebro	67
6.8	CITOMETRÍA DE FLUJO.....	67
6.8.1	Producción mitocondrial de NO	67
6.8.2	Producción intracelular de especies reactivas del oxígeno (ROS).....	67
6.9	Ensayos de inmunohistoquímica (ICH) en cortes de cerebro parafinados.	68
6.9.1	Ensayo de detección para BrdU.	68
6.9.2	Ensayo de TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase–mediated dUTP Nick end labelling)	69
6.10	EXTRACCIÓN DE ARN.....	69
6.11	RT-PCR	70
6.12	PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR)	70
6.12.1	Corrida electroforética en gel de agarosa 2%	73
6.13	Ensayos de Conducta	73
6.13.1	Open field	74
6.13.2	Grip Strength test	75
6.14	Análisis Estadísticos.....	75
7	EFFECTO DEL METIMAZOL DURANTE LA GESTACIÓN Y EL CRECIMIENTO PERINATAL COMO MODELO DE HIPOTIROIDISMO CONGÉNITO	77
7.1	Niveles de TSH séricos	77
7.2	Crecimiento perinatal	78
8	PATRÓN DE EXPRESIÓN, LOCALIZACIÓN y ACTIVIDAD DE nNOS EN EL DESARROLLO HIPOTIROIDEO DEL HÍGADO DE RATA.....	79

8.1.1	Análisis de la expresión de nNOS en fracciones subcelulares de hígado.....	79
8.1.2	Evaluación de la actividad y producción de NO en el hígado.....	81
8.2	EFFECTOS DEL NO EN METABOLISMO Y FUNCIÓN MITOCONDRIAL PRODUCIDOS DURANTE DESARROLLO HEPÁTICO DE ANIMALES HIPOTIROIDEOS.	83
8.2.1	Actividad de los complejos I y IV de la cadena respiratoria mitocondrial en el hígado	84
8.2.2	Determinación de la producción de superóxido.	85
8.2.3	Tasa de producción de H ₂ O ₂	86
8.3	ALTERACIONES EN LA DINÁMICA MITOCONDRIAL HEPÁTICA PRODUCIDAS POR EL AUMENTO MITOCONDRIAL DE NO.	87
8.3.1	Análisis de la regulación transcripcional de proteínas de fusión/fisión en mitocondrias de hígado.....	88
8.3.2	Estudio de la presencia de las proteínas de dinámica mitocondrial en mitocondrias de hígado.....	90
9	REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN, LOCALIZACIÓN SUBCELULAR Y ACTIVIDAD DE nNOS EN EL DESARROLLO HIPOTIROIDEO DEL CEREBRO	92
9.1.1	Análisis de la expresión de nNOS en fracciones subcelulares de cerebro	92
9.1.2	Evaluación de la actividad y producción de NO en el cerebro hipotiroideo.....	94
9.2	Consecuencia del aumento de NO mitocondrial en la producción de oxidantes a través de la cadena de transporte de electrones.....	97
9.2.1	Actividad del complejo I y IV de la cadena respiratoria mitocondrial	97
9.2.2	Producción de anión superóxido.....	98
9.2.3	Tasa de producción de H ₂ O ₂	100
9.3	Cambios de la dinámica mitocondrial producidos por el hipotiroidismo en el desarrollo post-natal del cerebro.....	102
9.3.1	Análisis de la regulación transcripcional de proteínas de fusión/fisión mitocondrial.	102
9.3.2	Expresión de proteínas de dinámica mitocondrial.....	104

9.4	Efecto del NO perinatal en el patrón apoptótico/proliferativo del cerebro: alteración en el desarrollo hipotiroideo.....	106
9.4.1	Regulación de la activación de JNK y Erk por el estado tiroideo.....	106
9.4.2	Influencia del NO en la asociación mitocondrial Bax y Bcl-2 y liberación citosólica de cit c.....	109
9.4.3	Regulación de apoptosis y proliferación en el desarrollo del cerebro, consecuencias del hipotiroidismo.....	111
9.5	Alteraciones producidas por el NO en genes del metabolismo mitocondrial involucrados en LTP durante la etapa perinatal.....	114
9.6	Evaluación de alteraciones conductuales provocadas por el hipotiroidismo congénito a través del aumento post-natal del NO.....	115
10	DISCUSIÓN.....	122
11	CONCLUSIONES.....	137
11.1	Direcciones futuras.....	138
12	REFERENCIAS.....	141

PUBLICACIONES

He participado en trabajos que dieron origen a las siguientes publicaciones de gran relevancia para este trabajo de tesis.

1. Gonzalez AS, Elguero ME, Finocchietto P, Holod S, Romorini L, Miriuka SG, Peralta JG, Poderoso JJ, Carreras MC. "Abnormal mitochondrial fusion-fission balance contributes to the progression of experimental sepsis". *Free Radic Res.* (2014) 48(7):769-83.

2. Antico Arciuch VG, Elguero ME, Poderoso JJ, Carreras MC. "Mitochondrial regulation of cell cycle and proliferation". *Antioxid Redox Signal.* (2012) 16(10):1150-80.

ABREVIATURAS

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADNmt: ADN mitocondrial

AMPA: receptores de ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico

ARN: ácido ribonucleico

ARNm: ARN mensajero

Atf4: *Activating factor 4*

ATP: adenosine tri-fosfato

Bcl xL: Linfoma de células B extra largo

Bcl-2: proteína 2 de linfoma de células B

BSA: suero albumino bovino

CA1: *cornu amonis*, region del hipocampo

CAMKII: Calcio calmodulina quinasa II

cDNA: ADN copia

Chp1: *chromodomain protein 1*, proteína tipo calcineurina

DNasa: deoxiribonucleasa

dNTP: deoxinucleótido trifosfato

Drp-1: *Dynammin-related protein 1*

ECL: quimioluminiscencia aumentada

EDTA: etilen-diaminetra-acido acético

EGF: factor de crecimiento epidérmico

EGTA: Ácido etilenglicoltetraacético

EI: Espacio Intermembrana

ERK1/2: Extracelullar Regulated Protein Kinase

ETC: cadena de transporte de electrones

FACS: fluorescence-activated cell sorter analysis

H₂O₂: Peróxido de hidrógeno

HSP: proteínas de shock térmico

HT: Hormonas tiroideas

IF: inmunofluorescencia

IGF: factor de crecimiento tipo insulina

IP: inmunoprecipitación
JNK: c-jun quinasa N terminal
L-NAME: N^G-nitro-L-arginina metil ester
LTD: depresión sináptica de largo plazo
LTP: potenciación sináptica de largo plazo
MEM: Membrana externa mitocondrial
Mfn: Mitofusina
MIM: Membrana interna mitocondrial
MM: Matriz mitocondrial
MMI: Metimazol
MnSOD: SOD mangánica
MOMP: *mitochondrial outer membrane permeabilization*
NF-κB: factor nuclear kappa B
NMDAR: receptores de N-metil-D-aspartato
nNOS: Óxido nítrico sintasa neuronal
NO: óxido nítrico
NOS: óxido nítrico sintetasa
NRF: Factor respiratorio nuclear
Nrf2: Nuclear factor erythroid 2–related factor 2
O₂⁻: Superóxido
OH: Hidroxilo
ONOO⁻: Peroxinitrito
Opa1: Optic atrophy 1
PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida
PBS: buffer fosfato salino
PCR: reacción en cadena de la polimerasa
PGC-1: PPARγ coactivator-1
PI3K: fosfatidilinositol 3 quinasa
PKC: Proteína Kinasa C
PKG: proteína quinasa G
PMSF: Fenil metil sulfonil fluoruro
RC3: (NRG) proteína neurogranina

ROS: especies reactivas del oxígeno
SD: desviación estándar
SDS: duodecil sulfato de sodio
SNC: Sistema nervioso central
SOD: Superóxido dismutasa
T3: tri-iodotironina
T4: tiroxina
TAE: tris acetato EDTA
Tfam: Factor de transcripción mitocondrial A
Tg: tiroglobulina
TNF: Factor de necrosis tumoral
TOM: Translocasa de membrana externa
TPO: tioperoxidasa
TRAP: *Tartrate-resistant acid phosphatase*
TREs: elementos de respuesta a hormona tiroidea
TRs: receptores de hormonas tiroideas
TSH: Hormona estimuladora de la tiroides
UCP: Proteína desacoplante
UQ: Ubiquinona
UQH: Ubisemiquinona
UQH: Ubiquinol
VDAC: Canal aniónico dependiente de voltaje

INTRODUCCIÓN

1 HORMONAS TIROIDEAS

Las hormonas tiroideas (HT) son hormonas secretadas por la glándula tiroides. Esta es una glándula endócrina que se compone de dos lóbulos separados por un istmo, se encuentra situada en la parte anterior de la tráquea entre el segundo y tercero anillo traqueal. La estructura funcional de la tiroides es el folículo tiroideo, el cual consta de una estructura hueca formada por una pared simple de células epiteliales llamadas células foliculares o tirocitos. El contenido del folículo tiroideo se denomina coloide, y está compuesto principalmente por una gran glicoproteína (>600KDa) llamada tiroglobulina, la cual constituye el principal reservorio de hormonas tiroideas. La actividad de la glándula tiroides está finamente modulada. Uno de los reguladores más importantes del funcionamiento de esta glándula lo constituye la hormona estimuladora de la tiroides (TSH), producida en la glándula pituitaria anterior, que es muy sensible a los cambios séricos de HT y ejerce un *control negativo* sobre la producción de la misma.(Stathatos 2012).

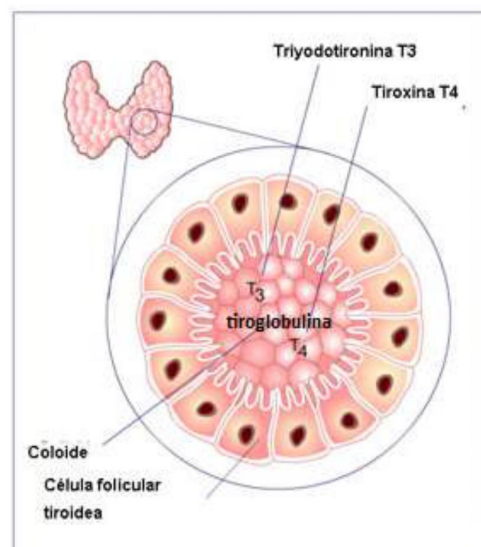


Figura 1. Estructura de la glándula tiroides, vista del folículo tiroideo

Introducción

Existen dos tipos principales de hormonas tiroideas, tiroxina y tri-iodotironina, llamadas T4 y T3 respectivamente, de acuerdo a la cantidad de átomos de Iodo que poseen en su estructura. En circunstancias normales el 90% de hormona tiroidea en nuestro cuerpo es T4 mientras que sólo un 10% es T3.

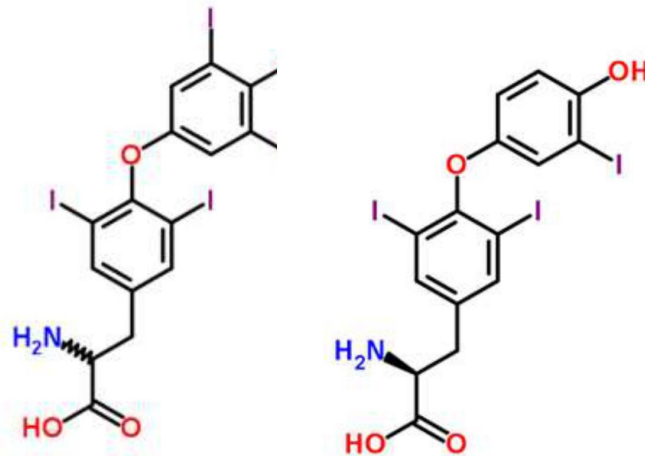


Figura 2. Estructura química de las hormonas tiroideas, tiroxina (izquierda); triiodotironina (derecha).

1.1 Síntesis de Hormonas.

La síntesis de T3 y T4 se realiza en 6 pasos fundamentales:

Captación del yoduro y concentración: en esta etapa los tirocitos acumulan yoduro mediante un mecanismo de transporte activo, utilizando un intercambiador Na-I que permite cargar dentro del folículo una cantidad 100 veces superior al yodo extracelular. Este transporte es principalmente regulado por la hormona TSH.

Síntesis de tiroglobulina (Tg): esta es la etapa donde la Tg se sintetiza como un precursor de 300KDa que luego se dimeriza y glicosila. Una vez formada, la tiroglobulina es liberada a la luz del folículo para incorporarse en el coloide.

Oxidación del yoduro: a continuación dentro de las células, los iones de I⁻ son oxidados por la enzima tiroperoxidasa (TPO) situada en la membrana apical de los tirocitos. Esta enzima también interviene en los pasos subsecuentes de formación de HT.

Introducción

Iodación de los residuos de tirosina (organificación): en un paso siguiente los iones yoduro previamente oxidados se unen a una transferasa que reacciona con las moléculas de tirosina que forman parte de la Tg, incorporando el yodo en una molécula orgánica. El producto inicial es la mono-yodotirosina (MIT) formándose luego la di-yodotirosina (DIT).

Acoplamiento de las yodotirosinas para formar tironinas: esta corresponde a la etapa en que las tirosinas son yodadas en las posiciones 3 y/o 5 del anillo fenólico de la tirosina, en un lugar (3-mono-yodotirosina) o en dos (3,5-di-yodotirosina), y dos tirosinas vecinas se acoplan a través de un puente de oxígeno por el plegamiento de la molécula de tiroglobulina, para formar las hormonas activas

- di-yodotirosina (DIT) + di-yodotirosina : tetra-yodotironina (tiroxina, T4).

- di-yodotirosina + mono-yodotirosina (MIT): triyodotironina (T3).

Proteólisis de la tiroglobulina y liberación de T4 y T3 hacia la sangre: Finalmente las hormonas tiroideas se almacenan dentro de la molécula de tiroglobulina. Las células foliculares captan tiroglobulina desde el coloide central por un proceso de endocitosis, controlado por TSH. Se unen a lisosomas cuyas enzimas digieren la tiroglobulina, liberando T3 y T4 hacia el líquido extracelular.

1.2 Acción periférica de las hormonas tiroideas

Las HT circulan en la sangre unidas a proteínas *transportadoras* como Globulina fijadora de tiroxina (TBG, de sus siglas en inglés Thyroid Bound Globulin), transtiretina (TTR) o albúmina, y su internalización en la célula se postula que es por difusión pasiva; pero recientemente se descubrieron transportadores, entre ellos los transportadores monocarboxilato 8 y 10 (MCT8, MCT10 respectivamente) que parecen ser de relevancia en este proceso (Schussler, 2000) (Heuer and Visser, 2009).

La T4 es considerada pro-hormona ya que para su actividad biológica necesita ser convertida a T3, en una reacción catalizada por selenoenzimas llamadas desiodinasas. Existen tres isoformas de desiodinasa, D1, D2 y D3, tejido-específicas y que catalizan

Introducción

diferentes tipos de conversión (Jassam, Visser et al. 2011). D1 cataliza la conversión de T4 a T3 y su contraparte inactiva rT3. La deiodinasa D2 convierte la T4 sólo a su forma T3 activa y junto con D3 regula la disponibilidad de T3 por sus receptores nucleares (Stathatos 2012).

Las HT ejercen sus efectos en los tejidos blanco principalmente uniéndose y activando receptores nucleares específicos (TRs), los cuales una vez activados se unen a secuencias específicas llamadas Elementos de Respuesta a Hormonas Tiroideas (TREs), que se encuentran dentro de promotores de genes respondedores a HT, ejerciendo así su respuesta principal que es la genómica.

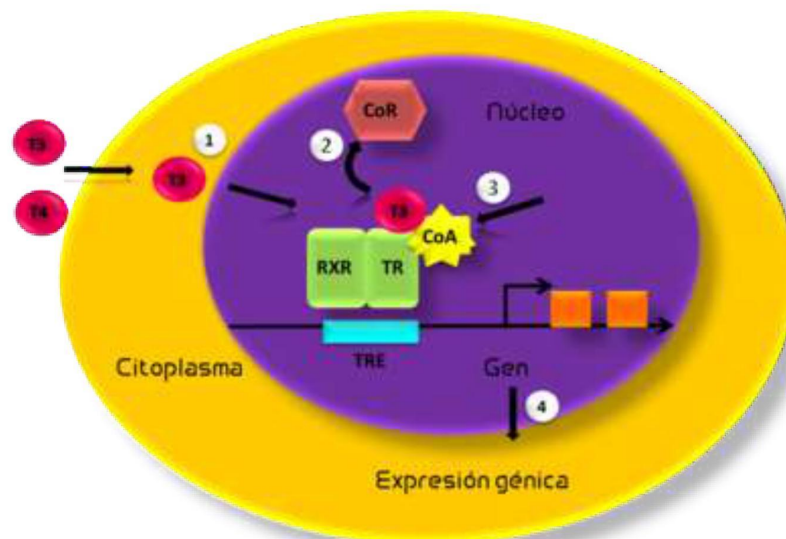


Figura 3. Acción de los TRs sobre los genes blanco de las hormonas tiroideas. CoR: co-represor, CoA: co-activador, RXR receptor de ácido retinoico.

Existen dos subtipos principales de TRs codificados en genes separados: TR α y TR β ; sin embargo, existen varias isoformas, tales como TR α 1, TR α 2, TR β 1, TR β 2 producidas como variantes de *splicing* y que son tejido- específicas o varían de acuerdo al estadio del desarrollo (Kuiper, Enmark et al. 1996). Estos receptores comparten junto con hormonas esteroideas y ácido retinoico, una superfamilia de receptores de hormonas nucleares que

Introducción

constan estructuralmente de 4 dominios comunes: un dominio amino-terminal (A/B), un dominio central de unión al ADN que posee dos “dedos de zinc”, una región bisagra con la secuencia de localización nuclear y un dominio de unión a ligando (LBD) también involucrado en dimerización, trans-activación y, actualmente se sabe que es el dominio que interactúa con co-represores o co-activadores (Cheng, Leonard et al. 2010).

El mecanismo básico de acción es diferente al de las hormonas esteroideas ya que los TRs, aun sin estar unidos a hormona, pueden interactuar con sus TREs, uniendo a su vez co-represores que impiden el ensamblaje de la maquinaria de transcripción en el promotor, proceso conocido como represión basal. En presencia de T3 los TR actúan con co-activadores para unirse a sus TRE y activar la transcripción de sus genes blanco (Figura 3). Recientemente se descubrió que en ausencia de T3 los TR pueden unirse a co-represores e inhibir la transcripción de algunos genes negativamente regulados; el mecanismo parece estar dado por un remodelamiento de la cromatina que involucra histona deacetilasas (HDAC) (Kim, Park et al. 2014).

1.3 Efectos no-genómicos de las hormonas tiroideas

Es ampliamente conocido que las hormonas tiroideas además de ejercer sus efectos a través de los receptores nucleares activando la transcripción de genes blanco, tienen efectos no nucleares. La mayoría de los efectos no-genómicos provienen de la acción observada en citoplasma, membrana plasmática, citoesqueleto y organelas (Daury, Busson et al. 2001, Cheng, Leonard et al. 2010).

Algunos de los receptores que median las respuestas no genómicas de las HT presentes en membrana plasmática pertenecen a la familia de integrinas $\alpha v \beta 3$. A través de la unión de T3 a estas integrinas, la quinasa ERK1/2 (Extracelullar Regulated Protein Kinase) puede transducir señales de angiogénesis, proliferación en tumores, así como también dirigir la migración de células gliales y neuronales (Bergh, Lin et al. 2005, Farwell, Dubord-Tomasetti et al. 2006).

Dentro de las acciones de TR en citoplasma se encuentra la activación de la quinasa PI3K (PhosphatidyInositide 3-kinase) en respuesta a T3, como señal de supervivencia en

células neuronales (Cao, Kambe et al. 2009, Moeller and Broecker-Preuss 2011) y también la modulación de los niveles de Ca^{2+} a través de la Ca^{2+} -ATPasa, mediado por unión de T3 a la membrana plásmica (Galo, Unates et al. 1981, Del Viscovo, Secondo et al. 2012).

1.4 Hormonas tiroideas y la mitocondria

Una de las funciones principales de las HT es regular la utilización de energía en la célula, y es por ello que la mitocondria constituye un blanco de acción para estas hormonas. Pero además de regular el metabolismo y la generación de ATP, la mitocondria regula señales de supervivencia y proliferación o muerte entre otras, y es por eso que a través de esta organela, las HT pueden regular una amplia variedad de procesos en la célula y durante el desarrollo.

Un aspecto a considerar es que cuando se analiza el papel de HT sólo es considerado el efecto de T3; sin embargo, existen otros metabolitos de iodotironinas como T4, rT3 y T2 (3-5 diiodotiroinina) que ejercen su acción en forma no genómica. Un ejemplo de ello lo constituye el incremento de la actividad de la ATP sintasa F_1/F_0 y de la síntesis de cardiolipina estimulada por administración de T2 en hígado de rata (Cavallo, Gnoni et al. 2011). Por otra parte, al menos un 40% de las funciones mitocondriales son reguladas de acuerdo al tejido específico en que las mismas residen; por lo tanto, los efectos de HT también varían de acuerdo a los diferentes tejidos, siendo en general los más afectados, aquellos tejidos con un alto rendimiento energético y metabólico, como hígado, músculo esquelético y corazón. En hígado, se conoce el efecto de las HT sobre la expresión de subunidades tanto nucleares como mitocondriales de los complejos I – IV de la cadena respiratoria (Sheehan, Kumar et al. 2004), pero asimismo se observó que en el córtex cerebral el aumento en los niveles de T3 incrementa la transcripción y actividad de los complejos I y III (Martinez, del Hoyo et al. 2001). De esta manera, las HT a través del aumento en los complejos de la cadena respiratoria modulan el consumo de oxígeno mitocondrial y el metabolismo basal (Franco et al., 2006).

La producción de ATP es controlada en la mitocondria y está acoplada a la fosforilación oxidativa, la cual ocurre en la cadena respiratoria mitocondrial. Sin embargo,

Introducción

cuando se incrementa el consumo de oxígeno, producto del aumento en T3, se produce una fuga de protones, la cual genera calor en detrimento del ATP. Otro de los efectos de T3 que contribuye a la producción de calor y aumento de la tasa metabólica es, como se mencionó anteriormente, el aumento en la expresión de proteínas desacoplantes (abreviado "UCP", del inglés "uncoupling protein"), transportadores de la membrana interna mitocondrial cuya función es la disipación controlada de protones, este aumento es regulado por HT a través de un efecto no genómico y regula la termogénesis en el tejido adiposo en respuesta a T3 (Brand, 2005).

Estos son los efectos conocidos de HT sobre la tasa metabólica y la producción de calor. Sin embargo, otra de las formas en que las HT pueden regular el metabolismo energético es por medio de la mitocondriogénesis. Así, la expresión de genes blanco implicados en biogénesis puede inducirse de tres maneras principales (Figura 3):

1- Las HT unen TR nucleares y a través del reconocimiento de los TRE, regulan la expresión de genes nucleares involucrados en la biogénesis. Un ejemplo lo constituye el gen de la cadena α de la ATP sintasa en hígado, la cual se observó, aumenta un 50% por tres días de tratamiento con T3 (Silvestri, Moreno et al. 2006).

2- Las HT tienen un efecto rápido en biogénesis ya que unen TR presentes en la mitocondria. Actualmente se conocen dos TRE localizados en la región del genoma mitocondrial conocida como D-loop, los cuales sirven como promotores para un factor de replicación mitocondrial que a su vez es factor de transcripción nuclear, Tfam (del inglés, mitochondrial transcription factor). También codifican los ARN de 12s y 16s, impactando directamente sobre la expresión de genes mitocondriales (Wrutniak, Cassar-Malek et al. 1995). Las TH podrían actuar con estos TRE a través de su unión con TR α 1 que pierden el dominio N-terminal y son importados a mitocondria.

3- Se sintetizan factores intermediarios (vía TRE), los cuales entran al núcleo y regulan un segundo tipo de genes blanco de HT. Las investigaciones en estas respuestas vinieron de dos efectos no esperados ante la administración de T3: el primero fue una activación de genes blanco que poseen TRE en tiempos menores a los esperados para un efecto genómico, y el segundo fue una activación luego de 24 hs pero de genes que no poseen

Introducción

TRE. De este modo, se encontraron dos tipos de factores intermediarios; en el caso de respuesta rápida de genes que sí poseen TRE, se comprobó que las quinasas activadas por mitógeno (MAPKs, Mitogen Activated Protein Kinase) pueden modificar post-transcripcionalmente ciertos TR y transportarlos al núcleo rápidamente. En el segundo caso, se descubrió que ciertos factores, como Nrf-1, Nrf-2 y PGC1 alfa, se transcriben por acción de TH para luego entrar al núcleo y estimular la biogénesis mitocondrial (Davis, Shih et al. 2000).

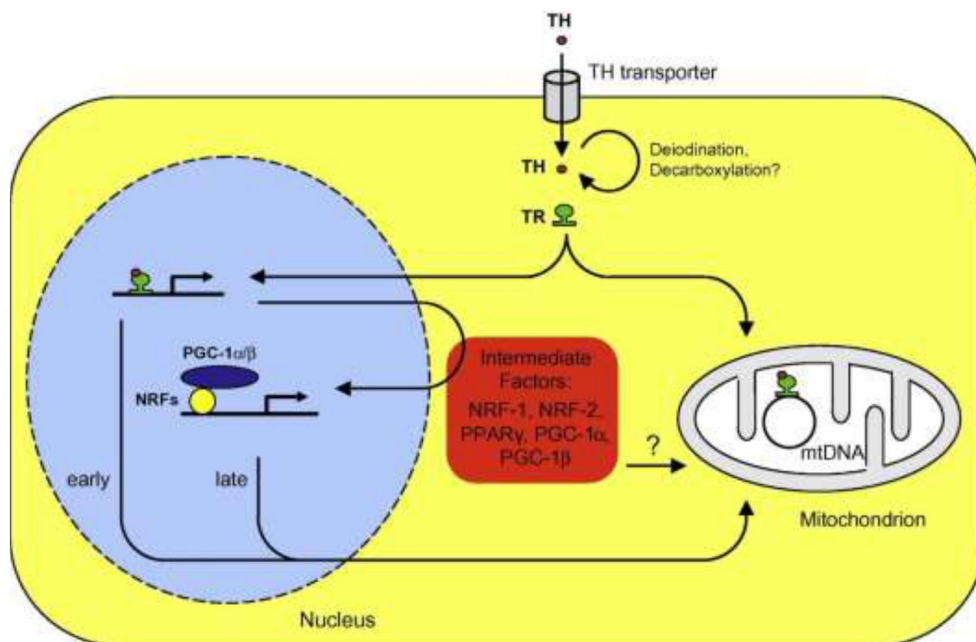


Figura 4. Esquema de las vías de activación de genes asociados a biogénesis mitocondrial a través de TRs nucleares o mitocondriales. Se observa el ingreso citoplasmático de HT y la unión a su receptor; una vez formado el complejo, se observa el direccionamiento a mitocondria (derecha) y la unión al ADN mitocondrial para estimular directamente la replicación, o el importe nuclear y la activación en dos etapas, temprana y tardía. Esta última a través de la expresión de factores intermediarios como el factor respiratorio nuclear NRF, o PGC1 α , entre otros.

1.5 Hormonas tiroideas y el desarrollo

La acción de HT es fundamental no sólo en el metabolismo sino también durante el desarrollo; en mamíferos, el mismo puede dividirse en dos etapas de acuerdo a la regulación ejercida por las HT: el desarrollo embrionario o temprano, y la etapa post-natal en la que todavía se produce la maduración de los órganos. Ésta última etapa considerada período post-embrionario abarca desde unas semanas antes hasta varias después del nacimiento.

Durante el desarrollo embrionario, la glándula tiroides se desarrolla tempranamente, (semana 12 en mamíferos) pero los niveles de T3 no aumentan sino hasta cuatro semanas antes del nacimiento (Shi, 2009). A pesar de esto, la expresión de TRs y deiodinasas comienza entre la segunda y tercera semana del desarrollo embrionario (Lein, Hawrylycz et al. 2007). Si bien durante esta etapa temprana las HT maternas juegan un importante papel durante el desarrollo, fuerte evidencia sugiere que en ausencia de HT los receptores sin ligandos (aporeceptores) reprimen la transcripción de genes blancos a través de los co-represores NCoR y SMRT (Cheng, Leonard et al. 2010), así como también estimulan la transcripción génica de genes blancos para aporeceptores, conformando un modelo de desarrollo complejo, que es notable en ciertos tejidos tales como el sistema nervioso.

En la etapa post-natal, por otra parte, tienen lugar un gran número de procesos tales como la maduración del epitelio intestinal, el cambio en el tipo y la producción de hemoglobina, la maduración de la estructura y fisiología pulmonar, el aumento en los niveles de albúmina sérica, y la reestructuración del sistema nervioso central, incluido el cerebro, y el sistema periférico. Todos estos cambios ocurren en presencia de elevados niveles plasmáticos de HT y es éste el período en donde se producen las alteraciones del desarrollo observadas en el cretinismo en humanos.

1.5.1 HT en la función y desarrollo hepático

Como se mencionó previamente la función de las HT es vital durante el desarrollo embrionario y neonatal y la disrupción severa de las mismas en el hígado, dirige a un

Introducción

conjunto de cambios permanentes en la estructura y función del órgano. El hígado cumple dos funciones esenciales en la etapa temprana de vida que lo constituyen un órgano blanco de la acción de HT; por un lado, su papel metabólico, que persiste incluso en el organismo adulto, y por otro, durante la vida fetal es uno de los microambientes encargados de la hematopoyesis, que comienza en el saco embrionario en el día gestacional 7 y se traslada en el día 11 al hígado fetal.

Durante el período embrionario E11 se observó que la disrupción de la proteína TRAP (del inglés, Tartrate-resistant acid phosphatase) la cual ensambla complejos co-activadores y los une a TRs, conduce a necrosis hepática en ratones, mostrando anomalías en la diferenciación de megacariocitos y en la trombopoyesis que favorecen la hemorragia. A su vez, este impedimento de activación transcripcional dirigida por TRs, que ocurre como consecuencia del bloqueo de TRAP, inhibe la maduración de progenitores eritroides, y como resultado se genera policitemia hepática, en la cual la superproducción de eritrocitos nucleados en el hígado fetal conduce finalmente a hemorragia y necrosis impidiendo la viabilidad embrionaria y la embriogénesis (Landles, Chalk et al. 2003).

Posteriormente, durante la etapa neonatal, las HT en el hígado continúan la maduración y preparación de este órgano para el procesamiento de nutrientes y sus funciones metabólicas, Y participan en la diferenciación celular. Los mayores efectos del hipotiroidismo se evalúan en el día 15 post-natal, donde la deficiencia en HT disminuye la expresión de un grupo de factores de transcripción conocidos como C/EBP (del inglés, CCAAT-enhancer-binding proteins) y disminuye en un 70% la producción de la proteína LAP (del inglés, Liver-enriched transcriptional activator protein) involucrada en la diferenciación de hepatocitos y enzimas hepáticas (Menendez-Hurtado, Vega-Nunez et al. 1997). También actúan como reguladores de la homeostasis celular del órgano modulando la supervivencia y muerte celular en el mismo. Se observó que el hipotiroidismo aumenta la expresión del gen Nr4a1, el cual es activado también por TNF-alfa, e induce muerte celular en hepatocitos en el estadio P15 (post-natal 15), el cual es

directamente reprimido mediante el co-represor N-CoR en presencia de HT (Dong, Yauk et al. 2007).

1.5.2 HT en el desarrollo del cerebro

Las HT tienen su efecto principal en cerebro durante la etapa fetal, pero también en el período neonatal. La deficiencia de HT debido a causas genéticas o deficiencia de iodo, genera retraso mental y defectos neurológicos. Algunas de las principales alteraciones relacionadas con déficit de HT se producen en el crecimiento axonal y en la arborización dendrítica de neuronas del cortex visual y auditivo, del hipocampo y cerebelo; también disminuye la migración en células de la capa granular en cerebelo y de células de Purkinje. Otro de los efectos de HT en el desarrollo del sistema nervioso central (SNC) es la maduración de los oligodendrocitos, que es mediada por TR α 1, ya que la ablación de estos receptores disminuye el número de oligodendrocitos maduros; este fenómeno en roedores ocurre enteramente en la etapa post-natal (Yen, 2001).

La ontogenia de las isoformas de TRs sugiere que cada una de ellas regula la transcripción específica de genes blanco. Por ejemplo, durante el desarrollo fetal temprano, la mayoría de los receptores presentes en cerebro son TR α y unen principalmente T3 materna, mientras que los TR β son imperceptibles pero incrementan su expresión 40 veces inmediatamente después del nacimiento, y tienen su máxima expresión durante los primeros días post-natales, el tiempo en el que comienza la producción de T3 neonatal (Strait, Schwartz et al. 1990; Bradley, Towle et al. 1994).

Paralelamente, si bien las HT maternas juegan un papel fundamental durante la etapa fetal, desde la décima semana de gestación las concentraciones de T3 materna en cerebro son elevadas, en contraste con otros órganos donde hay mayormente T4. En esta semana, los niveles de T3 en el cortex cerebral coinciden con la actividad elevada de la deodinaasa (2 D2); en contraste, en cerebelo los niveles de T3 son bajos y es la actividad de D3 la elevada (la cual como vimos anteriormente regula la disponibilidad tisular de T3). De este modo, antes de la producción de HT fetal, la actividad de las diferentes deiodinasas en los

tejidos aseguran el balance apropiado de receptores libres o unidos a ligando (Bernal and Morte, 2013).

A pesar de la importancia de los TRs en el desarrollo del SNC son pocos los genes directamente regulados por HT. En 1992, (Farsetti, Desvergne et al. 1992) demostraron que el gen de la mielinización MBP es directamente regulado por HT e identificó un TRE cercano al promotor. Las HT regulan una gran variedad de genes responsables de varias funciones celulares en el cerebro, tales como glutamina sintasa, Proteína Kinasa C (PKC), Neurogranina RC3, prostaglandina D2 sintasa y algunas proteínas de matriz como tenascina. También la proteína 2 de las células de Purkinje (Pcp2) se halla bajo control directo de HT.

1.6 Patología causada por alteraciones de HT: Hipotiroidismo Congénito

Actualmente se conocen un conjunto de desórdenes relacionados a HT, los cuales corresponden a una amplia variedad de afecciones clínicas y subclínicas que involucran un funcionamiento anómalo de la glándula tiroidea, o un efecto alterado de la acción hormonal en los tejidos blanco. En general, pueden producirse por:

- Producción anómala de TSH (tirotropina) o TRH (hormona liberadora de TSH)
- Resistencia de los tejidos blanco a los efectos de TH
- Producción disminuida de TSH o TRH

Las dos primeras causas se definen como anomalías con elevada producción de HT y niveles alterados, normales o altos de TSH. Mientras que la última se caracteriza por bajos niveles de TH con producción baja o alta de TSH. Dentro de estas últimas patologías la más frecuente es el Hipotiroidismo Congénito, con una incidencia global de 1 en 3,000 a 4,000 recién nacidos.

El hipotiroidismo congénito se define como la situación resultante de una disminución congénita de la actividad biológica tisular de las hormonas tiroideas, bien por producción deficiente, ya sea a nivel hipotálamo-hipofisario (hipotiroidismo central), o a nivel tiroideo (hipotiroidismo primario o tiroideo), o bien por resistencia a su acción o alteración de su

Introducción

transporte en los tejidos diana (hipotiroidismo periférico). En la Tabla 1 se resumen las bases de los trastornos causantes del hipotiroidismo.

Los efectos generales del hipotiroidismo son la disminución del consumo de oxígeno, de la tasa metabólica basal y de la tasa de proliferación (Moro y col., 2004). Sin embargo, el efecto de mayor importancia durante el desarrollo está asociado con el retraso mental irreversible y varios grados de anomalías neurológicas resultado de la deficiencia de HT, que ocurre como consecuencia de los efectos celulares neurales en los que interviene esta hormona, exponiendo como ejemplo más claro el síndrome neurológico del cretinismo, donde los principales efectos se generan en la etapa fetal media y durante las primeras semanas postnatales. De esta manera, es preciso conocer los aspectos generales y mecanismos del aprendizaje y formación del conocimiento durante el desarrollo en donde se ven involucradas las HT.

H.C. Hipotálamo-hipofisario	Permanente	Déficit de TRH: esporádico	
		Deficiencia aislada de TSH:	Esporádica Genética: genes: TRH-R (β TSH)
		Panhipopituitarismo	
	Transitorio	Nacimiento prematuro Madre con E. Graves	
H.C. primario (tiroideo)	Permanente	Disgenesias tiroideas	Agenesia, hipoplasia, ectopia
		Dishormonogénesis	Insensibilidad a TSH Captación-transporte de yodo Defectos organificación del yodo Defectos tiroperoxidasa: gen TPO Defectos síntesis de tiroglobulina Defectos de des-iodación
	Transitorio	Exceso de yodo Drogas antitiroideas Déficit de yodo Ac. antitiroideos	
H.C. Periférico		Resistencia a HT: gen TR β	
		Alteración del transporte celular de HT: gen MCT8	

Tabla 1. Clasificación etiológica del hipotiroidismo congénito.

1.6.1 Hipotiroidismo congénito. Metimazol como modelo.

El 1-metil-2-mercaptoimidazol (metimazol o MMI) es una droga que inhibe la síntesis de las hormonas tiroideas en la glándula tiroides (Cooper, 1984) y es usado para tratar pacientes con hipertiroidismo de Graves (tiroiditis autoinmune que eleva los niveles de HT). En investigaciones que requieren el uso de animales de experimentación, el metimazol es ampliamente utilizado para desarrollar modelos de hipotiroidismo (Petrovic, Cvijic et al. 2001; Balaban, Nemoto et al. 2005; Ferreira, Lima et al. 2005; Kumar, Sinha et al. 2006; Vadaszova, Hudecova et al. 2006; Leal, Pantaleao et al. 2007). Este compuesto es una tionamida que contiene un grupo sulfhidrilo y un motivo tiourea dentro de una estructura heterocíclica (Figura 5).

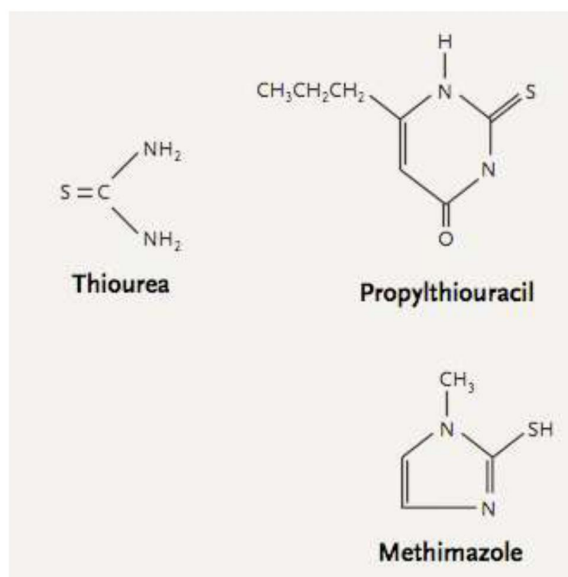


Figura 5. Estructura química de drogas anti-tiroideas, utilizadas para inhibir la actividad de TPO.

La droga es captada por la glándula tiroides por ser un anión similar al yodo. En la glándula, inhibe la actividad de la tiroperoxidasa (TPO) y por lo tanto bloquea la iodación

de los residuos tirosina y el acople de iodotirosinas para formar iodotironinas (Cooper 1984).

2 LA MITOCONDRIA

Las mitocondrias son entre otras, las organelas más conspicuas del citoplasma celular y se encuentran en casi todas las células eucariotas, son autorreplicantes y producen la mayor parte de la energía (ATP) que necesita la célula para sus funciones. Fueron descritas por primera vez en 1890 por el patólogo alemán Altmann quien las consideró como pequeñas unidades de funcionamiento autónomo a las que llamó *bioblastos* e incluso llegó a pensar que podían ser bacterias. Fue Carl Benda, en 1898, quien observando la tinción de las mismas con cristal violeta las nombró mitocondrias. Entre 1890-1960 varias disciplinas se unieron en la observación de estas organelas hasta la comprensión de su papel en la oxidación de sustratos para proporcionar energía, la respiración celular, los fenómenos físicos y químicos que ocurren en el transporte a través de una membrana, el acoplamiento quimiosmótico de la fosforilación oxidativa, su estructura compleja a través de la microscopía electrónica y la teoría endosimbionte de su origen. Esta última, propuesta por Lynn Margulis en 1981, postula que los ancestros de las mitocondrias fueron bacterias de vida independiente que desarrollaron la capacidad de utilizar el oxígeno eficientemente.

2.1 Estructura mitocondrial

Las mitocondrias tienen un tamaño promedio de entre 0.5-0.7 μm de ancho por 7 μm o más de longitud, y si bien son de forma alargada, pueden adoptar diferentes morfologías, desde granulares a filamentosas, que varían según el tipo celular, o el estado funcional de la célula. Sin embargo, su estructura básica es la misma. De acuerdo al modelo de Palade (1952), las mitocondrias se componen de dos membranas, que difieren en composición y propiedades físico-químicas. Estas son la **membrana mitocondrial**

Introducción

interna y **externa**, las cuales delimitan dos compartimentos: un **espacio intermembrana** y el compartimento interno denominado **matriz**. La membrana interna, a su vez proyecta expansiones laminares o tubulares hacia la matriz denominadas **crestas**. Actualmente, avances en tomografía electrónica permitieron hacer reconstrucciones 3D y observar que la membrana interna se une en la base de las crestas por “uniones de las crestas” (*cristae junctions*) (Renken, Siragusa et al. 2002) de manera que, si bien el interior de la cresta posee espacio intermembrana, se produce una compartimentalización estructural y funcional.

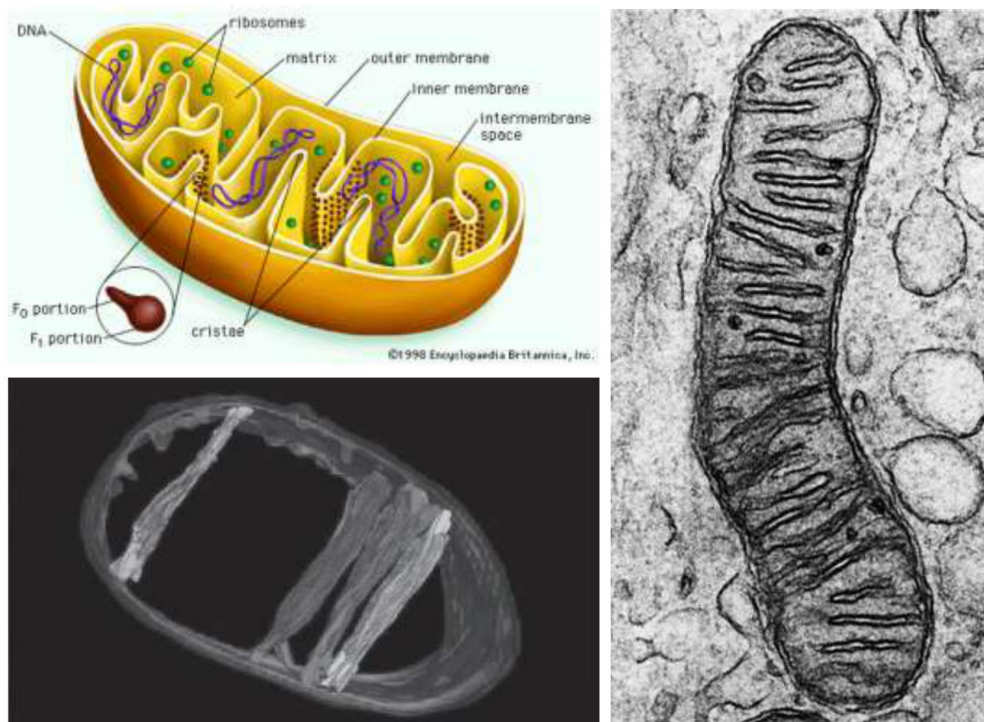


Figura 6. Estructura de las mitocondrias. Esquema y descripción de los componentes (arriba izq.). Reconstrucción 3D proveniente de tomografías electrónicas (abajo izq.). Mitocondria de fibroblasto en microscopía electrónica (derecha).

2.1.1.1 Membrana Externa mitocondrial (MEM)

Introducción

Se compone de fosfolípidos y proteínas, una de las principales es una proteína de transporte llamada *porina*. La membrana externa es permeable a iones, nutrientes, ATP y ADP, entre otros.

2.1.1.2 Membrana Interna mitocondrial (MIM)

La membrana interna al igual que la membrana externa se compone de fosfolípidos y proteínas, pero presenta como componente un fosfolípido especial llamado cardiolipina que contribuye a la permeabilidad selectiva de la membrana. Sólo pueden atravesar esta membrana el oxígeno, CO₂ y agua, por lo que dispone de numerosos transportadores. Además se hallan en esta membrana el complejo ATP-sintasa y la cadena de transporte de electrones. En ella tiene lugar un proceso principal de la función mitocondrial, que es la **fosforilación oxidativa**.

Tanto en membrana externa como en membrana interna hay proteínas que forman los complejos necesarios para importar aquellas proteínas mitocondriales que son sintetizadas en el citosol. En la membrana externa se encuentra el complejo de translocación de membrana externa (TOM) y en la membrana interna el complejo de translocación de membrana interna (TIM).

2.1.1.3 Espacio Intermembrana (EI)

Entre ambas membranas queda delimitado un espacio compuesto de un líquido similar al citosol; tiene una alta concentración de protones como resultado del bombeo de los mismos por los complejos enzimáticos de la cadena respiratoria. En él se localizan diversas enzimas que intervienen en la transferencia del enlace de alta energía del ATP, como la adenilato quinasa o la creatina quinasa.

2.1.1.4 Matriz mitocondrial (MM)

Es el espacio delimitado por la membrana interna, de composición menos acuosa que el citosol, se sitúan la mayoría de los complejos enzimáticos asociados al metabolismo mitocondrial que no son de membrana y se encuentra el genoma mitocondrial, una

Introducción

molécula de ADN bicatenario circular capaz de autoreplicarse. En la matriz, a su vez, tienen lugar el ciclo de ácidos tricarboxílicos, la oxidación de ácidos grasos, carbohidratos, biosíntesis de urea y del grupo hemo, así como también la síntesis de proteínas dependientes del genoma mitocondrial, entre otros procesos.

2.1.1.5 Genoma mitocondrial

Cada mitocondria contiene entre 2 y 10 moléculas de ADN (mtDNA) en la matriz (Wiesner y col., 1992) o incluso unidos a la membrana interna. El genoma mitocondrial humano, de 16 kpb, es circular y está compuesto por dos cadenas, una pesada rica en guanina (H) y otra liviana rica en citosina (L). Codifica para 13 proteínas que son subunidades de los complejos de la cadena de transporte de electrones, 22 ARNs de transferencia y 2 ARNs ribosomales (rRNA), 12SrRNA y 16SrRNA.

2.1.2 Fosforilación oxidativa y la cadena de transporte de electrones.

Toda la energía de nuestro cuerpo es utilizada en forma de ATP; en organismos superiores, la glucólisis y el ciclo de ácidos tricarboxílicos generan una baja cantidad de energía. De este modo, la célula es capaz de producir el 90% del ATP utilizado, a través del proceso de fosforilación oxidativa (OXPHOS). Éste se basa en enzimas redox situadas en la membrana interna mitocondrial que catalizan la reducción del oxígeno a H₂O. Los complejos enzimáticos acoplados constituyen lo que se conoce como complejos de la cadena de transporte de electrones, y mediante sucesivas reacciones de oxido-reducción que involucran transferencia de electrones, translocan protones desde la matriz al espacio intermembrana estableciendo un gradiente electroquímico. El gradiente electroquímico tiene dos componentes uno eléctrico formado por el potencial de membrana ($\Delta\psi$) y otro químico producido por el gradiente transmembrana de protones. Finalmente, la energía potencial de este gradiente es liberada cuando translocan pasivamente los protones hacia la matriz a través de las subunidades F₁-F₀ del complejo ATPasa y la energía liberada impulsa la conversión de ADP en ATP brindando un enlace de alta energía (Schaffer & Suleiman, 2010).

Introducción

La cadena de transporte de electrones (ETC) situada en la membrana interna se compone de cuatro complejos principales, un quinto complejo o el llamado ATPasa, y moléculas o proteínas accesorias. Evidencia reciente sugiere que estos complejos, a pesar de difundir por la membrana, se encuentran agrupados en “supercomplejos” que podrían brindar mayor estabilidad y funcionalidad a los complejos individuales (Dudkina, Eubel et al. 2005).

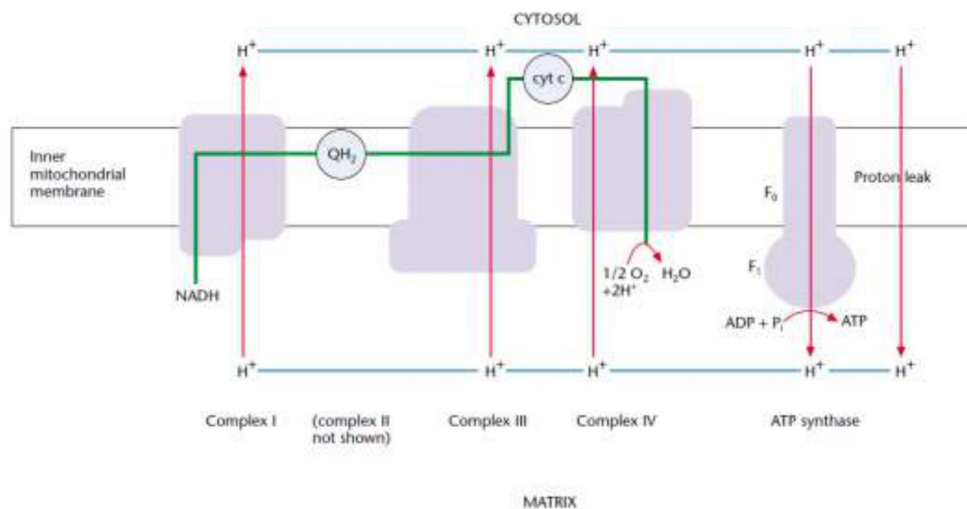


Figura 7. Cadena de transporte de electrones. El flujo de electrones a través de los complejos I, III y IV genera un flujo de protones desde la matriz hacia el espacio intermembrana que al atravesar el complejo ATPasa para disipar el gradiente, impulsa la síntesis de ATP a partir de ADP + Pi.

Complejo I (*NADH-ubiquinona reductasa*): comienza las reacciones de transferencia, cataliza la transferencia de electrones desde el NADH (proveniente del ciclo de ácidos tricarboxílicos) a la ubiquinona a una tasa de 250 nmoles/min.mg prot. En vertebrados, comprende 49 subunidades y su peso molecular es alrededor de 900 KDa. El complejo utiliza la energía liberada en la transferencia de electrones para bombear 4 H⁺ al espacio intermembrana por cada dos electrones que transfiere. Un inhibidor clásico del CI es la rotenona que impide el paso de los electrones a la ubiquinona.

Introducción

Complejo II (*succinato deshidrogenasa*): si bien es el segundo complejo de entrada en la secuencia de transporte, produce poca energía y no es capaz de bombear protones al espacio intermembrana. Está formado por cuatro subunidades y contiene flavina adenina dinucleótido (FAD), centros hierro-azufre y un grupo hemo (Sun y col., 2005). Además de contribuir en la cadena de transferencia permitiendo el pasaje de electrones desde el succinato a la ubiquinona, participa en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (Figura 9).

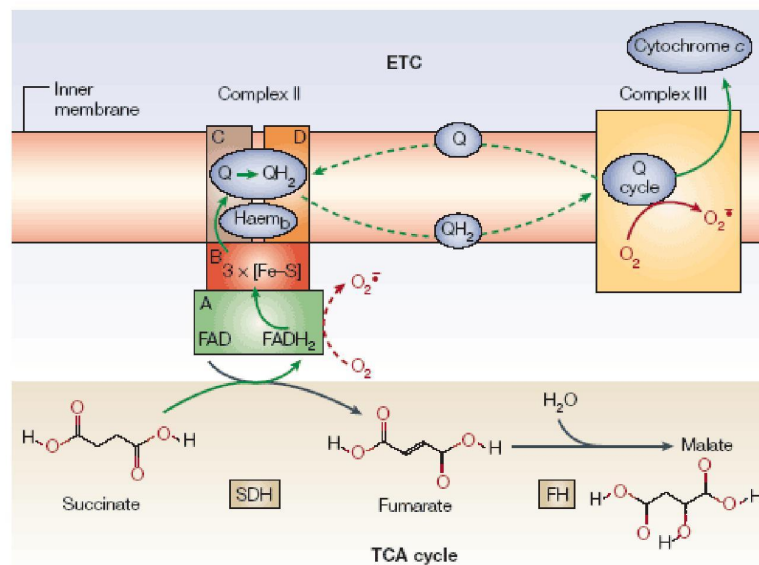


Figura 8. Esquema de los complejos II y III. Complejo II (izquierda) con sus cuatro subunidades y la conversión del succinato a fumarato reduciendo la ubiquinona (Q) a través de su flavoproteína; los electrones son cedidos al complejo III (derecha), reduciendo los citocromos presentes en su centro.

Complejo III (*ubiquinol-citocromo c óxidoreductasa*): Este complejo toma los electrones desde el ubiquinol (generado por la reducción de la ubiquinona por los complejos I y II) y los transfiere al citocromo c reduciéndolo. Se compone de 12 subunidades, y posee dos grupos hemo, uno de alto potencial (+90 mV) y otro de bajo potencial (-30 mV) y uno dos ubiquinoles. Cataliza el bombeo de protones con una

Introducción

estequiometría de $4\text{H}^+/2\text{e}^-$. (Figura 9). Presenta dos inhibidores químicos bien conocidos, antimicina y mixotiazol.

Complejo IV (citocromo oxidasa): Cataliza la transferencia de electrones entre el citocromo *c* y el O_2 , que es el último aceptor de la cadena, y en este paso se reduce a H_2O , produciendo el bombeo de $2\text{H}^+/2\text{e}^-$. El complejo IV se compone, en mamíferos, de 13 subunidades, 3 de ellas codificadas por el mtDNA. Tiene como inhibidores principales el cianuro y la azida que reaccionan con el grupo hemo a_3 ; el CO, en cambio, compite con el O_2 por la unión al complejo de manera reversible. Los tres son inhibidores directos del transporte de electrones.

Complejo V (ATP sintasa): Este complejo utiliza el gradiente de protones generado por la cadena de transporte de electrones como fuerza motriz para la generación de ATP, pero de manera inversa puede bombear protones a la membrana interna e expensas de la hidrólisis de ATP. Se compone de 3 subunidades principales, F_0 es la subunidad anclada en la membrana interna y a través de la cual fluyen los protones. F_1 es la subunidad hidrofílica que se expone hacia la matriz, con actividad catalítica y sitios de unión a ADP. Estas dos fracciones se hallan unidas por un tallo que se compone de dos estructuras paralelas (Figura 9).

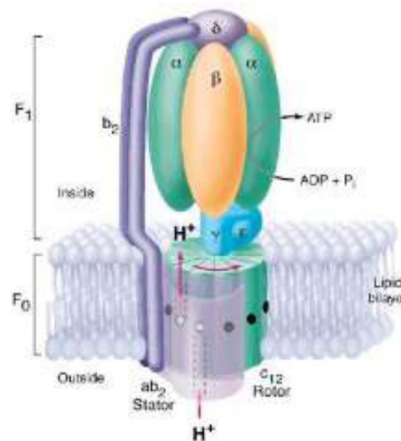


Figura 9. Esquema que muestra las subunidades del complejo ATPasa.

2.1.3 Translocación de proteínas a mitocondria.

Introducción

La mitocondria contiene más de 1000 proteínas diferentes, la mayoría de las cuales son importadas desde el citosol. Las proteínas cuyo destino final es la mitocondria, poseen secuencias que las hacen blanco de una compleja maquinaria de importe, que incluye chaperonas que despliegan y pliegan proteínas, complejos de translocación en membrana externa (TOM) e interna (TIM), moléculas chaperonas que facilitan el pasaje de las proteínas por estos complejos y, para aquellas proteínas cuyo destino final es la matriz mitocondrial, un complejo de chaperonas que utiliza ATP como fuerza motriz para “tirar” de la proteína hacia la matriz y facilitar su repliegado.

Hay dos tipos principales de señales de importe, por un lado aquellas proteínas precursoras que poseen una pre-secuencia clásica de direccionamiento mitocondrial en su extremo N-terminal, la cual es proteolíticamente removida; y por otro lado, son los precursores que no poseen señales de clivaje sino que presentan una secuencia interna.

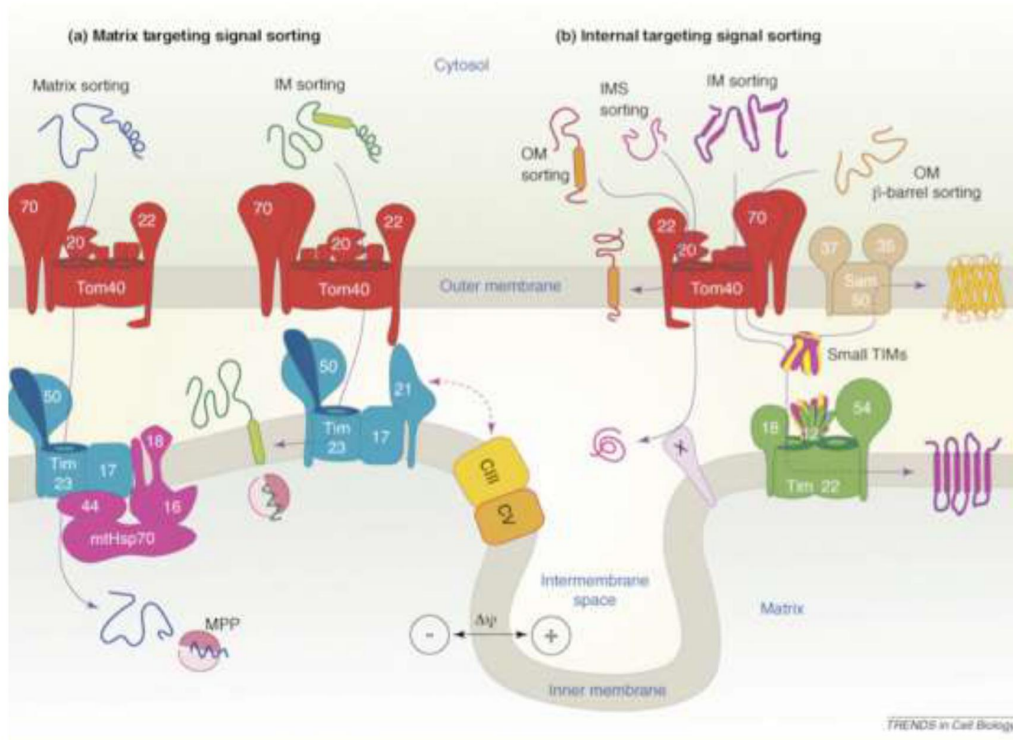


Figura 10. Esquema de la translocación de proteínas a mitocondria. Los precursores proteicos son guiados hacia su localización mitocondrial: membrana externa (ME), espacio

intemembrana (IMS), membrana interna (MI) o matriz. En rojo se detallan los componentes del complejo TOM, en celeste, TIM23 y en verde TIM22. En rosa se destacan mtHsp70 y Tim44. La asociación de Tim21 a Tim23 promueve la integración de proteínas a MI, probablemente en un proceso asistido por los complejos III y V de la cadena de transporte de electrones (CIII y CIV respectivamente). Baker y col., 2007

2.2 La mitocondria, producción y eliminación de ROS

Las especies reactivas del oxígeno (ROS) son moléculas inestables derivadas del O_2 que pueden fácilmente oxidar a otras proteínas. La mayoría de ROS intracelulares derivan del anión superóxido (O_2^-), el cual es generado por la reducción de un electrón del O_2 . El O_2^- luego es convertido a peróxido de hidrógeno (H_2O_2) por las superóxido dismutasas (SOD) (Farrugia and Balzan, 2012).

Durante la respiración el O_2^- se produce en la ETC por reducción incompleta del O_2 . En presencia de sustratos y bajos niveles de ADP, la cadena de transporte se encuentra altamente reducida y es mayor la probabilidad del paso de electrones hacia el O_2 (Balaban, Nemoto et al. 2005). Las mitocondrias poseen 8 sitios capaces de generar O_2^- , los sitios principales de producción son el sitio de unión a flavina en el complejo I y la subunidad IIIQo (en el complejo III), esta última lo libera hacia el espacio intermembrana (Brand 2010). Sin embargo, tanto en la mitocondria como en el citosol, existen enzimas antioxidantes capaces de dismutar el O_2^- a H_2O_2 . El 70-80 % del O_2^- es vectorialmente liberado en la matriz mitocondrial donde la enzima MnSOD cataliza su dismutación a peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Giulivi, Boveris et al. 1995). El H_2O_2 difunde a través de las membranas mitocondriales donde las enzimas antioxidantes catalasa y glutatión peroxidasa (GPx) lo descomponen a H_2O . De esta manera, los niveles de ROS mitocondriales son un balance entre la tasa de producción por la ETC y la actividad de las enzimas antioxidantes.

Si bien elevados niveles de ROS están asociados a patologías como diabetes, neurodegeneración, envejecimiento, trastornos inflamatorios e incluso cáncer (Tal, Sasai et al. 2009; Hekimi, Lapointe et al. 2011) determinados niveles pueden actuar como

indicadores celulares de cambio, favorecer la adaptación celular a condiciones de estrés o incluso promover respuestas como proliferación o diferenciación (Sena and Chandel 2012). De esta manera el balance entre producción mitocondrial de ROS y su eliminación pueden dirigir el destino celular (Gunter, Yule et al. 2004; Patwari and Lee 2007; Chandel 2010, Finkel 2011; Tait and Green 2012).

2.3 Regulación mitocondrial de la muerte celular

Evidencia reciente sugiere que además de su función primordial en la síntesis de ATP, las mitocondrias participan activamente en numerosos procesos biológicos, ya sea como una plataforma física para la interacción proteína-proteína o regulando niveles intracelulares de moléculas señal tales como Ca^{2+} o especies reactivas del oxígeno. Uno de los principales procesos donde se ve involucrada la regulación mitocondrial es la muerte celular, ya que la misma juega un papel esencial en muchas respuestas apoptóticas. Las cisteín-proteasas ejecutoras de la apoptosis son las caspasas. Existen dos vías principales de apoptosis que finalizan en la activación de las caspasas 3 y 7: una es la *vía extrínseca*, la cual depende de la unión de ligandos como FasL o $TNF\alpha$, a receptores de muerte que activan la caspasa 8, lo que finaliza en activación de las caspasas 3-7 y continúa con la cascada proteolítica. La otra, la *vía intrínseca o mitocondrial*, comienza con situaciones de estrés como aumento de ROS o daño del ADN, las cuales activan una clase de proteínas de la familia Bcl-2 (nombre que proviene del protooncogén *B-cell lymphoma 2*) llamadas BH3 por el tipo de dominios que contienen. Las proteínas de la familia Bcl-2 que componen esta vía, pueden dividirse en dos subgrupos de acuerdo a su función pro- o anti-apoptótica (Chipuk, Moldoveanu et al. 2010, Bender and Martinou 2013). Dentro de las proteínas anti-apoptóticas encontramos a Bcl-2, Bcl-XL, MCL-1, Bcl-w, A1, todas ellas con dominios altamente conservados BH1-BH4. Por otro lado, dentro del subgrupo de proteínas pro-apoptóticas encontramos aquellas que poseen dominios BH1-BH4 como Bak, Bax, y un conjunto de proteínas heterogéneas que solo poseen dominios BH3, tales como Bid, Bim, Bad, Puma, Noxa que cumplen la función de sensores que ante un estímulo activan a Bax

Introducción

o Bak translocando a la membrana externa. El destino hacia la apoptosis mediada por estas proteínas es un balance entre la expresión, interacción y actividad de las mismas.

El inicio de la apoptosis por vía mitocondrial comienza con la activación de las proteínas de la familia Bcl-2; uno de los principales estímulos, como se mencionó anteriormente, es el aumento de ROS por encima de niveles fisiológicos. Ante el aumento de ROS, especialmente de H₂O₂, se produce la fosforilación y activación de JNK, la cual tiene acción directa sobre las proteínas anti- y pro-apoptóticas de la familia Bcl-2. La activación sostenida de JNK genera la inhibición directa de Bcl2. A su vez JNK cliva a Bid, activándola (Dhanasekaran and Reddy 2008), y ésta, una vez en mitocondria, induce apoptosis por liberación de las proteínas Smac/DIABLO; por otro lado, el clivaje y activación de Bid inhibe las actividades de las proteínas anti-apoptóticas Bcl2 y Bcl-XL. Otro de los efectos de JNK es la fosforilación y activación de las proteínas Bim y Bad que luego van a activar a Bax y Bak (Sinha, Das et al. 2013).

Una vez que son activadas, las proteínas BH3 translocan a la MEM comenzando un proceso llamado permeabilización de la membrana externa (MOMP, del inglés mitochondrial outer membrane permeabilization) en el que se pierde la integridad y el $\Delta\psi$ de membrana. Como consecuencia se libera, entre otras moléculas, el citocromo *c* que se encuentra en el espacio intermembrana. El citocromo *c* liberado forma un complejo con el factor proapoptótico citosólico APAF 1 (del inglés, *apoptosis protease-activating factor-1*) activando caspasa 9 y finalmente, las caspasas 7 y 3.

Sin embargo, no solo el aumento de ROS puede regular las proteínas de la familia Bcl2 sino que aumentos en las concentraciones de óxido nítrico (NO) dirigen el aumento en la expresión de Bax (Park, Jeong et al. 2014). Un probable mecanismo es que el NO, a través de la acumulación de p53, activa la transcripción génica de Bax y reprime la de Bcl2 (Miyashita and Reed 1995).

De esta manera, se resume la compleja interacción entre un estímulo de estrés y la maquinaria apoptótica, que sitúa a la mitocondria dentro de una red celular interconectada donde además de ser un sensor, determina en forma irreversible el proceso de apoptosis.

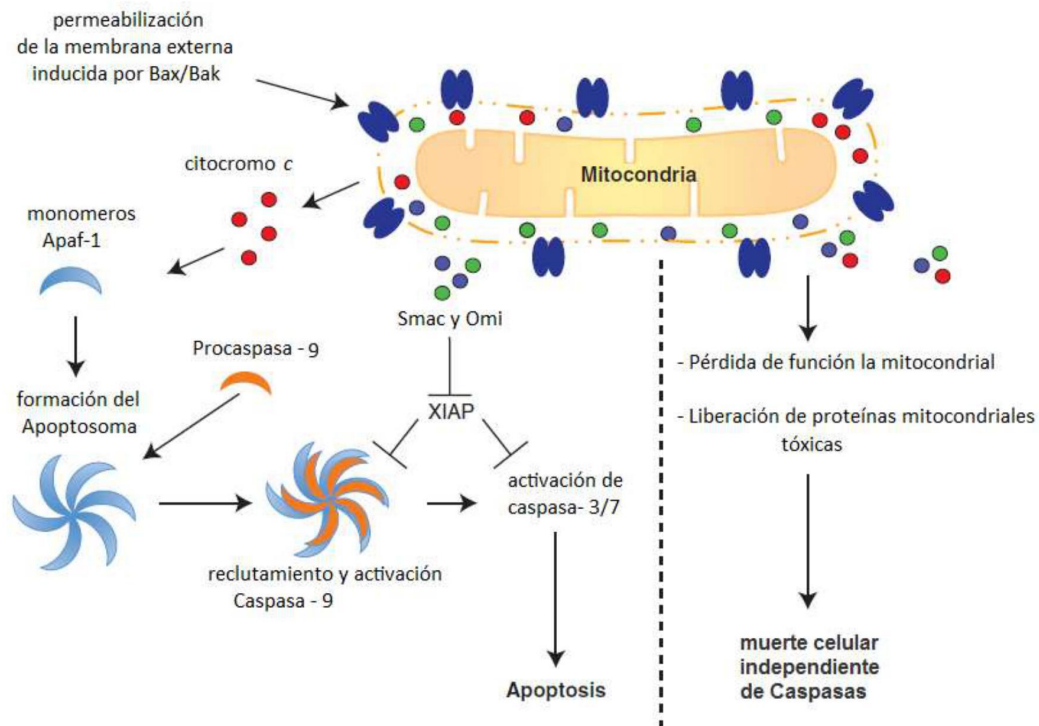


Figura 11. Esquema que resume la apoptosis por la vía mitocondrial con el reclutamiento de Bak/Bax a la MEM.

2.4 Dinámica mitocondrial

Las numerosas funciones celulares en las que se ve involucrada la mitocondria se reflejan en su estructura. Ésta es una organela dinámica que constantemente se fusiona y divide, no se encuentra aislada sino formando una red interconectada. Estos procesos llamados en su conjunto Dinámica mitocondrial son importantes para la herencia y las funciones mitocondriales. Los primeros eventos de fisión y fusión fueron descritos en levaduras donde se descubrió una amplia familia de GTPasas encargadas de mediar dichos procesos.

2.4.1 Fusión mitocondrial

Introducción

La fusión mitocondrial es un evento complejo que consta de dos pasos, la fusión de las membranas externas y la fusión de las membranas internas. Las primeras proteínas involucradas descubiertas en levaduras fueron Fzo y Mgm1. Sus ortólogas en mamíferos son Mitofusina 1 y 2 (Mfn Mitofusina) para Fzo, y el ortólogo mamífero para Mgm es OPA1 (optic atrophy 1). Mfn1 y 2 poseen dos segmentos transmembrana insertos en la membrana mitocondrial externa, con su mayor parte en la cara citosólica. La fusión de la membrana externa comienza cuando dos Mfn homólogas o heterólogas actúan con sus dominios citosólicos en configuración *trans*; la hidrólisis de GTP permite el cambio conformacional que une las dos membranas externas (Rojo, Legros et al. 2002). Por otro lado, la fusión de la membrana interna es llevada a cabo principalmente por OPA1. Esta proteína posee una secuencia de importe N-terminal seguida de secuencias de clivaje que permiten generar las dos variantes de OPA1 necesarias en el proceso de fusión. Seguido de las secuencias de clivaje se encuentra el dominio GTPasa (Rujiviphat, Meglei et al. 2009). Finalmente posee un dominio GED (dominio efector- GTP) encargado de la interacción en *trans* con Mfn1/2 para coordinar el proceso de fusión de MIM y MEM (Zorzano, Liesa et al. 2010).

2.4.2 Fisión mitocondrial

Las principales proteínas involucradas en el proceso de fisión mitocondrial son Dnm1 (proteína relacionada a dinamina1), Fis1 (proteína de fisión mitocondrial) y Mdv1 (proteína de división mitocondrial) descubiertas en levadura. En mamíferos se encuentra Drp1 (*dynamamin-related protein*), ortólogo de Dnm1, que es una proteína citosólica capaz de formar oligómeros. Consta de tres dominios, el dominio GTPasa N-terminal, un dominio efector de GTP C-terminal, y un dominio α -hélice de unión entre los dos primeros. Además, Drp1 presenta una variante de *splicing* en cerebro. Por otro lado, en mamíferos también se encuentra Fis1, la cual es capaz de interactuar con Drp1. Esta proteína está anclada a la membrana externa mitocondrial y es la encargada de reclutar a Drp1 (Mozdy, McCaffery et al. 2000), pero no es la única, ya que se descubrió que otra proteína, MFF (factor de fisión mitocondrial), ejerce el papel de Fis1 (Otera, Wang et al.

2010). El proceso de fisión ocurre cuando los oligómeros de Drp1 forman un espiral y se reclutan a la MEM produciendo una estrangulación de la organela, siendo esta última acción dependiente de la hidrólisis de GTP.

2.4.3 Coordinación de fisión y fusión mitocondrial en la fisiología celular

Los ciclos de las mitocondrias comienzan con el crecimiento y división de organelas pre-existentes (biogénesis) y finalizan con la degradación de organelas deterioradas o sobrantes por mitofagia (recambio). Entre tanto, las mitocondrias sufren ciclos de fisión y fusión que conducen a la célula a generar mitocondrias heterogéneas y múltiples, o redes interconectadas. Las redes mitocondriales fusionadas son importantes para la disipación de la energía metabólica a través de la transmisión del potencial de membrana mitocondrial a lo largo de filamentos, para la complementación de los productos génicos provenientes de ADN mitocondrial (ADNmt) en células heteroplásmicas (Yoneda, Chomyn et al. 1992) y para contrarrestar la disminución de las funciones respiratorias durante el envejecimiento. Por otra parte, la fisión es requerida para la herencia y partición de las organelas durante la división celular, para la distribución intracelular a través del citoesqueleto y el recambio por mitofagia y para la liberación de factores pro-apoptóticos desde el espacio intermembrana (Lee, Jeong et al. 2004).

El fenómeno más claro de coordinación entre estos dos procesos es el efecto de la fisión mitocondrial durante la sinaptogénesis. La fisión estimulada por aumento de Drp1 en neuronas embrionarias hipocampales promueve la sinaptogénesis, mientras que la sobre-expresión de OPA1 la reduce; pero por otra parte, una fisión persistente debido a un aumento de estrés oxidativo o nitrosativo en neuronas embrionarias conduce a la muerte celular, siendo en el caso del aumento de NO, vía aumento de Bax en forma independiente de caspasas (Knott, Perkins et al. 2008).

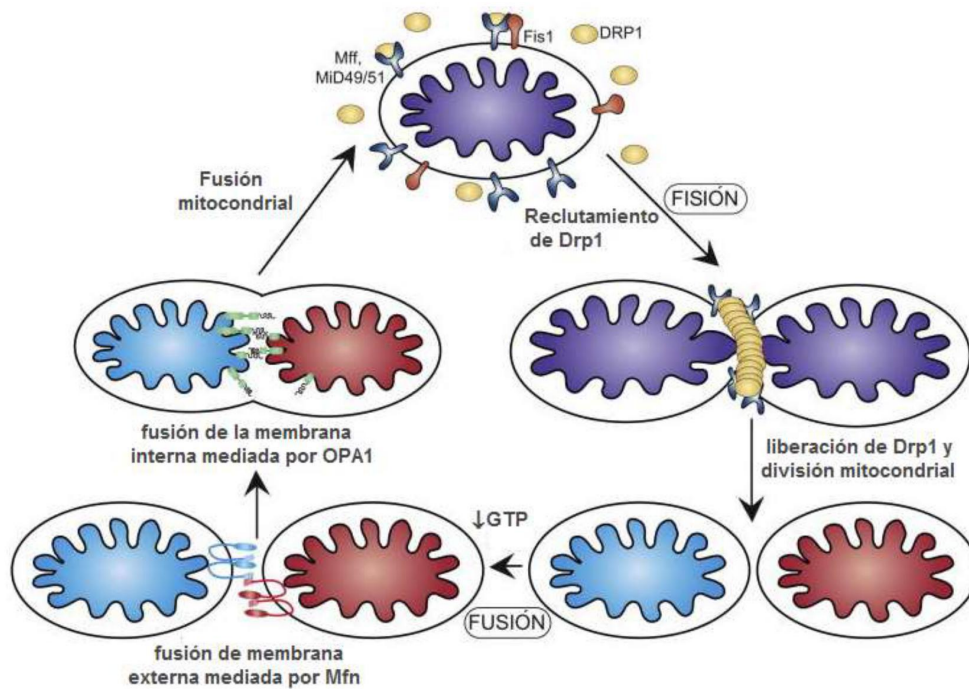


Figura 12. Esquema que resume el ciclo de fisión y fusión mitocondrial con sus principales componentes (en mamíferos). Mid49/51 es una proteína anclada en la membrana externa con funciones asociadas a Fis1.

3 EL ÓXIDO NÍTRICO

El NO es un radical libre pequeño y sin carga, compuesto por un átomo de nitrógeno y un átomo de oxígeno. En condiciones normales se halla en estado gaseoso y en forma monomérica. Dado su carácter no polar es capaz de difundir libremente a través de membranas y debido a su electrón desapareado, es una molécula con carácter de radical libre, pero de reactividad intermedia lo cual le da alta selectividad en sus reacciones (Lowenstein, Dinerman et al. 1994; Pacher, Beckman et al. 2007). Estas características lo convierten en un segundo mensajero ideal con amplia variedad de funciones fisiológicas.

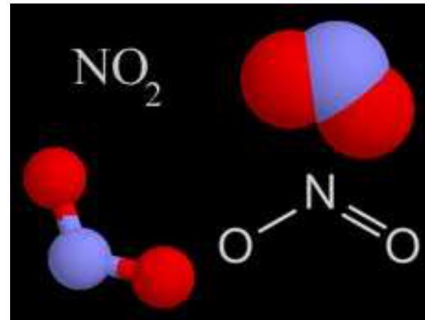


Figura 13. Estructura y configuración del óxido nítrico

Las funciones biológicas que ejerce el NO son variadas y opuestas, van desde la protección contra patógenos, la tonicidad vascular, proliferación, la acción como neurotransmisor en las sinapsis no colinérgicas y no adrenérgicas en el sistema nervioso, hasta la oxidación y nitración de proteínas y la muerte celular. La dualidad de estas respuestas se debe a que el NO ejerce dos tipos de efectos que dependen del mecanismo de acción:

Efectos directos del NO: están mediados por interacción directa con los blancos biológicos, se producen a bajas concentraciones (<200nM) y por exposición no sostenida. Entre algunos mecanismos se encuentran las modificaciones proteicas como nitrosilaciones que sufren algunas proteínas y son capaces de regular su actividad (Haun, Nakamura et al. 2013, Zhang, Jin et al. 2014), o por acción directa sobre el cGMP (Piantadosi 2012; Russwurm, Russwurm et al. 2013).

Efectos indirectos del NO: involucran la aparición de especies reactivas del nitrógeno (RNS), producidas por la reacción del NO con especies reactivas del oxígeno (ROS), las cuales incluyen al oxígeno y sus productos de reducción parcial (Radi, Cassina et al. 2002; Pacher, Beckman et al. 2007). Estos efectos se producen a concentraciones elevadas (>400nM). El NO puede combinarse con el oxígeno para formar óxidos de nitrógeno, entre los cuales el principal es el dióxido de nitrógeno (NO₂). A su vez el NO puede directamente reaccionar con el radical superóxido (O₂⁻) para formar peroxinitrito (ONOO⁻) (Beckman, Beckman et al. 1990); éste, en condiciones biológicas, tiene una vida media de 1s y su

concentración está limitada por la presencia de superóxido dismutasa (SOD), la cual compite por el O_2^- . Dado que la concentración de SOD es un orden mayor, en condiciones normales, la producción de $ONOO^-$ es baja.

Tanto el NO_2 como el $ONOO^-$ son capaces de oxidar moléculas blanco como tioles o grupos metálicos, pero la modificación más relevante que ejercen es la nitración de residuos de tirosina en proteínas. Esta modificación (N-Tyr) es capaz de inhibir la actividad enzimática o impedir la unión a sustratos y moléculas blanco (Zou and Cowley 1997; Ara, Przedborski et al. 1998; Souza and Radi 1998; Takakura, Beckman et al. 1999; MacMillan-Crow, Greendorfer et al. 2000; Osna, Haorah et al. 2004; Lopez, Qayyum et al. 2005; Deeb, Hao et al. 2006).

3.1 Efecto de NO en la mitocondria

Las acciones del NO a nivel del metabolismo y señalización mitocondrial son ampliamente conocidas. El NO regula el consumo de oxígeno mitocondrial por inhibición reversible de la citocromo oxidasa, modifica el potencial de membrana y se ve involucrado en la homeostasis del Ca^{+2} a nivel mitocondrial (Sisalli, Secondo et al. 2014). El NO ejerce sus efectos actuando de forma *directa* o *indirecta*.

En forma directa, el NO actúa sobre el Complejo IV de la cadena respiratoria. A concentraciones que varían entre 0,05-0,10 μM compite en forma reversible con dos sitios de unión del oxígeno (Takehara, Kanno et al. 1995). Concentraciones mayores, 0,3-0,5 μM de NO impiden la transferencia de electrones entre los citocromos *b* y *c1* presentes en el complejo III (Carreras and Poderoso 2007; Sampath and Kannan 2009). Como consecuencia de la inhibición de los complejos IV y III por NO se genera un estado altamente reducido de los componentes de la cadena respiratoria que promueve la oxidación de las moléculas de ubiquinol presentes en la membrana mitocondrial, asociados a la cadena de transporte, y como producto final se obtiene ubiquinona y O_2^- (Poderoso, Lisdero et al. 1999).

A su vez el NO ejerce efectos *indirectos* en la cadena respiratoria mitocondrial a través de la formación de $ONOO^-$ y nitración de proteínas. Como se resume anteriormente el

Introducción

aumento en la producción de O_2^- producto de la inhibición reversible de los complejos IV-III y ubiquinoles por la presencia de NO, desplaza el equilibrio hacia la formación de ONOO⁻ en la mitocondria con la consecuente nitración e inhibición de los complejos.

El complejo I de la cadena respiratoria es el sitio más susceptible a nitración, niveles fisiológicos de NO generan una inhibición reversible por s-nitrosación de un tiol (Chinta and Andersen 2006) pero cuando los niveles superan 10 μ M, el ONOO⁻ generado actúa modificando residuos de tirosina en subunidades del complejo I, limitando así la entrada de electrones a la cadena de transporte (Davis, Hawkins et al. 2010). Otra proteína mitocondrial blanco de la acción del ONOO⁻ es citocromo *c*, una pequeña proteína soluble del espacio intermembrana que posee cuatro tirosinas capaces de ser nitradas, y los cambios conformacionales producto de la nitración en ellas conducen a la pérdida de la capacidad para transportar electrones; a su vez evidencia sugiere que el citocromo *c* puede ser nitrosilado en el citosol como un marcador de apoptosis (Schonhoff, Gaston et al. 2003).

Además de actuar sobre la cadena de transporte de electrones la nitración se extiende a otras proteínas mitocondriales, tales como los canales K⁺ ATP mitocondriales y el transportador adenina nucleótido (ANT) presente en la membrana interna mitocondrial, pero si bien sus efectos involucran una pérdida de función por parte de estos intercambiadores, se consideran beneficiosos ya que evitan el aumento de ROS en modelos de isquemia-reperfusión (Larsen, Schiffer et al. 2012).

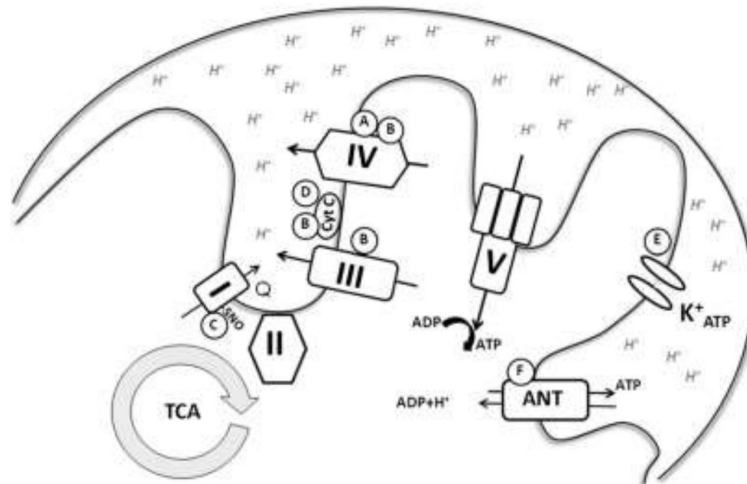


Figura 14. Sitios blancos de acción del NO en la mitocondria. El principal componente de ETC susceptible al NO es el Complejo IV, le siguen los complejos III e I que son blanco del ONOO⁻ y finalmente el intercambiador de nucleótidos ANT, el citocromo C, y los canales de potasio situados en la MIM.

Finalmente, la inhibición de la cadena de transporte de electrones mitocondrial por las reacciones directas e indirectas del NO favorece la formación de ROS, tales como O₂⁻ y H₂O₂ dentro de la mitocondria como se mencionó anteriormente (Poderoso, Carreras et al. 1996).

3.2 Las óxido nítrico sintasas.

El NO es producido en las células por enzimas oxido-reductasas conocidas como óxido nítrico sintasas (NOS). Estas sintasas producen NO catalizando la oxidación de cinco electrones del centro guanidínico del aminoácido L-arginina; ésta es una reacción que requiere de NADPH como dador de electrones y arginina como sustrato, y como resultado se producen cantidades equimolares de NO, el aminoácido citrulina y agua (Forstermann and Sessa 2012).

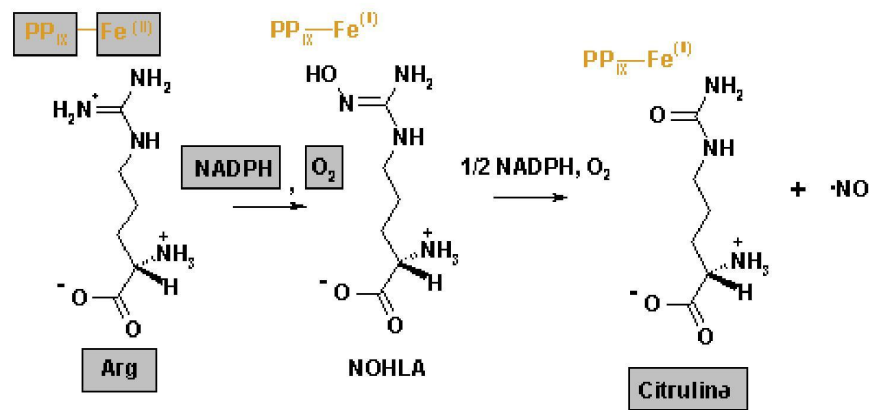


Figura 15. Reacción de síntesis de NO a partir de L-Arginina.

3.2.1 Estructura de las NOS

Su estructura consiste en dos principales dominios, un dominio oxidasa N-terminal y un dominio reductasa C-terminal unidos por una región bisagra de unión a calcio-calmodulina (Ca-CAM). El dominio oxidasa N-terminal contiene sitios de unión a hemo y tetrahidrobiopterina (BH₄) y el sitio donde une su sustrato, arginina. El dominio reductasa a su vez, se divide en un sub-dominio de unión al cofactor flavina adenina mononucleótido (FMN) y otro sub-dominio de unión a NADPH y flavina adenina dinucleótido (FAD). Este último dominio pertenece a una gran familia de proteínas que incluyen a la citocromo P450 reductasa dependiente de NADPH (CYPOR), las flavoproteínas sulfito reductasas y la reductasa 1 (Wang, Goligorsky et al. 1997; Gruez, Pignol et al. 2000; Paine, Garner et al. 2000).

Ambos dominios son catalíticamente activos por separado (Ghosh, Abu-Soud et al. 1995; Chen, Tsai et al. 1996); sin embargo, no se produce NO a menos que los dominios estén interconectados y la enzima se encuentre como homodímero a través de la interacción de los dominios oxigenasa de cada monómero (Crane, Arvai et al. 1998; Crane,

Introducción

Rosenfeld et al. 1999; Fischmann, Hruza et al. 1999). El pasaje de electrones ocurre de manera cruzada entre el dominio reductasa de uno de los monómeros y el grupo hemo unido al dominio oxigenasa del otro monómero. Evidencia reciente sugiere que en el dominio reductasa los sub-dominios FMN de los dímeros de NOS oscilan cediendo y aceptando electrones en una configuración que mantiene establemente unidas y activas a las NOSs; a su vez hay una unión covalente hemo-FMN y una interacción no-covalente entre este complejo y CaM (hemo-FMN:CaM). En este contexto la fosforilación inhibitoria en el sitio Ca-CAM (ser¹⁴¹²) bloquea el movimiento de los dominios FMN y el paso de electrones (Garcin, Bruns et al. 2004; Forstermann and Sessa 2012; Smith, Underbakke et al. 2013).

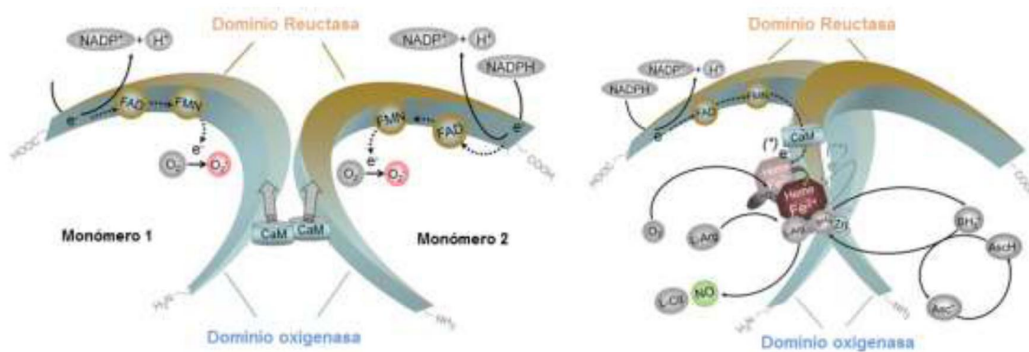


Figura 16. Estructura y modelo catalítico de NOS. Los monómeros utilizan los e⁻ del NADPH, son capaces de unir sus dominios FAD, FMN y CaM, pero no pueden unir BH₄ o su sustrato L-Arginina (izquierda). En la presencia de los grupos hemo pueden interactuar los interdominios y unir BH₄ y L-Arginina comenzando la transferencia de e⁻ entre los dominios oxigenasa-reductasa para producir el intermediario hidroxil-L-Arginina y finalmente el NO y L-citrulina (derecha).

3.2.2 Isoformas de NOS

En mamíferos existen tres isoformas codificadas en diferentes genes y que cumplen funciones variadas y responden de manera diferente a los inhibidores. Actualmente se las

Introducción

conoce como NOS neuronal (nNOS o NOS-1), NOS inducible (iNOS o NOS-2) y NOS endotelial (eNOS o NOS-3).

- **nNOS (161 KDa)** es de expresión constitutiva, dependiente de calcio para su actividad. Contiene un dominio PDZ que no se halla presente en las demás isoformas y contribuye a su anclaje o interacción con otras proteínas. Esta isoforma fue la primera de las tres isoformas en ser identificada y fue descrita por primera vez en tejido nervioso (Hall, Antoniou et al. 1994).
- **eNOS (131 KDa)** es de expresión constitutiva, calcio-dependiente y fue originalmente descrita en las células del endotelio vascular (Janssens, Shimouchi et al. 1992, Marsden, Schappert et al. 1992).
- **iNOS (133KDa)** se expresa de manera inducible en una variedad de tejidos y fue originalmente descrita en macrófagos, su expresión está regulada por citoquinas proinflamatorias, lipopolisacárido bacterial, etc. (Sherman, Aeberhard et al. 1993). Dada su alta afinidad por el Ca^{+2} se considera Ca^{+2} - independiente para su actividad.

3.2.2.1 NOS neuronal (nNOS)

La isoforma neuronal de NOS fue la primera de las tres isoformas descrita y fue originalmente purificada de cerebelo de rata y cerdo (Bredt and Snyder 1990; Mayer, John et al. 1990; Schmidt and Murad 1991). El gen que codifica para esta enzima es uno de los más complejos del genoma (Brenman, Xia et al. 1997). Debido a la presencia de múltiples promotores y sitios de inicio de la transcripción, existen numerosas variantes de *splicing*. Un sitio de inicio de la traducción se encuentra en el exón 2 de manera que podemos considerar dos grupos principales de variantes resumidas en la tabla 2: las que poseen el exón 2 y aquellas que pierden dicho exón y contienen sitios variados de inicio de traducción.

Variantes de splicing con el exón 2	Variantes de splicing sin el exón 2
<p>nNOSα corresponde a la secuencia completa, 29 exones. Es variable entre especies y se expresa mayormente en cerebro e hígado.</p>	<p>nNOSβ el inicio de traducción comienza en el exón 3, por lo que pierde el extremo N-terminal, el dominio PDZ. Es principalmente citosólica.</p>
<p>nNOSμ expresada en músculo esquelético y corazón. Por <i>splicing</i> incorpora un <i>cassette</i> de 34 aminoácidos. Su actividad es similar a nNOSα.</p>	<p>nNOSγ el inicio de la traducción comienza en el exón 5, es la isoforma más corta y posee baja actividad catalítica (3%).</p>
<p>nNOS-2 descrita en cerebelo de ratón (Fujisawa y col., 1994), esta variante tiene una delección entre los exones 9-10.</p>	<p>TnNOS Esta isoforma se expresa en el testículo en humanos y a pesar de ser un homólogo exacto de nNOSγ, posee una actividad significativa</p>

Tabla 2. Esquema de las diferentes variantes de *splicing* de nNOS. Aquellas que no contienen el exón 2 son las que pierden el dominio PDZ.

Dominio PDZ. El extremo amino terminal de nNOS α , contenido en el exón 2, corresponde a un dominio PDZ clásico de interacción proteína-proteína de aproximadamente 100 aminoácidos (Figura 39). Este dominio no parece ser relevante para la actividad enzimática (Panda y col., 2003) pero puede interaccionar con dominios PDZ de otras proteínas o con secuencias consenso en los extremos carboxilo terminales de proteínas blanco (Jelén y col., 2003; Nourry y col., 2003). De esta manera, nNOS α forma complejos que determinan su ubicación subcelular. Ejemplo de ello es la interacción con la proteína de densidad post-sináptica 95 (PSD-95) que actúa como proteína de anclaje en neuronas (Kim y col., 2004). En el músculo nNOS μ puede anclarse al sarcolema mediante la interacción de su dominio PDZ con α -sintrofina (Adams, Mueller et al. 2001).

3.2.3 Inhibidores de nNOS

Debido al papel fundamental del NO y sus nocivos efectos en varios procesos patológicos, las sintasas se convirtieron en un blanco farmacológico y se desarrollaron una amplia gama de inhibidores químicos (Vitecek, Lojek et al. 2012). Pueden reconocerse de acuerdo a su sitio de unión cuatro clases principales:

1. Inhibidores que actúan sobre el sitio de unión a Arginina.
2. Compuestos que mimetizan el co-factor BH₄.
3. Inhibidores que interactúan con el grupo hemo de las NOS; estos compuestos se unen a la enzima en forma monomérica e impiden la dimerización.
4. Compuestos que interactúan con los cofactores calmodulina o flavinas.

Los inhibidores análogos de L-Arginina representan el grupo que se descubrió primero y actualmente, el más utilizado. Dentro de este grupo se encuentra el compuesto L-N^ω-Nitro-Arginina Metil Éster (L-NAME), que actúa a través de una unión no-covalente con las NOS una vez que es hidrolizado a L-N^ω-Nitroarginina (L-NNA) un inhibidor más potente pero menos soluble. Para iNOS los tiempos de unión son cortos, así como la reversibilidad de la reacción. Contrariamente, para eNOS y nNOS se requieren mayores tiempos y el efecto es menos reversible (Klatt, Schmidt et al. 1994). El L-NAME se utiliza en múltiples prácticas con animales, su acción es rápida ya que alcanza hasta el 70% de inhibición de la actividad de NOS, 30 minutos después de la infusión y una vez que deja de administrarse su efecto queda remanente hasta 23 hs (Frandsenn, Bangsbo et al. 2001). Uno de los mayores inconvenientes de este inhibidor es el aumento del flujo sanguíneo o en su efecto severo, hipertensión (Sonntag, Deussen et al. 1992; Balaszczuk, Tomat et al. 2002). Sin embargo, Wakefield y colaboradores demostraron que dosis de entre 3 a 10 mg/Kg no afectan la presión sanguínea ni la frecuencia cardíaca luego de tres días de administración, produciendo la inhibición de nNOS mayormente y en menor medida de eNOS (Wakefield, March et al. 2003).

3.2.4 Localización mitocondrial de NOS

Desde 1995, diferentes investigadores propusieron la asociación de NOS a las mitocondrias. Inicialmente, (Bates, Rugggeroli et al. 2002) describieron la presencia de eNOS en mitocondrias. Posteriormente, dos grupos independientes encontraron actividad de NOS en la membrana interna mitocondrial (Ghafourifar and Richter 1997; Giulivi, Poderoso et al. 1998), evidencia que fue reproducida en numerosos estudios usando una variedad de métodos complementarios (Carreras, Peralta et al. 2001; Kanai, Pearce et al. 2001; Riobo, Melani et al. 2002; Boveris, Valdez et al. 2003). En base a estos estudios se planteó la existencia de una variante mitocondrial (mtNOS) con modificaciones post-traduccionales específicas. Por ejemplo, en el hígado, la secuencia de mtNOS resultó ser similar a la de iNOS, aunque con un patrón de acilación característico (Tatoyan and Giulivi 1998; Lopez-Garcia and Sanz-Gonzalez 2000). Por otro lado, la actividad de mtNOS se observó dependiente de Ca^{2+} y calmodulina (Tatoyan and Giulivi 1998; Carreras, Peralta et al. 2001; French, Giulivi et al. 2001; Kanai, Pearce et al. 2001; Stamler and Meissner 2001; Bustamante, Bersier et al. 2002). En el año 2002, (Elfering, Sarkela y col., describieron en el hígado de rata, una forma de mtNOS derivada de la isoforma α de nNOS con modificaciones postraduccionales, una miristoilación en el extremo N-terminal y una fosforilación en la serina 1412, en el extremo C-terminal.

Por otra parte, en nuestro laboratorio se caracterizó el papel del NO mitocondrial resultante de la translocación de nNOS en diferentes condiciones fisiológicas y patológicas.

3.2.5 mtNOS, NO y desarrollo neuronal

Durante la embriogénesis, el desarrollo del cerebro se caracteriza por una intensa proliferación, que se frena luego del nacimiento. En las mitocondrias de cerebro de rata, Riobó y col. (2002) describieron la presencia de una variante de 144 kDa de mtNOS, localizada en la membrana interna. Esta enzima se encontró altamente expresada y activa en las últimas etapas del desarrollo fetal y durante los primeros días postnatales, mostrando luego una disminución de su expresión en el cerebro adulto. Los autores

observaron un patrón similar en la expresión de MnSOD, mientras que la isoforma citosólica de nNOS mostró un patrón de expresión inverso. En este contexto, los autores sugirieron que la activación secuencial de mtNOS, MnSOD y nNOS podría jugar un rol durante el remodelamiento sináptico y el posterior arresto de la proliferación.

3.2.6 Regulación de plasticidad sináptica mediada por NO

Las NOS, a través de la producción de NO, regulan diferentes funciones en el SNC tales como aprendizaje y memoria, control del sueño y vigilia, neurosecreción, comportamiento y fisiología (Feil and Kleppisch 2008; Garthwaite 2008; Reaume and Sokolowski 2009). Se ha demostrado que el NO cumple un papel fundamental en la plasticidad sináptica, ya que la vía de señalización NO-cGMP-PKG (guanilato ciclasa-proteína quinasa G) regula los procesos de potenciación y depresión sinápticas, conocidas como LTP y LTD respectivamente (del inglés, Long Term Potentiation y Long Term Depression), en varias sinapsis. Una de las formas de inducir LTP es mediante un incremento en la transmisión sináptica con NO como mensajero retrógrado, en las sinapsis laterales de Shaffer en la sub-región del hipocampo CA1 (*Cornu Amonis*). En estas sinapsis, el influjo de Ca^{+2} permite la liberación de NO desde la terminal post-sináptica hacia la pre-sináptica para estimular una cascada glutamatérgica que activa la vía GMP-PKG. Mientras que, en las células de Purkinje (grupo de neuronas ubicadas en la corteza cerebelosa), el NO puede estimular LTD vía activación de PKG (del inglés, Protein Kinase G) (Garthwaite, Bartus et al. 2006; Feil and Kleppisch 2008).

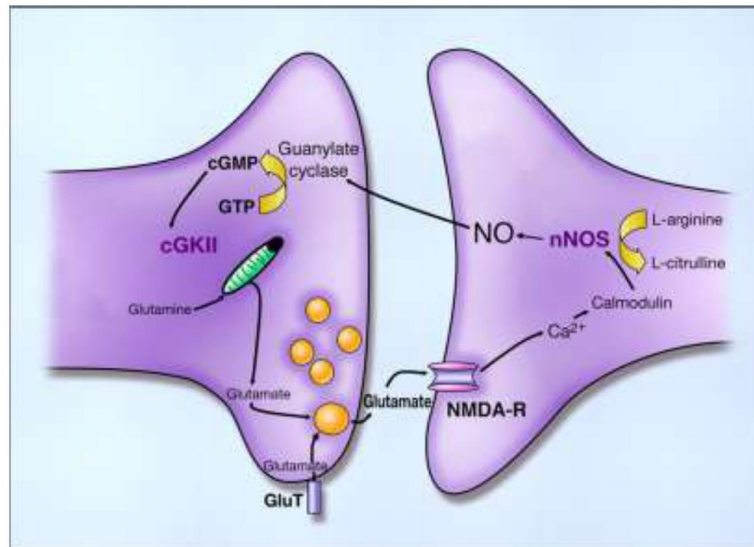


Figura 17. Esquema del NO como mensajero retrogrado en las sinapsis glutamatérgicas y la activación de cGMP.

4 ESTRUCTURA DEL CÓRTEX CEREBRAL, PLASTICIDAD SINÁPTICA Y ESTABLECIMIENTO DE LA MEMORIA.

Desde el punto de vista histológico, el cerebro está formado por dos tipos de sustancias, la sustancia gris, que constituye la corteza cerebral, posee de 2 a 3 mm de espesor y alberga todos los cuerpos celulares de las neuronas que constituyen el cerebro. Esta capa se encuentra dispuesta en un sistema de pliegues y surcos llamados circunvoluciones cerebrales. En el interior se halla la sustancia blanca, que se compone de fibras y axones recubiertos de una sustancia llamada mielina que es la que les da el aspecto blanquecino.

Dentro de la corteza se hallan dos regiones ontogénica y filogenéticamente diferentes, la moderna o neocórtex constituida por neuronas que en el adulto se disponen en 6 capas granulares, y la región más antigua o arquicórtex siempre compuesta por menos de 6 capas de neuronas. En esta última región de la corteza se encuentra el hipocampo, que en mamíferos desempeña las funciones en la formación de la memoria y noción espacial.

Introducción

El hipocampo está dividido en dos regiones, el giro dentado (DG, *dentate gyrus*) de aspecto curvo en forma de "U" y la región del *Cornu Ammonis* (CA) la cual se divide en las subregiones CA1, CA2, CA3 y CA4. Tanto el DG como CA se hallan compuestos de tres capas de neuronas bien definidas (Figura 4):

- capa molecular, es la más superficial, consta de pequeñas neuronas diseminadas y fibras nerviosas.

- capa piramidal en CA o granular en DG, es la capa principal de cada zona. La capa piramidal consta de neuronas grandes de forma poligonal. Por otra parte, la capa granular consta de neuronas grandes redondeadas cuyas prolongaciones terminan en la capa piramidal.

- capa polimorfa, que consta de neuronas intrínsecas, ya que sus axones no salen del hipocampo y son de forma heterogénea, bipolares, en forma de canasto o musgosas. (Cardinali, 2007).

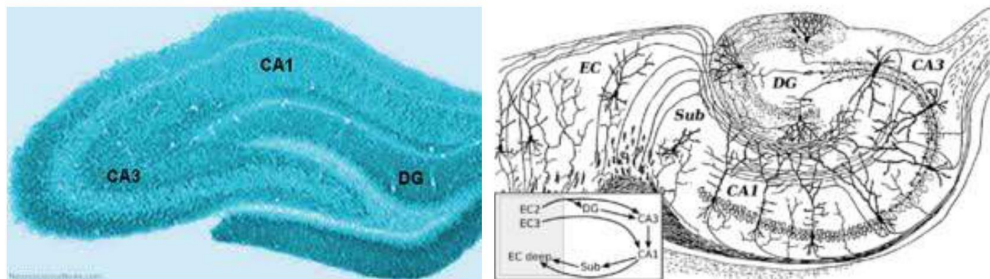


Figura 18. Izquierda, corte histológico del hipocampo con las zonas DG (giro dentado), CA1 (cornu ammonis) y CA3 representadas. Derecha, Circuito básico del hipocampo, según un dibujo de Santiago Ramón y Cajal. Siglas: DG: dentate gyrus (giro dentado). Sub: subiculum. EC: corteza entorrinal.

En el hipocampo existen dos procesos fundamentales asociados a la plasticidad sináptica que se originan durante el desarrollo embrionario y continúan en la etapa post-natal:

- Por un lado se produce neurogénesis y apoptosis durante el desarrollo, que puede permanecer en la vida adulta gracias a la presencia de células pluripotentes en la zona de

Introducción

DG. La neurogénesis durante la vida fetal se origina de formas diferentes en las tres estructuras principales: neocortex, cerebelo e hipocampo. Las células de la región hipocampal provienen de la placa cortical para formar por neurogénesis, primero, las células piramidales del giro dentado en estadios prenatales, y luego la capa granular, por proliferación, en la etapa postnatal; estas neuronas nuevamente formadas, emiten sus proyecciones axonales hasta la región CA3. La apoptosis, en contraste, remueve un número de neuronas formadas durante la ontogenia, pero el porcentaje de núcleos apoptóticos en un determinado momento es bajo aun cuando se trate de una región que se halla en apoptosis masiva; por lo tanto, un patrón modificado de apoptosis puede indicar efectos neurotóxicos (Kim and Sun 2011).

- Por otra parte, se encuentran los procesos fisiológicos asociados con el establecimiento de la memoria. El fenómeno de potenciación a largo plazo (LTP) es una forma bien conocida de plasticidad sináptica, que implica la transmisión química, y resulta de la actividad coincidente de fenómenos pre- y post-sinápticos que pueden durar desde horas *in vitro*, hasta meses *in vivo*. Al alterar la durabilidad y fuerza sináptica proporcionan a una población de neuronas una capacidad diferencial para responder a un *input* específico. Dicho fenómeno demostró incrementarse considerablemente en la zona del hipocampo durante ensayos conductuales y de aprendizaje (Tang, Shimizu et al. 1999; Cui, Wang et al. 2004; Whitlock, Heynen et al. 2006).

4.1 Potenciación a largo plazo y componentes principales.

En el fenómeno de LTP se encuentran involucrados dos tipos de receptores ionotrópicos y mediadores de la neurotransmisión excitatoria; estos son receptores de N-metil-D-aspartato (NMDAR) y receptores de ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (AMPA). Ambos receptores captan el glutamato liberado como neurotransmisor, y están acoplados a proteínas G o a canales de cationes en las terminales post-sinápticas.

Introducción

La transmisión comienza con la liberación del neurotransmisor a los receptores NMDAR, este proceso es dependiente de los niveles de Ca^{+2} y el influjo intracelular del mismo. Esta entrada de Ca^{+2} , a su vez, dirige la incorporación de otros receptores AMPA en la superficie (Timmermans, Xiong et al. 2013). El influjo de Ca^{+2} es regulado por la activación de las quinasas PKC y CAMKII. Si bien PKC interviene y promueve diferentes eventos durante el establecimiento de LTP, constituye un marcador temprano de estrés ya que puede promover la producción de ROS, inflamación y apoptosis en condiciones fisiopatológicas como hipotiroidismo, diabetes, o modelos de isquemia cerebral (Lee, Grabb et al. 2000; Zhang, Lin et al. 2013).

La quinasa PKC no es la única proteína regulada por los niveles de Ca^{+2} y ROS involucrada en la plasticidad y maduración neuronal y que a la vez constituye un marcador temprano de estrés (Di Sole, Vadnagara et al. 2012). La proteína Chp1, la cual estabiliza al intercambiador Na/H (NHE, *N/H exchanger*), es necesaria para la maduración axonal (Liu, Zaun et al. 2013) y se ve estrechamente involucrada en el mantenimiento de LTP a través de NHE (Rathje, Fang et al. 2013). Cuando Chp1 es sobreexpresada debido a estrés neuronal, activa excesivamente a NHE y conduce al influjo de niveles de Ca^{+2} capaces de desencadenar una cascada neurotóxica (Lee and Jung 2012; Uria-Avellanal and Robertson 2014).

Como anteriormente se mencionó, la activación de CAMKII constituye un evento necesario para inducir la transmisión sináptica en LTP, CAMKII a su vez activa a neurogranina, una de las proteínas post-sinápticas más abundantes en hipocampo y cortex. Es esta proteína quien controla la disponibilidad de CaM cuando los niveles de Ca^{+2} son elevados durante la transmisión, e incrementa la fuerza de la misma en los AMPAR (Zhong and Gerges 2010). Sin embargo, evidencia reciente sugiere que la activación de CAMKII-neurogranina inducida por aumentos de NO en células de neuroblastoma sensibiliza a las células a las ROS, ocasionando muerte celular (Gui, Song et al. 2007). La activación de CAMKII ante el aumento de ROS y en conjunción con elevados niveles de Ca^{+2} intracelular puede asimismo, inducir apoptosis vía activación del factor activador (ATF4) (Lange, Chavez et al. 2008; Lee y Silva 2009; Ma, Trinh et al. 2013). De esta manera,

Introducción

podemos ver que el proceso de establecimiento de la memoria a través de la transmisión sináptica tiene una regulación compleja dependiendo del ambiente intra- y extracelular, que viene dado principalmente por los niveles de Ca^{2+} .

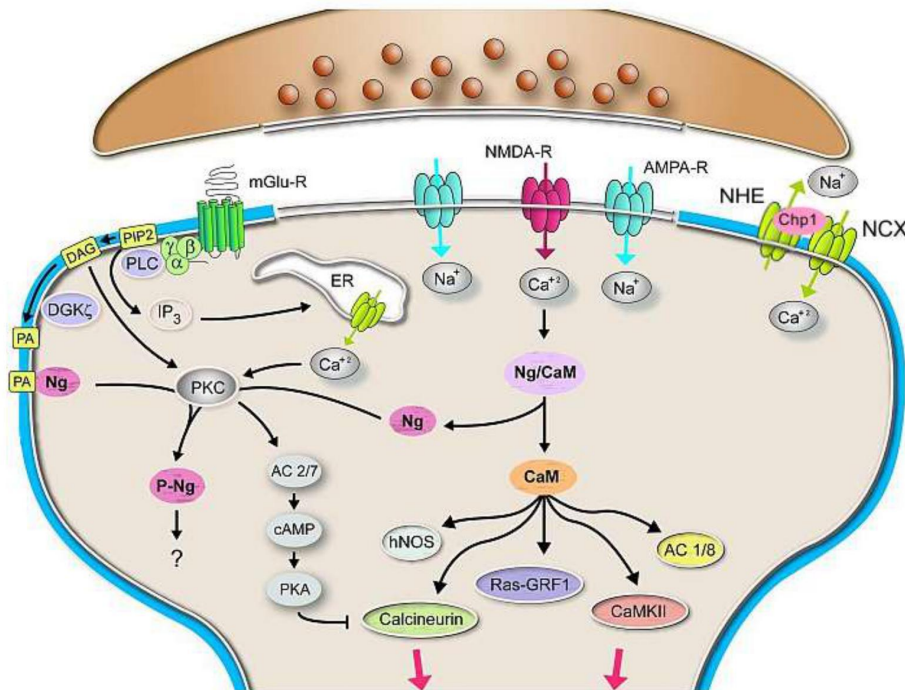


Figura 19. Esquema de las vías de transducción básicas que operan en el fenómeno de LTP (figura adaptada de Díez-Guerra FJ 2010). mGlu-R, NMDA-R y AMPA-R son receptores glutamatergicos de la membrana post-sináptica. NHE y NCX son intercambiadores de Na^+/H^+ y $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ respectivamente. Ng: neurogranina, DGK: diacilglicerol quinasa, PLC: fosfolipasa c, IP_3 : inositoltrifosfato, ER: retículo endoplásmico, PKC: proteína quinasa c.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis y objetivos

Las hormonas tiroideas son consideradas de importancia crítica durante el desarrollo, diferenciación y balance metabólico en mamíferos. Tanto el hígado como el cerebro constituyen dos órganos blanco de las hormonas tiroideas durante el desarrollo fetal y perinatal, ya que su deficiencia conduce a una disminución en la regulación transcripcional de enzimas involucradas en gluconeogénesis y lipogénesis en el hígado, y a defectos en la sinaptogénesis y remodelamiento sináptico en el cerebro.

Otra acción de las hormonas tiroideas es la homeostasis energética celular, y siendo la mitocondria la organela fundamental en la producción energética, constituye el blanco principal de las hormonas tiroideas a nivel intracelular.

En estudios previos en nuestro laboratorio demostramos que la disminución de hormonas tiroideas tiene efectos profundos sobre la localización sub-celular de la enzima nNOS, lo que se traduce en una disminución del metabolismo basal a través del incremento de NO en mitocondrias, y que la administración de L-NAME a los animales hipotiroideos lograba revertir los parámetros metabólicos aún en ausencia de hormona.

Considerando la regulación temporal que ejercen los niveles de nNOS y su importe mitocondrial sobre la proliferación y apoptosis durante el desarrollo embrionario y que la expresión de la misma puede ser modificada por el *status* tiroideo, nuestra hipótesis es que: **El hipotiroidismo congénito induce un incremento precoz de mtNOS durante el desarrollo postnatal temprano, lo cual produce cambios a nivel molecular que se traducen en alteraciones fenotípicas irreversibles en los procesos de maduración y crecimiento.**

4.2 Objetivo general

Estudiar el efecto del óxido nítrico en la mitocondria como causa de alteraciones moleculares y fenotípicas definitivas en el hipotiroidismo neonatal.

Objetivos específicos:

- 1) Establecer si el hipotiroidismo congénito altera el patrón de expresión y localización mitocondrial de nNOS durante el desarrollo perinatal del hígado y cerebro.
- 2) Correlacionar temporalmente los cambios en los niveles de NO mitocondrial con modificaciones en el metabolismo y dinámica mitocondrial durante el desarrollo hipotiroideo.
- 3) Evaluar los mecanismos por los cuales el NO genera alteraciones durante el desarrollo post-natal de hígado y cerebro a nivel de vías de señalización secundarias, como la activación de quinasas o modificación del patrón apoptótico/proliferativo.
- 4) Explorar posibles mecanismos por los cuales el aumento de la expresión mitocondrial de nNOS provoca las alteraciones del comportamiento observadas en el hipotiroidismo congénito.

MATERIALES Y MÉTODOS

5 MATERIALES

5.1 Reactivos y drogas

Metimazol (Gador SA - Argentina). L-NAME, Insulina porcina, peroxidasa de rábano, Proteinasa K, 3,3',5-Triiodo-L-thyronine, Citocromo *c*, calmodulina, BH₄, Tris, NADPH, NADH, FAD, FMN, sacarosa, glucosa, HEPES, EDTA, EGTA, succinato, glicerol, ditiotreitol, leupeptina, aprotinina, PMSF, Percoll, KCN, L-arginina, L- glutamina, manitol, BSA, Tween 20, Tritón X-100, DMSO, DAF-FM, DCFH-DA, DHE (Sigma Aldrich Chemical - St. Louis, MO, USA). Medio de Montaje FluorSave™ Reagent, ionóforo de Calcio A23147, Aprotinina, Leupeptina, Pepstatina, Geneticina (Merck KGaA, Darmstadt - Alemania). Lipofectamina 2000, SYBR® Green Real-Time PCR, TRIzol (Invitrogen, CA, USA). BromodesoxiUridina y anticuerpos primarios (Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, USA). Apoptag® Kit (Millipore – Merck KGaA, Darmstadt - Alemania), Taq DNA Polymerase, Reverse Transcriptase (M-MLV RT), Desoxinucleótidos Trifosfatos (dNTPs) (Promega - Wisconsin, USA). [3H] L- Arginina de NEN (Boston, MA, USA). L-[³⁵S]-Metionina (PerkinElmer Massachusetts, USA). Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Bio-Rad California, USA).

5.2 Anticuerpos

En la Tabla 2 se resumen los anticuerpos primarios utilizados en la presente tesis, con las diluciones y pesos moleculares correspondientes.

Para la detección de las proteínas a través de SDS-PAGE y Western Blot se utilizaron anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano (HRP) de Amersham (GE Healthcare). Los anticuerpos secundarios conjugados con fluoróforos Alexa Fluor 488 cabra anti-ratón y Alexa Fluor 555 cabra anti-conejo fueron adquiridos en Molecular Probes (Invitrogen, Argentina).

Materiales y métodos

Tabla 3. Diluciones utilizadas de cada anticuerpo de interés y de los correspondientes anticuerpos secundarios.

Anticuerpo	Marca	Peso Molecular (KDa)	Dilución Ab 1º	Dilución Ab 2º	Tipo de Ab secundario
nNOS	BD (aa 1095 a 1289)	155	1:1000	1:5000	Anti-ratón
nNOS	Santa Cruz (R20) (aa 1380 a 1429)	155	1:1000	1:5000	Anti-conejo
β-actina	Santa Cruz	42	1:2000	1:6000	Anti-cabra
Opa 1	BD	80	1:2000	1:8000	Anti-ratón
Mfn2	Santa Cruz	72	1:1000	1:5000	Anti-conejo
Dnml1	BD	80	1:2000	1:6000	Anti-ratón
ERK ½ total	Santa Cruz	44-42	1:1000	1:5000	Anti-conejo
P - ERK ½	Cell Signaling	44-42	1:1000	1:5000	Anti-conejo
JNK	Cell Signaling	46-54	1:1000	1:5000	Anti-ratón
P -JNK	Cell Signaling	46-54	1:1000	1:5000	Anti-conejo
Bax (P19)	Santa Cruz	23	1:500	1:3000	Anti-conejo
Bcl-2	Santa Cruz	26	1:500	1:3000	Anti-ratón
Tag V5	Invitrogen	---	1:5000	1:10000	Anti-ratón
Citocromo c	Santa Cruz	12	1:5000	1:15000	Anti-ratón
VDAC	Santa Cruz	35	1:2000	1:8000	Anti-cabra
Tom 40	Santa Cruz	40	1:2000	1:6000	Anti-conejo
BrdU	Santa Cruz	---	1:250	1:1000	Anti-ratón

5.3 Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos que se detallan en la Tabla 3 fueron diseñados con el programa Pri-Fi para DNAc con homología en rata, ratón humano de acuerdo a los criterios básicos de %CG y sintetizados, al igual que los oligo (dT), por Genbiotech e Invitrogen (Argentina). Los tamaños de los productos se corroboraron por corrida en un gel de agarosa 2%.

Tabla 4. Secuencia de primers para amplificar ADNc por qPCR.

Nombre del Gen	Primer sentido (5' a 3')	Primer antisentido (5' a 3')	producto de PCR (pb)	Tº de annealing
GAPDH	AGACAGCCGCATCTTCTTGT	TGATGGCAACAATGTCCACT	142	60
Mfn2	GCACCGCCATATAGAGGAAGG	CGCACAGACACAGGAAGAAGG	132	55
Drp-1	GACTTTGCTGATGCCTGTGG	GTTGCCTGTTGTCGGTTCC	207	60
Opa 1	TTGACCAAAGTAGACCTGGCAG	TGGTGTGCCTTTAGCATGCTTG	217	60
Nrgn	AGCCAAAATCCAGGCGACTT	GGGAAGTCTTGTCCTGCGA	221	55
Atf4	GGTGGCCAAGCACTTCAAAC	ACGTGGCCAAAAGCTCATCT	223	60
Prkcg	GGCAAGTTTAAGGAGCCCCA	GTTGTGGACCCAGGGAAGAC	187	60
Chp	CCAGAACTTGCCATCAACCC	TTGAGGGGTTCCGGTCCATT	163	60

6 MÉTODOS

6.1 Modelos animales de experimentación

6.1.1 Generación de los grupos de trabajo.

Para los experimentos se utilizaron ratas hembras preñadas de la cepa Wistar, de 200-300 gr. de peso, procedentes del Bioterio de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UBA y se siguieron los criterios de cuidado y uso de animales de laboratorio para investigación. El diseño experimental de la presente Tesis fue aprobado por el Comité de Bioética del Hospital de Clínicas "José de San Martín". En todos los casos los animales fueron mantenidos con un ciclo de luz-oscuridad de 12hs: 12hs y alimentados *ad libitum*.

Las ratas preñadas fueron separadas en grupo control y grupo hipotiroideo; a este último se le administró Metimazol 0,02% en el agua de bebida desde el día 9 de gestación hasta la finalización del esquema experimental. Al nacer, las crías se dividieron en tres grupos:

- Control : provenientes de hembras del grupo control
- Hipotiroideo: provenientes de hembras del grupo hipotiroideo por administración de metimazol hasta el día 15 a través de leche materna y luego en el agua de bebida.
- Hipotiroideo + L-NAME: crías que recibieron L-NAME entre los días post-natales 7-15 provenientes de madres del grupo hipotiroideo.

En cada etapa post-natal evaluada se tomaron los pesos en gramos de los animales para cada grupo. Finalmente se sacrificaron los diferentes grupos en los días post-natales 5, 15 y 30 (P5 – P15 y P30) por decapitación. Para los ensayos conductuales se utilizaron animales en los días post-natales 30 y 80 (P30 y P80 respectivamente).

Durante el esquema, se trató paralelamente un grupo hipotiroideo con 0,015 mg/kg/día de T3 como reemplazo hormonal, entre las etapas P5-P15.

Todos los animales fueron sacrificados por decapitación.

6.1.2 Generación del grupo Hipotiroideo + L-NAME por infusión continua.

La mitad de las crías de cada madre hipotiroidea fueron sometidas en el día post-natal 7 (P7) a implantación quirúrgica de bombas osmóticas Alzet[®] 1007D, de 1,5 cm de longitud x 0,5 cm de diámetro conteniendo el inhibidor de NOS, L-NAME. Se implantaron ~~en~~ bombas conteniendo: solución fisiológica a crías de madres controles, para ser utilizados como control de procedimiento; y bombas conteniendo L-NAME para realizar controles en los ensayos conductuales.

Se procedió a anestésiar a los animales por el método de enfriamiento, en una cama de hielo seco, se limpió la piel de la superficie dorsal del animal se clorhexidina (0,05%) y se realizó una incisión horizontal de 1,5 cm aproximadamente, 1 cm rostral a la base de la cola de manera de no interferir con la manipulación materna. Se extendió tejido subcutáneo con una pinza para crear un bolsillo mayor que el diámetro de la bomba. Se insertó la bomba en el bolsillo y la incisión se suturó con hilo absorbible (5-0 Maxon). Se puso en almohadilla térmica el animal hasta su recuperación. Todo el procedimiento se llevó a cabo en un promedio de tiempo de aproximadamente 2 minutos. Las bombas osmóticas se retiraron en el día post-natal 15 utilizando procedimientos similares, y cada animal fue identificado durante la anestesia. Se completó la anestesia con una solución tópica de Xylocaína 4% + clorhidrato de lidocaína 4%.

Finalizada la implantación, se trataron con ampicilina inyectable (10mg/Kg/día) y dexametasona tópica por 7 días.

La dosis de L-NAME administrada bajo el tratamiento descrito fue de 4mg/Kg/día, con un flujo de 0,5 µl/hr durante 7 días. De acuerdo a la bibliografía esta dosis es inferior a la dosis utilizadas de 14 mg/kg/día, en la que comienzan a observarse cambios en la presión arterial (Lahera, Salom et al. 1991).

6.2 Extracción de sangre para determinación de TSH

Se recolectó sangre por punción ventricular en animales bajo anestesia con ketamina (60 mg/kg de peso), se recolectó en tubos eppendorf sin anticoagulante y se incubó a 30°C por 1hr. Con el fin de obtener el suero, que fue conservado a -70°C hasta la determinación. Ésta se llevó a cabo en el laboratorio del Dr. Libertum IBYME-CONICET. Se graficaron los valores como ng/ml de TSH en función de cada estadío.

6.3 Obtención de homogenatos, citosol y mitocondrias purificadas

Luego de sacrificados los animales, se procedió a la extracción de cerebro e hígado de los animales. Se colocaron inmediatamente en 40 ml de *buffer* MSHE a 4 °C (0,23 M manitol, 70 mM sacarosa, 1 mM EGTA, 25 mM HEPES, pH 7,4) suplementado con antiproteasas (5 µg/ml de aprotinina, 5 µg/ml de leupeptina y 10 µg/ml pepstatina). A partir de aquí todo el procedimiento se realizó en baño de hielo. Los órganos fueron reducidos a pequeños trozos con tijera y homogeneizados en *potter* Evelheim, previo agregado de 100 µg/ml de PMSF. En esta etapa se tomaron muestras de cada grupo para constituir los *homogenatos* que se utilizarían para los lisados totales.

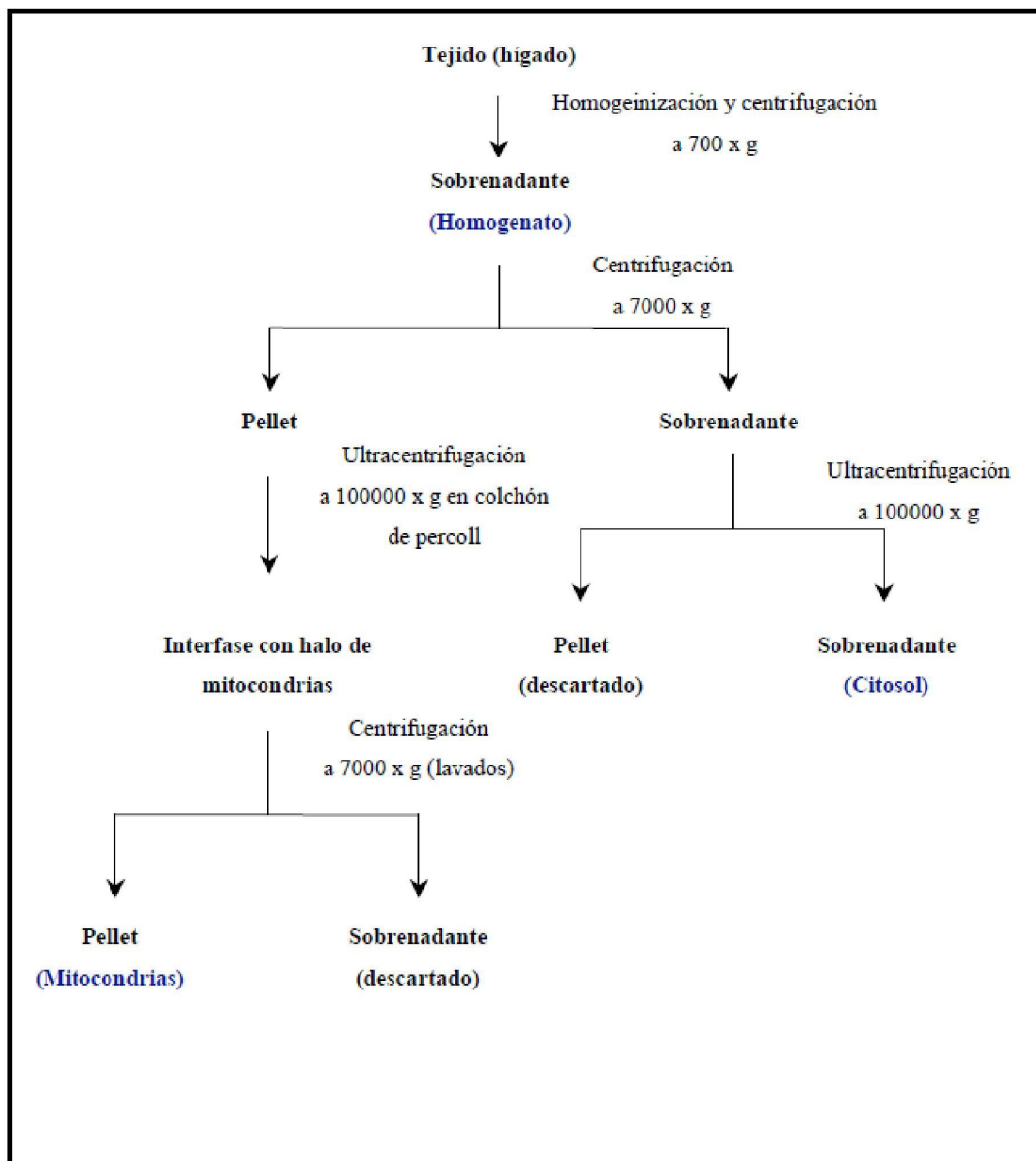
Por centrifugación a 700 x g durante 10 min a 4 °C se descartó el precipitado correspondiente al tejido no disgregado, células enteras y núcleos. El sobrenadante fue centrifugado a 10.000 x g durante 10 min a 4 °C para precipitar las mitocondrias. El nuevo sobrenadante se sometió a una ultracentrifugación a 100.000 x g durante 30 min a 4 °C y de esta manera se obtuvo la fracción *citosol*. El precipitado resultante de la centrifugación a 10.000 x g fue resuspendido en 2 ml de *buffer* MSHE con 0,1% seroalbúmina bovina (BSA) y 8 ml de *buffer* Percoll (30% Percoll, 0,23 M manitol, 0,07 M sacarosa, 0,5 mM EGTA, 2 mM HEPES, pH 7,4) y ultracentrifugado a 100.000 x g durante 30 min a 4 °C. Se recolectó la banda marrón más densa correspondiente a *la fracción mitocondrial* y se procedió a dos lavados con *buffer* MSHE con 0,1 % BSA, un lavado con 150 mM KCl para extraer la arginasa presente en la cara citosólica de la membrana externa mitocondrial y dos veces

Materiales y métodos

con *buffer* MSHE. El precipitado se resuspendió en 2 ml de *buffer* MSHE con antiproteasas, y corresponde a la fracción *mitocondrias purificadas* (Tatoyan and Giulivi 1998).

Nota: para la determinación de la presencia de Bax o Bcl-2 en la fracción mitocondrial por western blot, se reemplazó el lavado de 150mM KCl por un lavado adicional de MSHE.

El siguiente esquema resume los procedimientos descriptos:



Materiales y métodos

6.3.1 Tratamiento de la fracción mitocondrial con proteinasa K

Con el propósito de degradar las proteínas que se encuentran unidas a la cara citosólica de la membrana externa mitocondrial, 1 ml de una suspensión de mitocondrias purificadas en *buffer* MSHE en una concentración de 1 mg de proteína/ml se incubó con 10 μ l de proteinasa K (5 mg/ml, pH 8,0) durante 25 min en baño de hielo. La acción de la enzima fue interrumpida mediante el agregado de 30 μ l de PMSF (concentración final 1 mM) e incubación durante 10 min. Luego las muestras fueron centrifugadas a 12.000 x g durante 10 min a 4 °C, el sobrenadante fue descartado y el precipitado, resuspendido con 50 μ l de *buffer* MSHE. Las mitocondrias se conservaron en una concentración de 20 mg/ml y a -70 °C hasta ser utilizadas.

6.4 Cuantificación de proteínas por el Método de Bradford.

Este método se utilizó para medir muestras con una masa de proteínas dentro del rango de 0,1 a 2,0 μ g.

6.4.1 Preparación del reactivo

Se diluyó el reactivo comercial en la proporción 1:5, luego se filtró y se guardó en frasco color caramelo a 4°C hasta su uso. La técnica se desarrolló en microplaca de 96 pocillos con base plana.

6.4.2 Curva de calibración

Se utilizó una solución madre de 2 μ g/ μ l BSA y la curva de calibración se realizó con las siguientes concentraciones de BSA: 2 - 1- 0,5 - 0,25 - 0,125 μ g/ μ l. Se graficó la absorbancia en función de las concentraciones, para obtener la ecuación de la función.

6.4.3 Ensayo de muestras, controles y *pooles*

Se realizó por duplicado cada determinación. Cinco microlitros de muestra se colocaron en cada pocillo, luego se agregaron 20 μ l de agua destilada y 200 μ l del reactivo de

Materiales y métodos

Bradford. Se incubó durante 10 minutos. Luego se leyó la absorbancia a 595 nm y se calculó la concentración de proteínas interpolando en la curva de calibración.

6.5 SDS-PAGE y Western blot para detección de proteínas

6.5.1.1 Preparación de las muestras

Las proteínas aisladas de los lisados celulares fueron diluidas a la concentración deseada (25 µg totales) con buffer de siembra en un volumen final de 50 µl (Tris-HCl 10 mM, pH=8; SDS 1%; Glicerol 4%; sacarosa 0,146 M y azul de bromofenol; DTT 10 mM o β-mercaptoetanol 1%). Luego las muestras se calentaron durante 5 min a 100°C.

6.5.1.2 Electroforesis

Las muestras fueron preparadas como se describió anteriormente y se sembraron 30 µg de cada una por pocillo. Adicionalmente se sembró en otro pocillo el marcador de peso molecular Protein Page Ruler Marker (Fermentas). Se utilizó el sistema vertical de Bio-Rad. Las muestras se resolvieron en un gel de poliacrilamida 10% en condiciones desnaturalizantes a 15mA por gel, durante 40 minutos en presencia de buffer de electroforesis 1X (25 mM Tris; 192 mM Glicina; SDS 0,1%).

6.5.1.3 Transferencia a membrana de PVDF

Una vez concluida la separación electroforética, las proteínas fueron transferidas a un soporte sólido, en este caso un filtro de PVDF 0.4 (Hybond, Amersham Pharmacia). Una de las caras del gel fue apoyada sobre la membrana del mismo tamaño y ambos fueron colocados entre papeles Whatman 3M previamente humedecidos en buffer de transferencia (Towbin) 1X (Tris base 25 mM; glicina 192 mM; SDS 3,5 mM; pH=8,3 y metanol 20% (v/v)) y éstos a su vez colocados entre dos esponjas de poro grande y dentro de un soporte plástico. Toda la construcción fue sumergida en la cuba electroforética, con buffer de transferencia 1X, con la membrana del lado anódico. La transferencia se llevó a cabo a 100 Volts, durante 90 min. Se verificó que la transferencia fuese exitosa tiñendo las membranas con rojo Ponceau (0,1% Rojo Ponceau, 5% ácido acético). La decoloración de

Materiales y métodos

la membrana se llevó a cabo lavando varias veces con buffer TBS-T (NaCl 150 mM; KCl 2,68 mM; Tris base 24,7 mM; Tween-20 0,05% (v/v); pH=7,4).

6.5.1.4 Inmunodetección de proteínas

Para realizar la detección de las proteínas, en primer lugar se bloquearon las proteínas inespecíficas con TBS-T (Tween-20 0,05% (v/v) en 10 mM Tris-HCl; pH=7,4) con 5% (p/v) de leche en polvo durante 60 min. Luego las membranas se lavaron con TBS-T y se incubaron durante toda la noche a 4°C, con agitación suave, con los diferentes anticuerpos primarios diluidos en una solución de 5% de BSA en TBS-T. Después de realizar 3 lavados de 15 min con TBS-T con agitación suave, las membranas se incubaron con los anticuerpos secundarios anti-conejo (1:5.000) o anti-ratón (1:5.000), según el anticuerpo primario utilizado, acoplados a peroxidasa de rábano (HRP) y diluidos en TBS-T, durante 2 h, a 4°C, con agitación suave. Luego las membranas se lavaron con TBS-T. Para visualizar las proteínas se utilizó el kit de detección ECL (PBL, Quilmes Argentina), basado en la producción de quimioluminiscencia como consecuencia de la digestión de un sustrato de la enzima HRP. La visualización se llevó a cabo por exposición en placas fotográficas y posterior revelado. Las bandas se cuantificaron densitométricamente utilizando el programa Totallab y los resultados se normalizaron con actina β en caso de citosol y lisados o Tom40 en caso de fracción mitocondrial.

6.6 Ensayos Enzimáticos

6.6.1.1 Medición de actividad de NOS

La actividad de NOS en mitocondrias y citosol se determinó midiendo la conversión de [3H]L-arginina a [3H]L-citrulina, como fue previamente descrito por Knowles y Salter (1998), con modificaciones menores. Cada preparación (100 μ g de proteínas) fue incubada con 100 μ M L-Arg (para mitocondrias o citosoles), 5 μ l/ml [3H]L-arginina (Ae 53.4 Ci/mmol, 5 μ Ci.ml⁻¹), 100 μ M NADPH, 0,1 μ M calmodulina, 0,5 mM CaCl₂, 1 μ M FAD, 1 μ M FMN y 1 μ M tetrahidrobiopterina en un volumen final de 100 μ l. Luego de 10 minutos de incubación a 37°C la reacción fue detenida por el agregado de 300 μ l de *buffer* HEPES (HEPES 15 mM, H-EDTA 1,5 mM, pH 5.5). La [3H]L-arginina no consumida fue separada de

Materiales y métodos

la mezcla de reacción por agregado de una suspensión 1:2 de resina de intercambio catiónico Dowex AG 50WX-8. Esta mezcla fue agitada vigorosamente, para favorecer el pegado de la [3H]L-arginina a la resina y luego centrifugada 30 segundos a máxima velocidad. Se tomaron 400 µl del sobrenadante que fueron mezclados con 1 ml de líquido de centelleo. Las muestras se midieron durante 1 minuto en un contador de centelleo líquido para partículas beta (Wallac, 1414 Liquid centillation counter). Las cuentas por minuto (cpm) se convirtieron a nmoles [3H]L-citrulina.min⁻¹.mg proteína⁻¹ utilizando totales (muestras sin resina) y blancos (sin proteína). La actividad específica de NOS se determinó luego de restarse las cpm obtenidas en presencia de EGTA en una concentración de 2mM.

6.6.1.2 Medición de peróxido de hidrógeno en mitocondrias

La producción de H₂O₂ se monitoreó continuamente en un espectrofluorómetro Hitachi F-2000 (Hitachi Ltd, Tokio, Japón) con longitudes de onda de excitación y emisión de 315 y 425 nm respectivamente (Poderoso y col., 1996). El ensayo se realizó en 50 mM *buffer* fosfato, 50 mM L- valina, pH 7,4, suplementado con 12,5 U/ mL peroxidasa de rábano, 250 µM ácido phidroxifenilacético, y 0,15 mg/ml de proteína mitocondrial, con malato-glutamato 6 mM como sustrato para determinar la producción de H₂O₂ por el complejo I. Para explorar los efectos de la utilización del NO y la actividad de mtNOS sobre la velocidad de producción mitocondrial de H₂O₂ el ensayo se inició con 0,1 mM L- Arginina como se describe en el trabajo de (Riobo, Melani et al. 2002). Para determinar la tasa de producción de H₂O₂ dependiente de NO, se agregó 1 mM L-NAME a las preparaciones mitocondriales en los casos apropiados. Todas las variaciones fluorométricas en las diferentes condiciones se deben al H₂O₂, ya que son completamente inhibidas por 3 µM catalasa. Para uniformar la máxima tasa de producción de H₂O₂, en todos los casos las preparaciones mitocondriales fueron suplementadas con 1 mM SOD- *mimetic* TBAP.

6.6.1.3 Medición de la actividad del complejo I (NADH-ubiquinona reductasa)

Para la determinación de la actividad del complejo I se utilizaron mitocondrias frescas recién purificadas, debido a que el proceso de congelamiento-descongelamiento produce la pérdida de la integridad de las membranas mitocondriales con la subsecuente liberación

Materiales y métodos

de la enzima malato-deshidrogenasa. La actividad se determinó espectrofotométricamente a 30°C. Cincuenta microgramos de proteínas mitocondriales fueron incubados en 0,9 ml de *buffer* KPi 100 mM a pH 7,2. Se midió la reducción sensible a la inhibición por rotenona de 50 μ M 2,3-dimetoxi-6- metil-1,4-benzoquinona con 1 mM KCN como inhibidor de la citocromo oxidasa ($\epsilon_{550\text{nm}} = 21 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) y malato-glutamato 6 mM como sustrato, a 340 nm durante 120 segundos.

6.6.1.4 Medición de la actividad de Citocromo c oxidasa (Complejo IV)

La actividad de citocromo oxidasa fue monitoreada espectrofotométricamente por la oxidación de 50 μ M de citocromo c reducido en un espectrofotómetro Hitachi U-3000 a 550 nm ($\epsilon_{550\text{nm}} = 21 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$). La reacción se llevó a cabo con 50 μ g de proteína mitocondial en *buffer* KPi 100 mM pH 7,2 a 30°C. La velocidad de la reacción fue determinada como la pseudoconstante de primer orden k' y expresada como $k' \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}$ de prot^{-1} .

6.6.1.5 Preparación de citocromo c reducido

Se disolvieron 24,8 mg de citocromo c en 2 ml de *buffer* KPi 10 mM, pH 7,2 y se añadieron 10 mg de ácido ascórbico (reductor). Luego se pasó por una columna de Sephadex G25 para eliminar el ácido ascórbico en exceso, eluyendo con KPi 10 mM. Se tituló espectrofotométricamente a 550 nm haciendo una dilución previa 1:20 en *buffer* KPi 10 mM, pH 7,2. $\epsilon_{550\text{nm}}=21 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$

6.7 Aislamiento de células de hígado y cerebro

6.7.1 Aislamiento de hepatocitos

Una vez sacrificados los animales se procedió a la extracción del hígado. Se disgregó el tejido en pequeños trozos con tijeras curvas y se resuspendió en *buffer* Krebs/ HCO_3^- , 5mM glucosa, 0,5mM EGTA y antibióticos en tubo Falcon de 50ml (10ml/gr de tejido). Se incubó 15 min. en agitación (100 ciclos/min) a 37°C. Luego se centrifugaron a 400 rpm 2min descartando el sobrenadante para eliminar los glóbulos rojos y se resuspendieron en Krebs/ HCO_3^- con 5mM glucosa+ 2,55mM CaCl_2 y 0,5mg/ml de colagenasa, se realizó la

Materiales y métodos

digestión por 30 minutos a 37°. Finalizada la digestión, se recolectaron las células por centrifugación a 800 rpm, se resuspendieron en D-MEM F12 + 10% SFB y se filtran. Todos los buffers se gasearon con carbógeno 10 minutos antes de su uso. Se contaron las células en cámara de Neubauer. Se evaluó la viabilidad mediante el uso de Azul Tripan.

6.7.2 Aislamiento de células de cerebro

Se extrajo el cerebro y se colocó en placa de petri refrigerada y se eliminaron las meninges utilizando agujas y pinzas estériles. Se disgregó mecánicamente el tejido con un bisturí y tijera. Posteriormente, se incubó el tejido en buffer de digestión (tripsina-EDTA 0,25% en PBS) entre 10-15 minutos a 37°C en agitación (100 ciclos/min). Se finalizó la digestión con 3 ml de SFB y se filtraron las muestras con gasa estéril y se centrifugaron 10 min a 1100 rpm. Se resuspendió el pellet en DMEM-F12 alta glucosa + 10% SFB. Se contaron las células en cámara de Neubauer evaluando la viabilidad mediante el uso de Azul Tripan.

6.8 CITOMETRÍA DE FLUJO

6.8.1 Producción mitocondrial de NO

Las mitocondrias (1 mg proteínas/ml) se incubaron en *buffer* MSHE por 30 minutos a 37°C con 10 µM DAF-FM (diamino fluoresceína diacetato) y 0,5 µM MitoTracker (marcador de mitocondrias) y la fluorescencia resultante se midió por citometría de flujo en un Ortho Cytoron Absolute Flow-Cytometer (Johnson & Johnson, Raritan, NY). Se evaluaron los histogramas del número de eventos en función de la intensidad de fluorescencia para DAF-FM correspondiente al canal FL1.

6.8.2 Producción intracelular de especies reactivas del oxígeno (ROS)

La producción intracelular de ROS fue analizada mediante citometría de flujo. Brevemente, 10⁶ células se resuspendieron en HBSS (suplementado con 1mM CaCl₂ y 1mM MgCl₂, pH 7,4) y se incubaron con 5 µM 2', 7'- diclorofluoresceína diacetato (DHCF-DA) o 5 µM hidroetidina (HE) por 30 min a 37°C en oscuridad. Se utilizó yoduro de propidio (0,005%) para detectar las células muertas. Para cada análisis se adquirieron 20.000 eventos totales. Se evaluaron los histogramas del número de eventos en función de la

Materiales y métodos

intensidad de fluorescencia para DHCF o DHE correspondiente a los canales FL1 y FL3 respectivamente. Posteriormente se analizaron los datos con el software WinMDI 2.9.

6.9 Ensayos de inmunohistoquímica (ICH) en cortes de cerebro parafinados.

6.9.1 Ensayo de detección para BrdU.

La BrdU es un análogo de timidina que se incorpora en células durante la síntesis de ADN, de manera que indica las células que se hallan en división. Para realizar la incorporación de BrdU, los grupos control, hipotiroideo e hipotiroideo infundido con L-NAME, recibieron tres días antes de su sacrificio en cada estadio P5- P15 y P30 inyección subcutánea de 30mg/kg BrdU, que luego permita monitorear proliferación en cortes histológicos de cerebro.

Para realizar la fijación del cerebro los animales fueron anestesiados con Ketamina 100mg/Kg y perfundidos a través de punción en el ventrículo izquierdo con solución de Hanks y luego paraformaldehído 2%. Finalmente, se removió el cerebro y se lo fijó en una solución de paraformaldehído 10% hasta el momento de la inclusión. La inclusión en parafina y cortes fueron llevados a cabo en el Departamento de Fisiopatología de la Facultad de Medicina.

Se procedió a desparafinar cortes histológicos de cerebro de la siguiente manera:

- 3 cambios de Xilol (5 minutos)
- 2 cambios de Etanol 100% (5 minutos)
- 1 cambio de Etanol 95% (3 minutos) seguido de un cambio de Etanol 70% (3 minutos)
- Lavado con agua de grifo

En el corte hidratado, se realizó una exposición de epítipo por tratamiento 15 min. a T^o ambiente con HCl 2N, neutralizado mediante tetraborato de Na pH 8 y luego se realizó el bloqueo de sitios inespecíficos mediante incubación de los cortes con una solución de SFB3%, triton X-100 0,3% en PBS durante 2hs. Como paso posterior, se incubaron los cortes en cámara húmeda a 4°C con Ac-BrdU durante toda la noche. Finalmente se

Materiales y métodos

evidenció mediante marcación indirecta durante 1hr. a T^o ambiente con un anticuerpo secundario conjugado con Alexa Fluor 564, los núcleos se marcaron con de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) 1µg/ml en PBS durante 10 minutos, seguido de tres lavados y posterior montaje.

6.9.2 Ensayo de TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP Nick end labelling)

Se procedió al desparafinado de las muestras, previamente fijadas en 10% formalina y embebidas en parafina como se indicó anteriormente. Se utilizó el *kit* Apoptag Plus In Situ Apoptosis Fluorescein Detection Kit (Chemicon) que consiste en la detección de los extremos 3'-HO de ADN dañado. En un primer paso, se tratan los cortes con una solución de proteínasa K de 20µg/ml para disgregar el material extracelular, luego se neutraliza la enzima y se procede a la reacción en la que la enzima desoxinucleotidiltransferasa Terminal (TdT) adiciona un oligómero de nucleótidos. Dicho oligómero es una secuencia *random* de digoxigenina y nucleótidos no marcados, esta reacción se lleva a cabo durante 1 hora a 37°C. Luego se evidenció con el uso de un anticuerpo contra digoxigenina conjugado con fluoresceína, por incubación de los cortes 2 horas a temperatura ambiente. Se utilizó 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) en el medio de montaje para la tinción de los núcleos. Se consideraron células apoptóticas aquellas con núcleo fluorescente y se cuantificaron mediante la observación de 10 campos observados en microscopio de fluorescencia. Se expresaron los resultados como núcleos positivos/núcleos totales.

6.10 EXTRACCIÓN DE ARN

Se homogenizó el tejido en trizol (25 mg de tejido en 1 ml trizol) en homogenizador de vidrio pequeño estéril. Luego se centrifugó a 12.000 x g por 10 minutos. El sobrenadante se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos y se le agregaron 0,2 ml de cloroformo. Se mezcló vigorosamente y luego se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 3 minutos. Se centrifugó a 11.500 x g por 15 minutos (2-8°C). Se tomó con cuidado la fase acuosa, a la cual se le agregaron 0,5 ml de isopropanol. Se agitó con *vortex* y se dejó a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se volvió a centrifugar a 11.500 x g

Materiales y métodos

por 10 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se agregó un 1 ml de etanol 75% para lavar el pellet. Se agitó con *vortex* y se recentrifugó a 7.500 x g durante 5 minutos. Se secó bien el pellet y luego se lo disolvió en H₂O DEPC.

Se midió la absorbancia a 260 nm (ácidos nucleicos) y a 280 nm (proteínas con aminoácidos aromáticos) para las muestras (10 µl muestra + 490 µl de H₂O destilada o 2 µl muestra + 180 µl de H₂O destilada si se tiene poco volumen final de RNA) y se calculó la relación A₂₆₀/A₂₈₀ (índice de contaminación de RNA con proteínas. Se espera un índice en el rango de 1-2). Se calculó la concentración de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$A_{260} \times 40 \text{ (factor de absortividad)} \times 50 \text{ (factor de dilución)} = \mu\text{g RNA/ml}$$

6.11 RT-PCR

El ADNc (ADN copia) se sintetizó a partir del ARN total mediante transcripción reversa o retrotranscripción (RT). Para realizar la RT se usaron 2 µg de RNA en 10 µl finales (llevando a volumen final con H₂O DEPC) por tubo. Se trabajó sobre hielo y se prepararon dos juegos de tubos: muestras sin y con retrotranscriptasa. Se preparó la mezcla de reacción para RT usando el kit de Promega (por tubo y para un volumen final de reacción de 20 µl : 4 µl *Buffer* 5X, 1 µl dNTPs mix (1 mM), 0,25 µl OligodT (25 ng), 0,5 µl RNAsin (20U), 3,25 µl H₂O DEPC, 1 µl de retrotranscriptasa (200U) o H₂O DEPC). Se mezclaron 10 µl de mix con 10 µl de la muestra. Se llevó al ciclador y se ejecutó el siguiente programa para la RT:

- 39°C x 1 hora.
- 65°C x 10 minuto.
- 4°C x infinito (hold).

Luego las muestras fueron guardadas a 4°C hasta realizar la PCR.

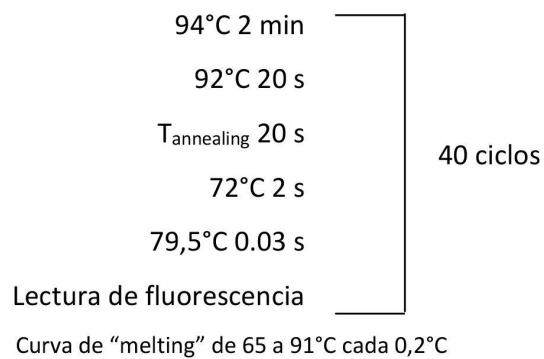
6.12 PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR)

El ADNc se amplificó por qPCR utilizando 1 µl del ADNc obtenido en la RT, se amplificó en una mezcla de reacción con buffer de reacción (1X); MgCl₂ (2 mM); oligos específicos (0,4 µM); dNTPs (0,2 mM); 0,025 µl de SYBRgreen y 0,03 U/µl de Taq ADN polimerasa

Materiales y métodos

recombinante (Promega) en un volumen final de 25 μ l. Los primers utilizados se encuentran en la Tabla 1.

La reacción de PCR se llevó a cabo en un aparato DNA Engine Opticon (MJ Research). El programa de amplificación se detalla a continuación:



Cada reacción de qPCR se realizó por duplicado y cada experimento se repitió al menos dos veces. Los datos obtenidos se analizaron utilizando el software Opticon 3 trazando una recta en la parte exponencial de la curva de amplificación y obteniendo así los valores de C_T . El cálculo de la inducción de la expresión de los genes analizados se basa en el método del $\Delta\Delta C_T$ (Current Protocols in Molecular Biology). Se estimó el promedio de los valores de C_T para el gen incógnita y para el NoRT (ARN que había sido incubado en las condiciones de la reacción de RT, pero en ausencia de la enzima retro-transcriptasa) de la siguiente manera:

$$C_T = (C_{T1} + C_{T2})/2 \quad (1)$$

La diferencia en los valores de C_T entre cada muestra y el No RT determina el delta- C_T (ΔC_T). Esto se resume en la siguiente expresión:

$$\Delta C_T = (C_{T\text{NoRT}}) - (C_T^{\text{muestra}}) \quad (2)$$

Materiales y métodos

Una vez normalizado y debido al exponente natural de qPCR, los valores son transformados a medidas relativas de veces de inducción (VI_a) para una mejor comparación entre los experimentos:

$$VI_a = 2^{\Delta CT} \quad (3)$$

Luego, se normalizaron nuevamente los niveles de ADNc de las muestras con su correspondiente control de carga (Actina) de la siguiente manera:

$$VI_b = VI_{a\text{muestra}} / VI_{a\text{GAPDH}} \quad (4)$$

Donde VI_b representa las veces de inducción normalizada a GAPDH. Finalmente, los datos se normalizaron respecto al control (VI_n).

$$VI_n = VI_b \text{ muestra} / VI_b \text{ control} \quad (5)$$

Para el cálculo de errores de cada medición se obtuvo el desvío estándar (ds) de las mediciones del C_T de las muestras tratadas y no tratadas del gen y del control de GAPDH de los datos obtenidos para cada tratamiento:

$$ds = \sqrt{\frac{\sum(C_T + \bar{C}_T)^2}{n-1}} \quad (6)$$

Donde n es el tamaño de la muestra.

Luego, el error se calculó como la raíz cuadrada de la suma de los errores de los C_T de las muestras, de los C_T de los No RT y de los C_T de GAPDH (Smith *et al.* 2004), aplicando la siguiente fórmula:

$$E = [(ds/ C_T)^2 \text{ muestra} + (ds/ C_T)^2 \text{ noRT} + (ds/ C_T)^2 \text{ GAPDH}]^{1/2} \quad (7)$$

Estos datos se multiplicaron por las veces de inducción finales.

6.12.1 Corrida electroforética en gel de agarosa 2%

Se preparó el gel solubilizando 2g de agarosa en 100 ml de TAE 1X. Se agregaron 5 µl del colorante SYBR® Safe Invitrogen (10 mg/ml). Luego se vertió el contenido en la cuba y se dejó gelificar. Se sembró todo el volumen de producto de qPCR + 7-10 µl de *buffer* de siembra 2X, 5 µl de marcador de ADN de 100pb + 5 µl de *buffer* de siembra 2X. El gel se corrió en buffer TAE 1X, a 100 V aproximadamente durante 20-30 minutos. El gel se sacó de la cuba y se observaron las bandas de los productos de PCR en el transiluminador (luz UV). A continuación, se tomó una foto digital para tener registro del experimento.

6.13 Ensayos de Conducta

Las alteraciones provocadas por el hipotiroidismo durante el desarrollo del SNC junto a los cambios fisiológicos que genera la enfermedad, originan como consecuencia directa, alteraciones en los patrones comportamentales. Entre las anomalías más comunes se encuentran, el retraso mental, ansiedad, problemas de aprendizaje, retraso en la habilidad locomotora y en la actividad (Shimokawa, Yousefi et al. 2014).

En forma experimental, las anomalías conductuales se evalúan de manera sencilla en paradigmas ensayados en animales de laboratorio. El paradigma de *open field* constituye el método más simple para explorar ansiedad, y aprendizaje (Wahlsten 2011).

En esta tesis se llevaron a cabo los paradigmas de *open field* y *Grip Strength test* con el fin de determinar aprendizaje, ansiedad en el primero y desarrollo del sistema motor en el segundo. Los grupos utilizados fueron los grupos de trabajo: control, hipotiroideo e hipotiroideo + L-NAME; sumando un grupo adicional de animales controles tratados con L-NAME, para corroborar que las modificaciones en los patrones de conducta se deben al hipotiroidismo generado por metimazol y no por la administración de L-NAME. La evaluación se realizó a los 30 y 80 días utilizando machos que se mantuvieron en jaulas separadas de acuerdo a los grupos con todos los animales identificados. En el día 30 se finalizó la administración de metimazol.

Materiales y métodos

En el ensayo de *open field* el hipotiroidismo generalmente conduce a modificar las conductas exploratorias en un ambiente abierto, en el que se evalúa el tiempo de permanencia expuestos, así como el tiempo para adaptarse a este comportamiento. Otro parámetro modificado durante el hipotiroidismo congénito así como post-natal lo constituye el comportamiento denominado rearing que es el levantamiento del animal sobre sus patas traseras e indica ansiedad. Es importante destacar en el análisis que los patrones conductuales varía mucho según el momento del desarrollo, la droga utilizada para generar hipotiroidismo y a menudo, el hipotiroidismo no sólo conduce a un comportamiento depresivo sino que incrementa la ansiedad (Pineda-Reynoso, Cano-Europa et al. 2010, Haba, Nishigori et al. 2014).

6.13.1 Open field

La prueba de campo abierto se realizó en los días 30 y 80 post-natales con el fin de ensayar la evolución en el aprendizaje. La unidad que se utilizó para el ensayo consistió en una caja (ancho 450 mm, profundidad 450 mm, altura 200 mm). La arena está dividida en 16 cuadrados y organizada en los sectores periféricos y centrales. El sector periférico consistió en los cuadrados cercanos a la pared y el sector central consistía en las cuatro plazas centrales. La actividad motora era detectada sobre la base de la posición analizada y de la frecuencia que las ratas atravesaban las diferentes zonas, identificando los siguientes parámetros: número de cruces centrales y periféricos, rearings (elevación del animal sobre sus patas traseras) y el tiempo total en el centro. Al comienzo de la 5-min sesión, los animales se colocaron en el centro de la arena. Los animales fueron supervisados continuamente durante 5 min y los datos sobre la actividad locomotora analizados como bloques de 1-min. Se evaluó la diferencia entre el primer minuto a los restantes como adaptación. El aparato fue limpiado entre las evaluaciones con una solución de etanol al 20%.

6.13.2 Grip Strength test

La prueba de agarre (o prensil) se presume que es una medida de la fuerza muscular y equilibrio. La rata debe sujetar un palo horizontal con sus patas delanteras para permanecer suspendida y no caer. El desempeño se evalúa como el tiempo en que la rata permanece suspendida (Sala-Roca, Marti-Carbonell et al. 2002, Darbra, Garau et al. 2003). Las ratas se probaron en los días post-natales 30 y 80. Se utilizó un palo horizontal de madera (diámetro, 7 mm) con una superficie rugosa, en posición horizontal entre dos stands. El palo se colocó 30-50 cm por encima del suelo, de acuerdo con la edad de los animales. Las ratas se ensayaron en un orden aleatorio, y se tomó el tiempo en segundos para cada animal. Se asistió al animal hasta que sus extremidades anteriores se pusieron en contacto con el palo de madera y logró sujetarse. Una vez que al animal se sujetó al palo, se grabó la latencia en caer del mismo con un cronómetro. Si el animal no lograba la sujeción correcta y caía en forma inmediata se lo colocaba una segunda vez. Se llevaron a cabo seis ensayos seguidos sucesivamente por 2 min de intervalo de descanso, para cada animal en cada grupo, y los valores se calcularon como un promedio para cada animal. Las condiciones experimentales habitaciones (luz y temperatura) y el calendario fueron consistentes en todos los ensayos.

6.14 Análisis Estadísticos

La evaluación estadística de los datos se realizó en base a los valores promedios y desvío estándar (SD) o promedio de error estándar (S.E.M) de “n” experimentos independientes. Se utilizaron para el análisis de datos ANOVA de dos vías con test de Bonferroni comparando todos los grupos y ANOVA de una vía para el análisis de diferencias dentro de cada grupo, con $P < 0,05$ como criterio para la significancia estadística.

RESULTADOS

7 EFECTO DEL METIMAZOL DURANTE LA GESTACIÓN Y EL CRECIMIENTO PERINATAL COMO MODELO DE HIPOTIROIDISMO CONGÉNITO

7.1 Niveles de TSH séricos

La producción de hormonas tiroideas es controlada por la tirotrópina sérica (TSH), sintetizada por la glándula pituitaria en respuesta a la hormona liberadora de tirotrópina (TRH), la cual es secretada por el hipotálamo. Tanto T3 como T4 ejercen regulación negativa en la síntesis y liberación de TSH con el fin de mantener los niveles de hormonas tiroideas circulantes dentro de los rangos fisiológicos requeridos. De esta manera, los valores de TSH séricos constituyen una herramienta esencial en el diagnóstico y supervisión de diferentes desórdenes tiroideos. Para determinar si el metimazol administrado durante el período gestacional y post-natal logró inducir hipotiroidismo congénito se determinaron los niveles séricos de TSH y se compararon con los esperados para cada estadio post-natal (Hood, Liu et al. 1999)

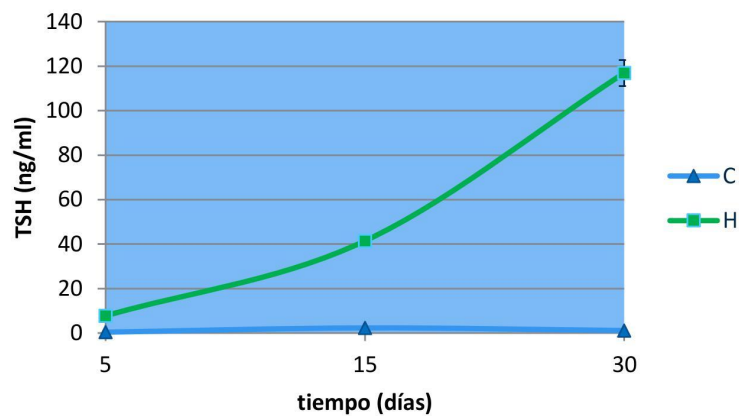


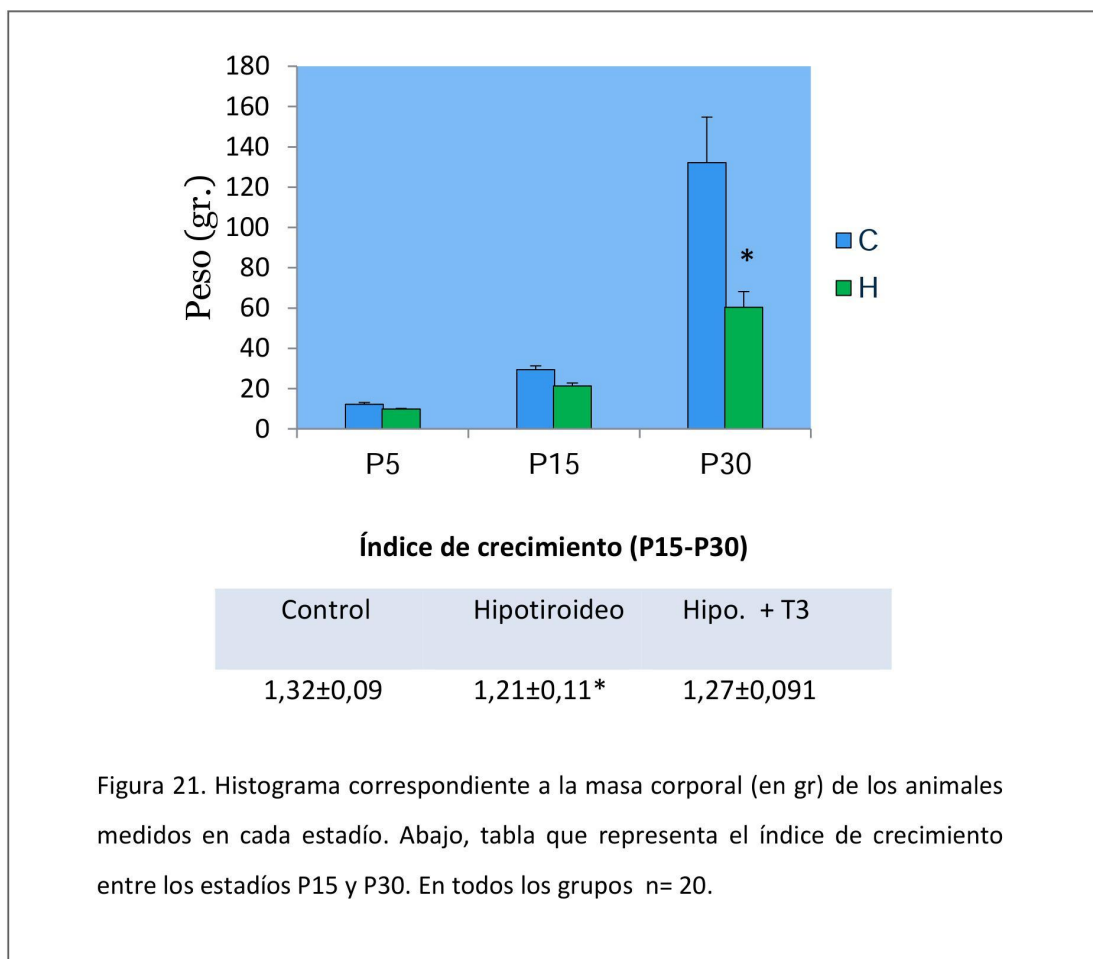
Figura 20. Gráfico que corresponde a los valores de TSH (ng/ml) en función de los estadios post-natales. Se evaluaron 7 animales por grupo.

Resultados

El metimazol administrado a partir del día gestacional 9 produjo un incremento en los valores de TSH a partir del día post-natal 15, hasta el día 30 con valores máximos de 115 ng/ml, mientras que los animales control no presentaron valores mayores a 2 ng/ml a lo largo de todo el desarrollo perinatal.

7.2 Crecimiento perinatal

La evaluación del crecimiento se evidenció como una disminución en el peso corporal del grupo hipotiroideo que comienza a ser significativo a partir de P15 logrando una reducción del 46% ($p < 0,02$) en P30. A su vez si representamos el crecimiento como la ganancia de peso en función del desarrollo perinatal observamos que la administración de T3 en los días 10-15 pudo revertir parcialmente éste índice de crecimiento entre P15 y 30.



8 PATRÓN DE EXPRESIÓN, LOCALIZACIÓN y ACTIVIDAD DE nNOS EN EL DESARROLLO HIPOTIROIDEO DEL HÍGADO DE RATA.

8.1.1 Análisis de la expresión de nNOS en fracciones subcelulares de hígado.

La expresión de nNOS a lo largo del desarrollo postnatal, fue evaluada por medio de *Western blots* de las fracciones citosólica y mitocondrial purificadas de hígado de rata en condiciones normales o bajo hipotiroidismo congénito. Se utilizaron, actina y Tom40 como normalizadores de las fracciones citosólicas y mitocondriales respectivamente.

Como se había reportado anteriormente, la expresión de nNOS es baja o nula durante el desarrollo perinatal en el hígado de rata, no observándose diferencias significativas en las fracciones subcelulares estudiadas (Inukai, Uchida et al. 2010). Sin embargo, el desarrollo hipotiroideo moduló claramente el patrón de expresión de nNOS, en el cual se observó una diferencia significativa en el día 30 postnatal de los animales hipotiroideos respecto al desarrollo normal en ese estadio. Este incremento se manifestó en ambas fracciones, citosólicas y mitocondriales; en estas últimas, el tratamiento de los animales hipotiroideos con L-NAME generó una disminución significativa de la expresión que comienza en P15 con el tratamiento y perdura hasta P30 (Figura 21).

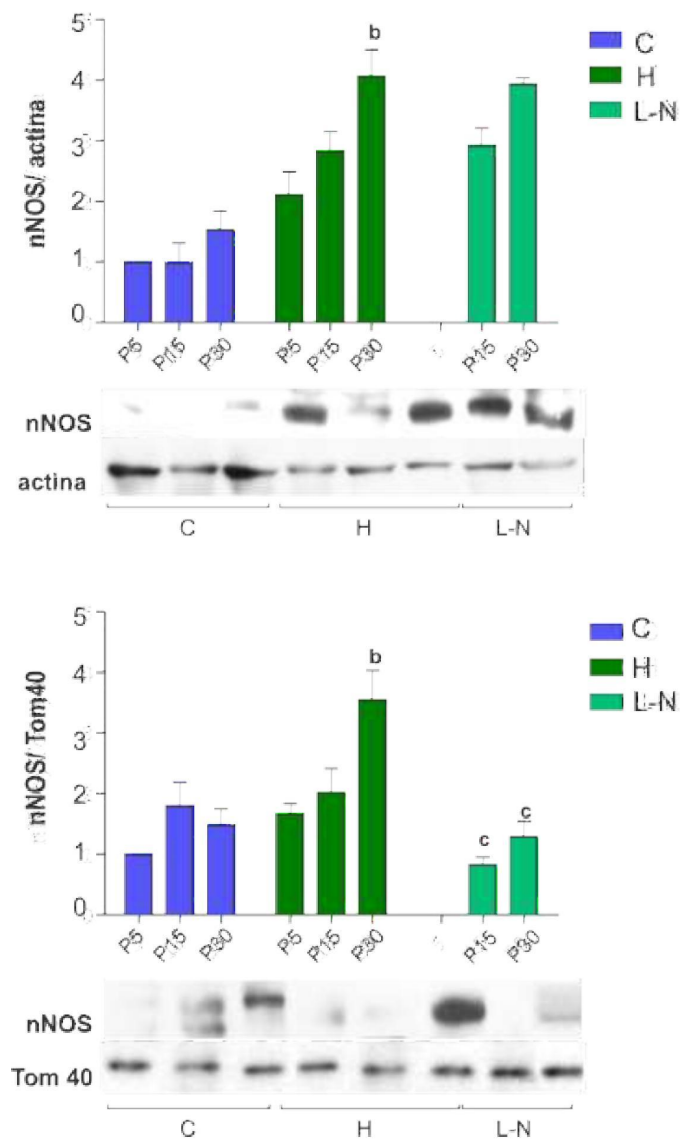


Figura 21. Expresión de nNOS en las etapas post-natales del desarrollo en los modelos experimentales. Se evaluó la expresión proteica en las fracciones citosólicas y mitocondriales de hígado. Se muestran los *Western Blot* representativos y las densitometrías correspondientes (n=5). **b**: diferencias significativas entre el grupo control e hipotiroideo para cada estadio ($p < 0,05$), **c**: diferencias significativas entre los grupos hipotiroideos y tratados con L-NAME en cada estadio ($p < 0,001$). C: control, H: hipotiroideo , L-N: hipotiroideo + L-NAME.

8.1.2 Evaluación de la actividad y producción de NO en el hígado.

Basándonos en la regulación de la expresión que ejerce el hipotiroidismo durante el desarrollo y teniendo en cuenta la existencia de otros factores que podrían modular la actividad enzimática; decidimos ensayar la actividad de nNOS dependiente de calcio. Para ello utilizamos el método de conversión de L-[³H]arginina a L-[³H]citrulina en las diferentes fracciones subcelulares de hígado. Se utilizaron fracciones frescas, pero las mitocondrias fueron congeladas - descongeladas 3 ciclos para romper las membranas y permitir que los co-factores lleguen a la enzima internalizada.

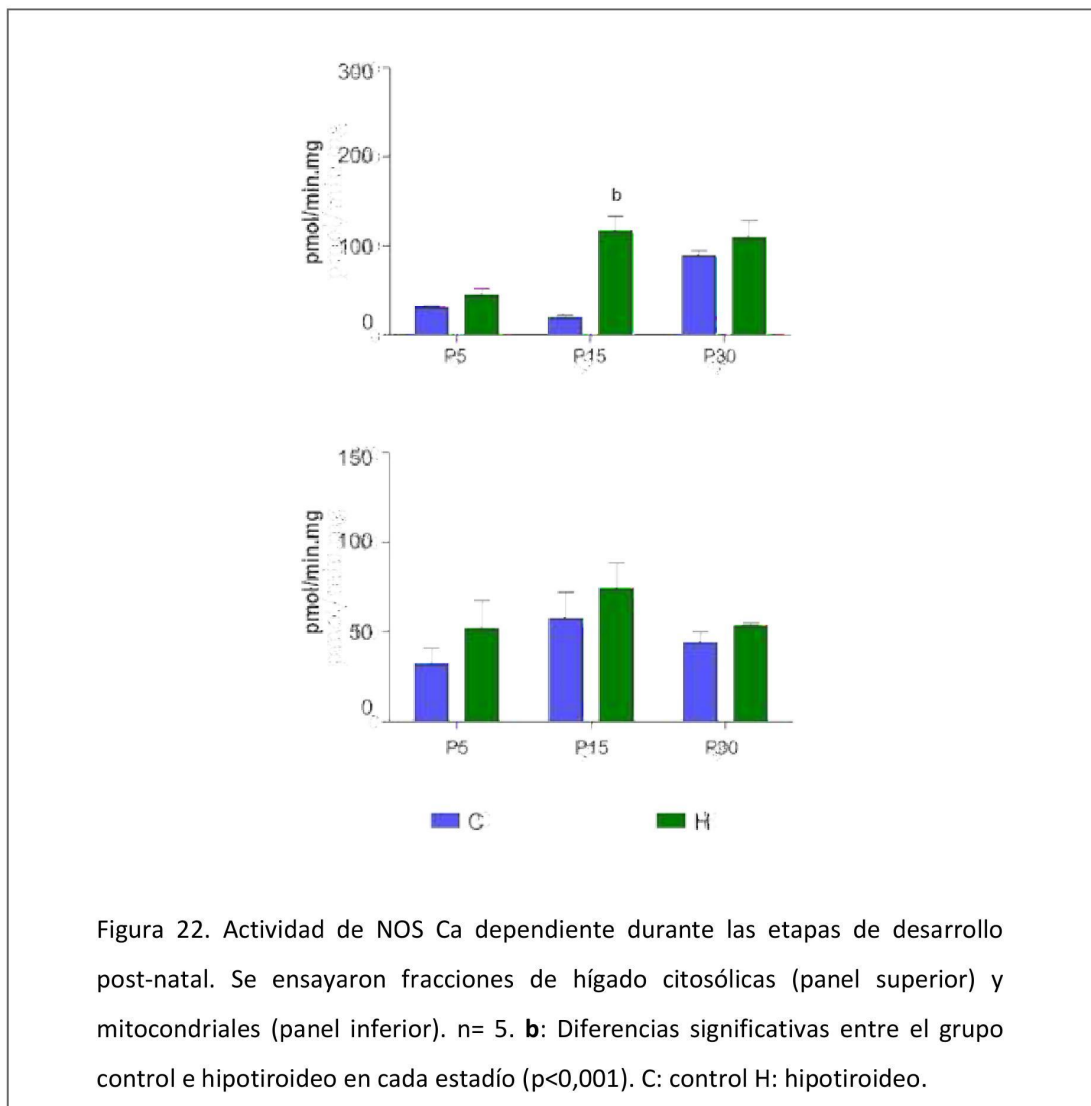
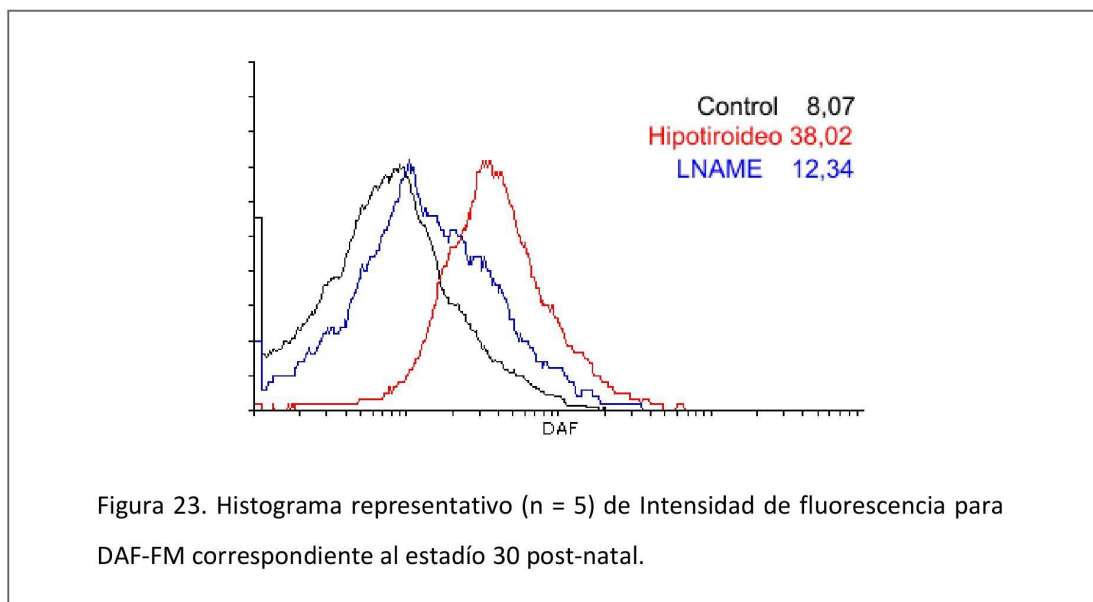


Figura 22. Actividad de NOS Ca dependiente durante las etapas de desarrollo post-natal. Se ensayaron fracciones de hígado citosólicas (panel superior) y mitocondriales (panel inferior). n = 5. **b**: Diferencias significativas entre el grupo control e hipotiroideo en cada estadio (p<0,001). C: control H: hipotiroideo.

Resultados

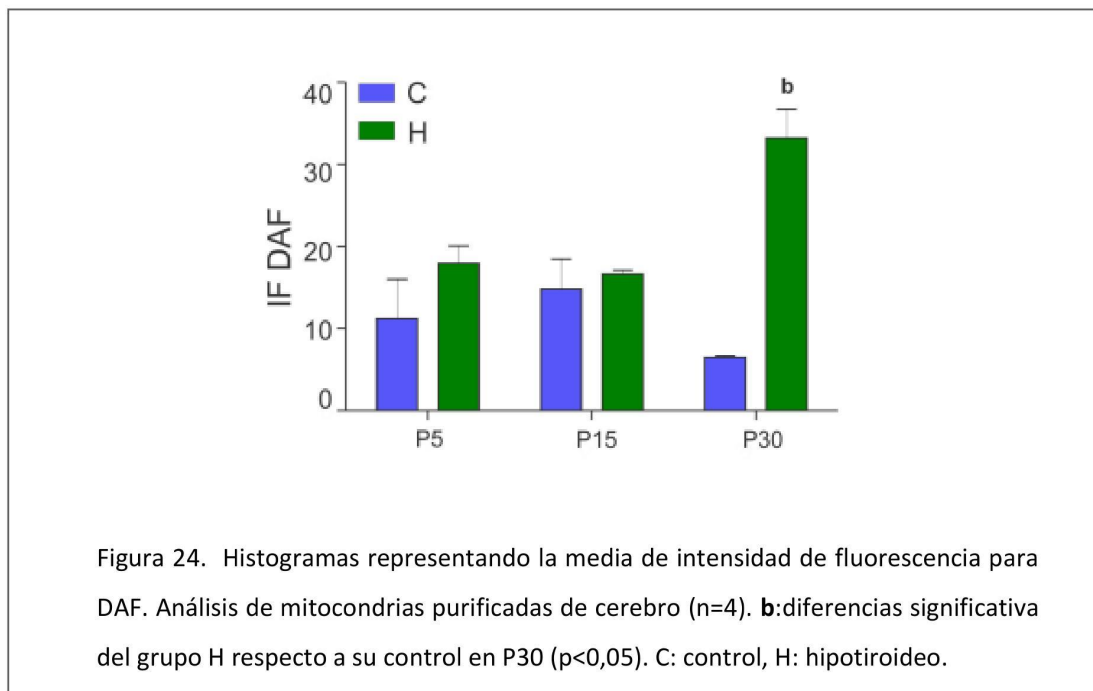
Los resultados de actividad de NOS mostraron que en el desarrollo normal se incrementó la actividad citosólica del día 30 post-natal, mientras que el hipotiroidismo condujo en citosol a un aumento marcado de la actividad en P15 respecto a su control del mismo estadio. Sin embargo, la actividad en las fracciones mitocondriales de hígado no se modificó por el hipotiroidismo.

Para confirmar la producción mitocondrial de NO observada por medición de 3H-L-citrulina, mitocondrias purificadas de hígado de rata de los distintos grupos se incubaron con el colorante 4-amino-5-metilamino-2',7'-difluoresceína di acetato (DAF-FM) que reacciona con NO y con mitotracker como marcador de la población mitocondrial. Se determinó la media de intensidad de fluorescencia (IF) para DAF mediante citometría de flujo y se representaron los histogramas como veces de incremento del IF del grupo hipotiroideo vs control para cada estadio post-natal. Como se puede observar en el histograma representativo Figura 23 la producción de NO disminuye en presencia de L-NAME.



Resultados

Como se puede ver en la Figura 24, la producción de NO medida por incorporación de DAF reveló que el grupo hipotiroideo en P30 incrementó 3 veces los niveles de producción respecto del grupo control en el mismo estadio. Este resultado fue consistente con la expresión ensayada por western blot en fracciones mitocondriales.



8.2 EFECTOS DEL NO EN METABOLISMO Y FUNCIÓN MITOCONDRIAL PRODUCIDOS DURANTE DESARROLLO HEPÁTICO DE ANIMALES HIPOTIROIDEOS.

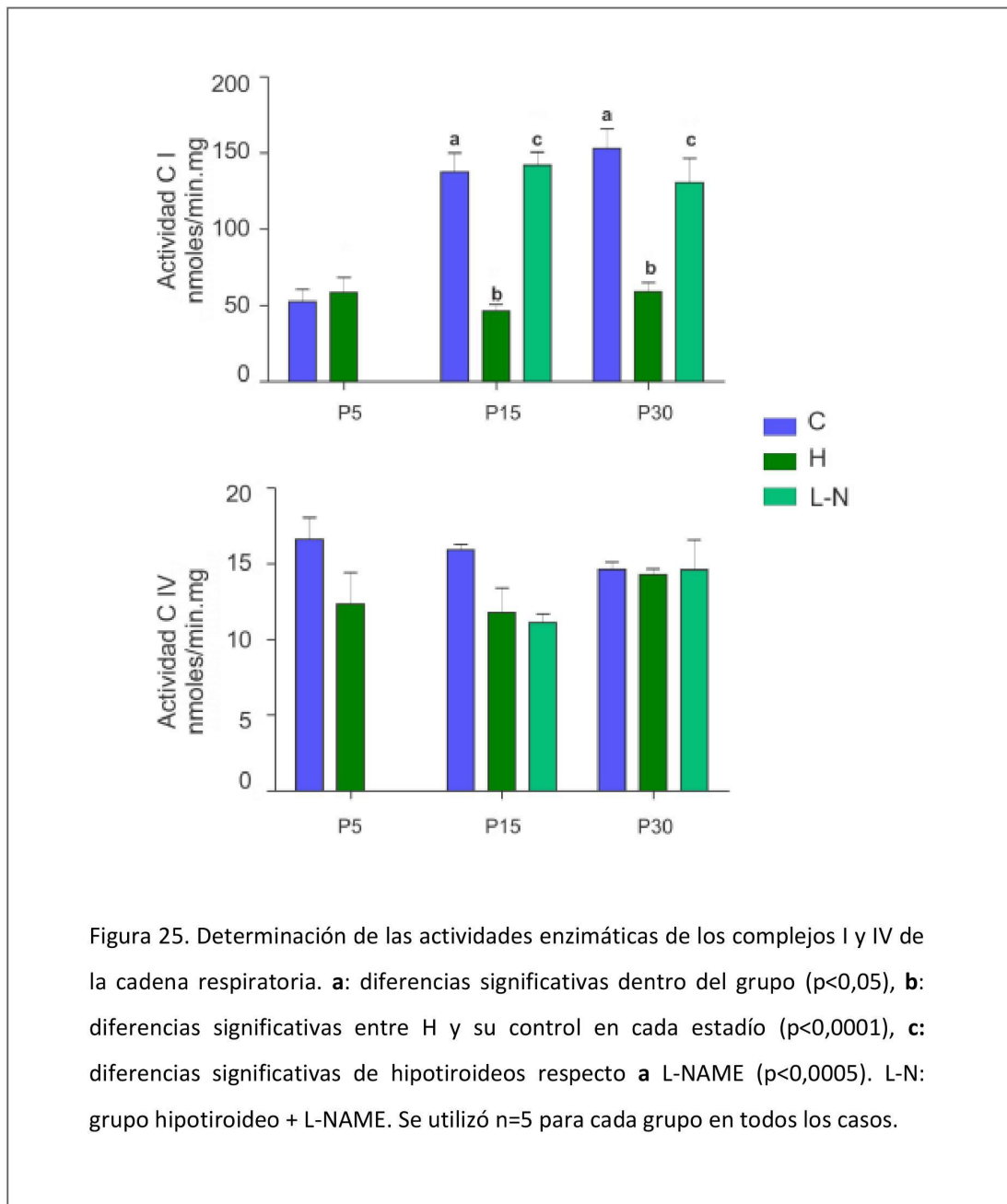
Trabajos previos en nuestro laboratorio permiten asociar la expresión mitocondrial de nNOS y la producción de NO a la disminución de la actividad de los complejos de la cadena respiratoria y al desbalance en el estado redox celular (Franco, Riobó). Teniendo en cuenta que el hipotiroidismo congénito puede modificar los patrones de expresión y

Resultados

actividad de nNOS durante el desarrollo perinatal decidimos estudiar dichas actividades en fracciones mitocondriales purificadas de hígado.

8.2.1 Actividad de los complejos I y IV de la cadena respiratoria mitocondrial en el hígado

En P5 la actividad de complejo I es baja tanto para controles como hipotiroideos. En los estadíos P15 y P30, el hipotiroidismo condujo a una inhibición de la actividad del complejo I (**b** $p < 0,001$). Por otro lado, la administración de L-NAME a ratas hipotiroideas revirtió la disminución de la actividad del complejo I, llevándola a valores iguales a los determinados para el grupo control. Sin embargo las actividades para el complejo IV mitocondrial no se modificaron por el hipotiroidismo.

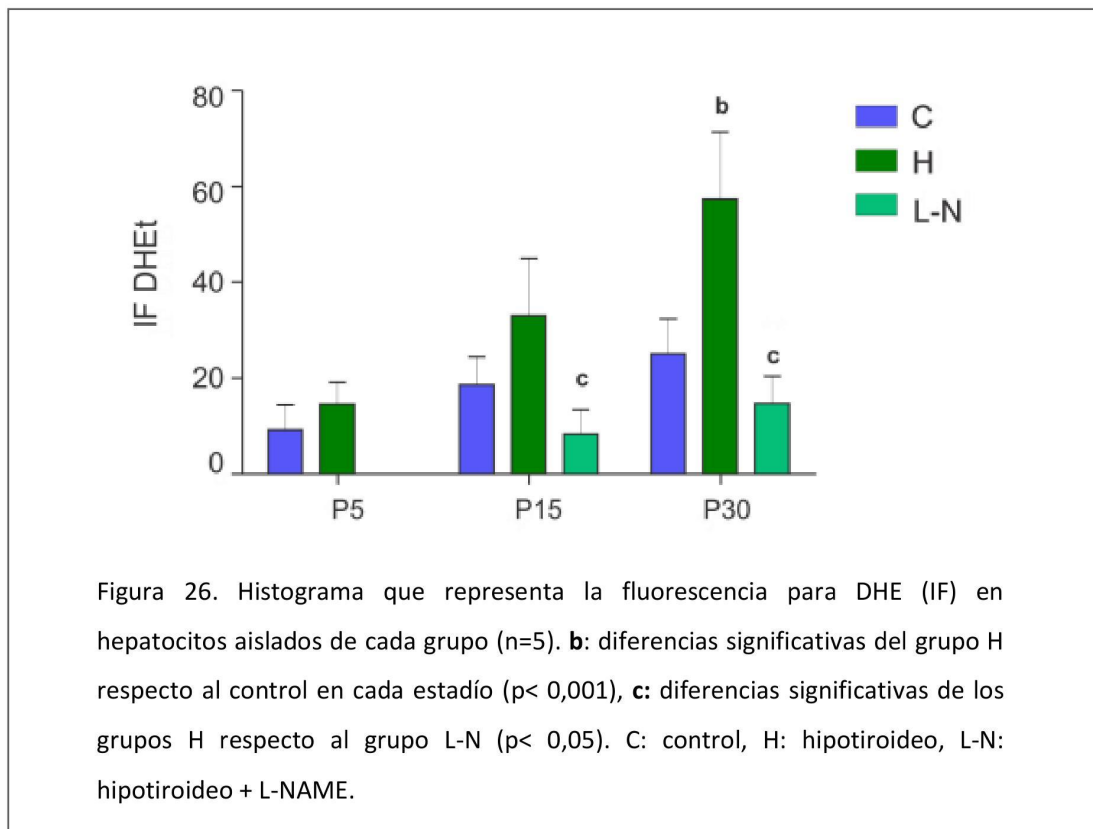


8.2.2 Determinación de la producción de superóxido.

Se evaluó la producción de superóxido sensible a L-NAME por citometría de flujo en hepatocitos aislados a partir de los hígados de ratas de los distintos grupos, como se

Resultados

detalla en materiales y métodos. Para la marcación se utilizó hidroetidina (HE) y se representó la media de la intensidad de fluorescencia IF para cada grupo. Como indica la figura 26, el hipotiroidismo incrementó en forma significativa la producción de O_2^- en P30, y tanto en P15 como P30, la infusión de L-NAME a animales hipotiroideos logró reducir la producción de superóxido hasta valores menores que los observados en los controles. Estos datos concuerdan con la producción de NO medida en mitocondrias por DAF-FM.

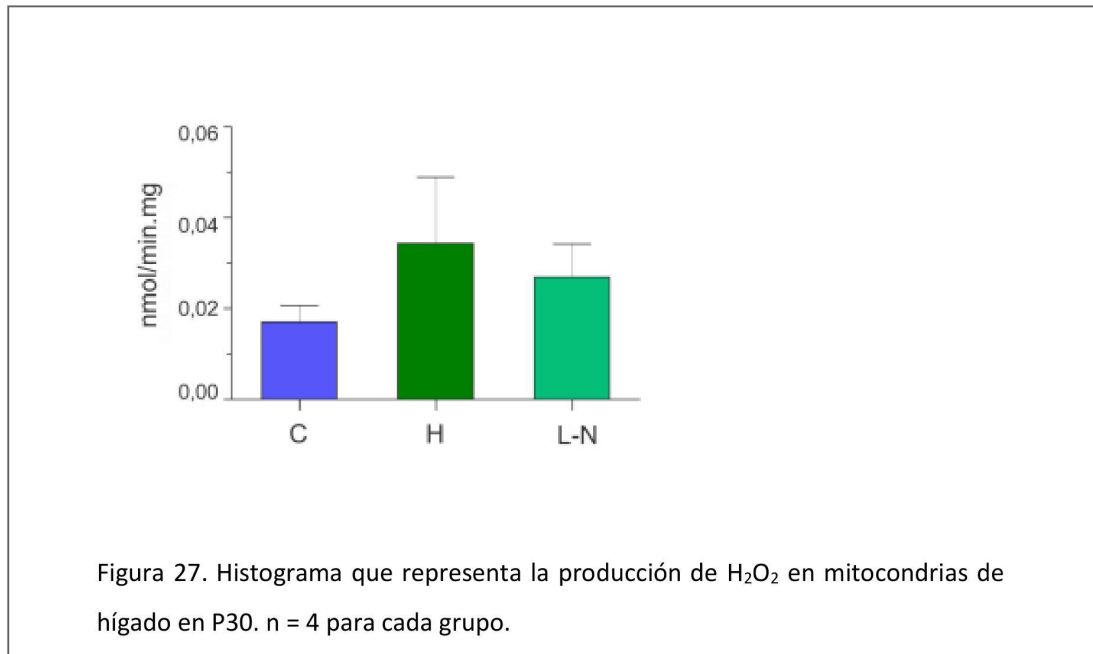


8.2.3 Tasa de producción de H_2O_2

De acuerdo a los resultados obtenidos de la producción de superóxido en hepatocitos aislados, se determinó en forma fluorométrica la tasa de producción de H_2O_2 en mitocondrias purificadas de hígado en el estadio P30 de los diferentes grupos. Se calculó la producción NO- dependiente de H_2O_2 como la diferencia entre la producción en presencia del sustrato de NOS, L-Arg y en presencia del sustrato más el inhibidor, L-NAME.

Resultados

Los resultados indicaron que no hay una diferencia significativa en la producción mitocondrial de H_2O_2 y tampoco fue reducida por L-NAME.



8.3 ALTERACIONES EN LA DINÁMICA MITOCONDRIAL HEPÁTICA PRODUCIDAS POR EL AUMENTO MITOCONDRIAL DE NO.

Los eventos de fusión y fisión mitocondrial regulan la morfología mitocondrial en respuesta a cambios de su ambiente, pero también determinan muchos procesos celulares tanto fisiológicos como patológicos (Nakamura, Cieplak et al. 2010, Gray, Zommer et al. 2013). Con el fin de evaluar como el desarrollo perinatal determina patrones en la dinámica mitocondrial y el cambio que produce el hipotiroidismo a través del aumento de ROS y NO en los mismos, analizamos los niveles de ARNm para los genes Mfn2, OPA 1 y Drp 1 mediante RT-qPCR para cada grupo, seguido del estudio de la expresión de sus productos proteicos por western blot (Chang and Blackstone 2010, Nakamura, Cieplak et al. 2010).

8.3.1 Análisis de la regulación transcripcional de proteínas de fusión/fisión en mitocondrias de hígado

Para correlacionar los cambios generados en el metabolismo mitocondrial con la dinámica, se realizó análisis mediante qPCR de las proteínas involucradas en fisión y fusión mitocondrial. Los genes de las proteínas involucradas en fusión OPA 1 y Mfn2 se modificaron por el hipotiroidismo principalmente en P5 y P15. Los niveles de ARNm para Mfn2 se incrementaron significativamente por el hipotiroidismo en P15 y disminuyeron por el tratamiento con L-NAME tanto en P15 como en P30. Contrariamente, en el desarrollo normal la transcripción de OPA 1 decrece en el periodo perinatal, y presenta una disminución en el desarrollo hipotiroideo que es significativamente menor a su control en P15, logrando reversión completa por la infusión de L-NAME a los animales hipotiroideos.

En paralelo, el análisis de ARNm de Drp 1 como proteína de fisión mitocondrial demostró que el efecto del hipotiroidismo en cuanto a la fisión se manifiesta recién en P30, en el cual se estimuló significativamente la transcripción de dicho gen que fue revertida por el tratamiento con L-NAME.

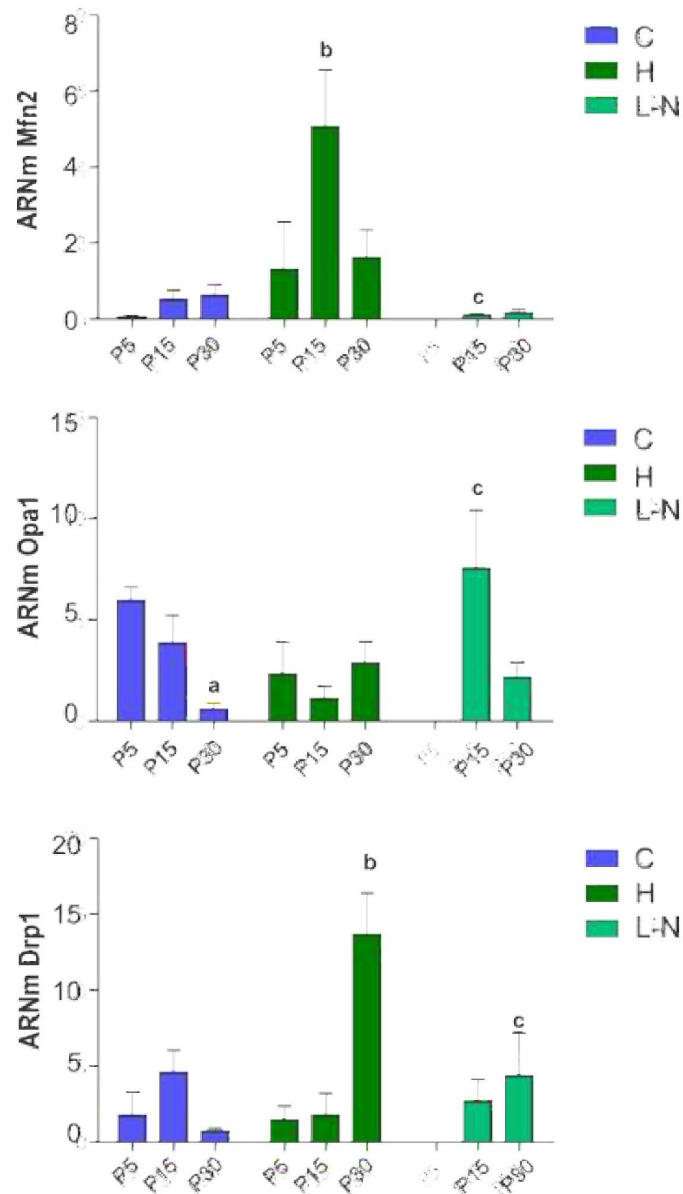


Figura 28. Modulación de los niveles de ARNm de Drp - 1, Opa 1 y Mfn-2 en el desarrollo hipotiroideo. Evaluados mediante RT-qPCR a partir de ARN extraídos de los diferentes grupos. n=7 por grupo. **a:** Diferencias significativas dentro del grupo C ($p < 0,05$), **b:** diferencias significativas entre hipotiroideos y sus controles ($p < 0,002$), **c:** diferencias significativas entre hipotiroideos y tratados ($p < 0,05$). C: control, H: hipotiroideo, L-N: hipotiroideo + L-NAME.

8.3.2 Estudio de la presencia de las proteínas de dinámica mitocondrial en mitocondrias de hígado.

La evaluación de los niveles mitocondrial de las proteínas implicadas en la fusión-fisión mitocondrial por western blot, evidenció que en el desarrollo normal disminuye la expresión de las proteínas de fusión (Mfn2 y OPA1) en P30 y que por el contrario, aumenta la expresión de Drp1 desde P15. Por otro lado, en el hipotiroidismo congénito no se modifica la localización mitocondrial de estas proteínas en el desarrollo perinatal; si bien se observan diferencias respecto de los animales controles. En P5, la expresión de Drp1 en la fracción mitocondrial es significativamente mayor que en los animales controles, mientras que la expresión de Mfn2 y OPA1 es menor.

El análisis de los resultados realizados en hígado comprueba que el hipotiroidismo incrementó la expresión tanto citosólica como mitocondrial de la nNOS junto con la producción de NO mitocondrial, y que a través de la inhibición del complejo I incrementó los niveles de superóxido sin generación mitocondrial de H₂O₂. A su vez, el hipotiroidismo alteró la regulación transcripcional de genes asociados a dinámica mitocondrial, aunque sin modificar su reclutamiento a las organelas

Resultados

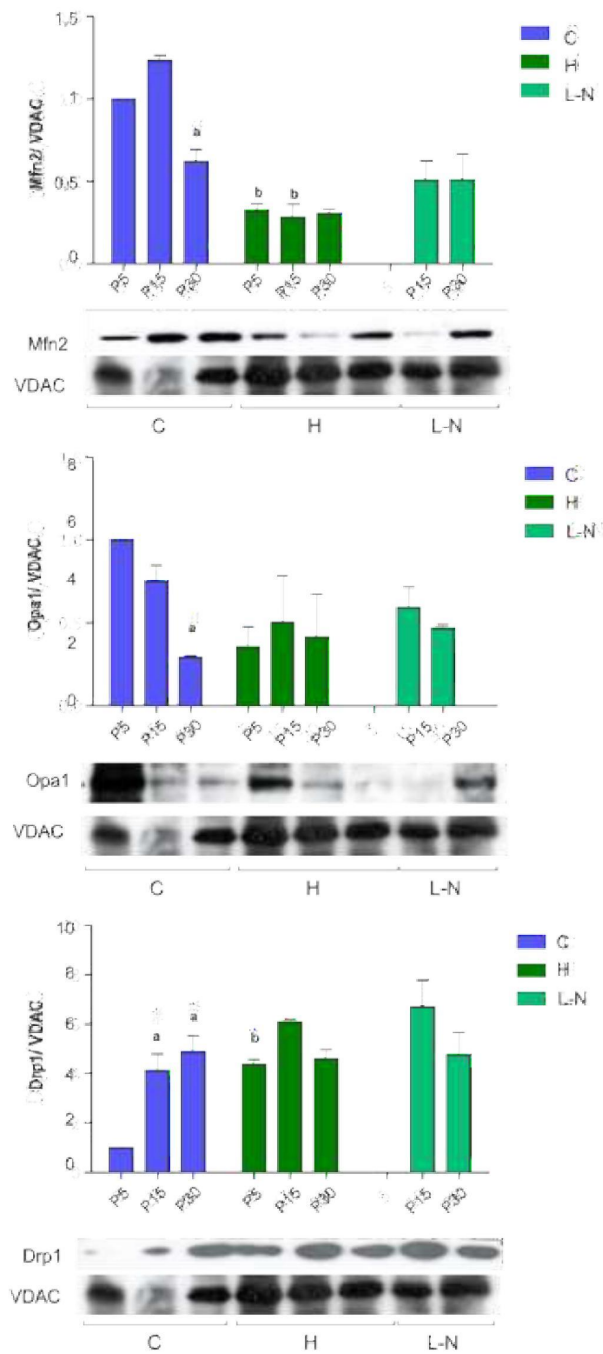


Figura 29. Expresión de Mfn2, Opa 1 y Drp 1 evaluados mediante western blot en fracciones mitocondriales purificadas de hígado. Se utilizó VDAC como normalizador (n=5). **a:** diferencias significativas dentro del grupo ($p < 0,05$), **b:** diferencias significativas entre los grupos C y H ($p < 0,005$). C: control, H: hipotiroideo, L-N: hipotiroideo + L-NAME.

9 REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN, LOCALIZACIÓN SUBCELULAR Y ACTIVIDAD DE nNOS EN EL DESARROLLO HIPOTIROIDEO DEL CEREBRO

9.1.1 Análisis de la expresión de nNOS en fracciones subcelulares de cerebro

Para determinar si durante el desarrollo perinatal, el hipotiroidismo congénito alteró el patrón de expresión de nNOS, citosólica o mitocondrial se evaluó por western blot la expresión de ésta enzima en fracciones citosólicas y mitocondriales purificadas a partir de cerebro de ratas de los distintos grupos en los tiempos de desarrollo post-natal establecidos. Se utilizaron anticuerpos contra actina y Tom40 como normalizadores de las fracciones citosólicas y mitocondriales respectivamente cuyas expresiones no son modificadas ni durante el desarrollo, ni por el hipotiroidismo (n = 5 por grupo).

El análisis de los niveles de nNOS en las fracciones mitocondriales de cerebro reveló que el hipotiroidismo modificó la expresión de la enzima mientras que en el desarrollo normal no se producen aumentos ni variaciones en los niveles mitocondriales. Los niveles de nNOS en el día 5 son iguales en los grupos controles e hipotiroideos. En P15, la expresión en el grupo hipotiroideo se incrementó 4 veces respecto del grupo eutiroideo y esto se mantuvo aún en las fracciones tratadas con PK. En el día 30 post-natal, esta expresión disminuye en los hipotiroideos, pero su aumento respecto al control sigue siendo significativo ($p < 0,05$).

El tratamiento de los animales con el inhibidor de la óxido nítrico sintasa L-NAME logró revertir el efecto de translocación en las fracciones mitocondriales de P15 y P30 hasta en un 70% ($p < 0,001$), sin embargo, en las fracciones tratadas con PK, sólo en P30 se reducen los niveles mitocondriales de nNOS ($p < 0,005$). Por otra parte la expresión en lisados totales o citosoles no se vio modificada.

Resultados

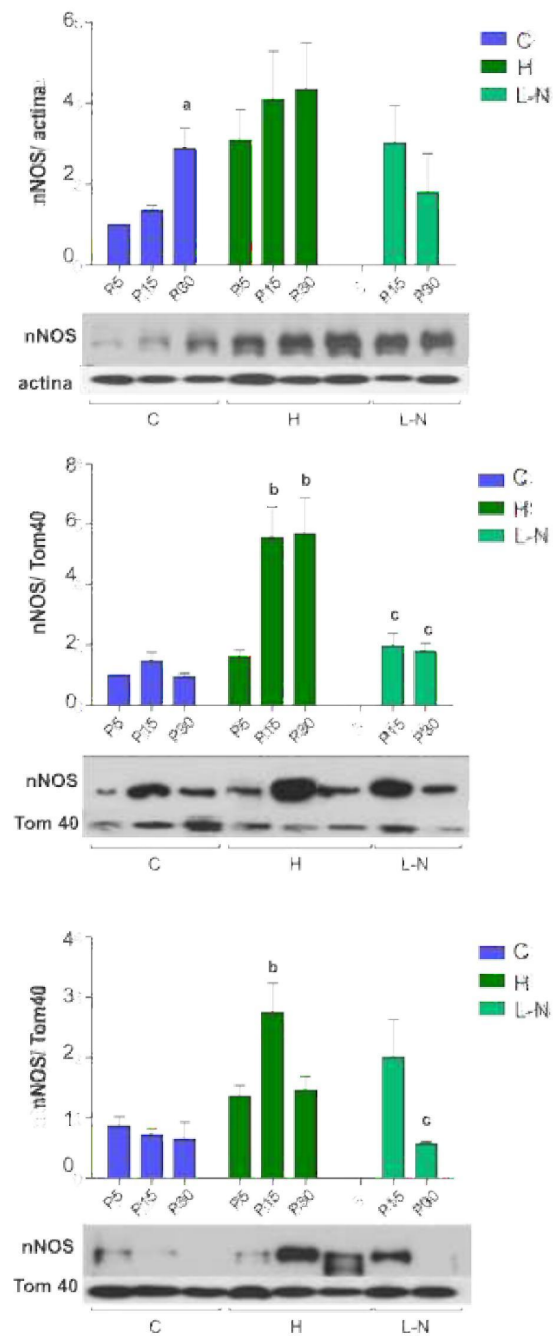


Figura 30. Expresión de nNOS en las etapas post-natales del desarrollo en los modelos experimentales. Fracciones de cerebro: citosoles (superior), mitocondrias (medio) y mitocondrias tratadas con PK (inferior). n=5 por grupo. **a:** diferencias significativas dentro del grupo ($p < 0,05$), **b:** diferencias entre C y H ($p < 0,005$), **c:** diferencias significativas entre H y L-N ($p < 0,05$). C: control, H: hipotiroideo, L-N: hipotiroideo + L-NAME.

9.1.2 Evaluación de la actividad y producción de NO en el cerebro hipotiroideo.

La actividad de NOS dependiente de calcio, determinada en las distintas fracciones subcelulares de cerebro por la conversión de 3H-L-Arg a 3H-L-citrulina, correlacionó con los cambios observados en los niveles de la proteína en los distintos grupos (Figura 30). No se observó actividad de NOS calcio-independiente.

Los resultados muestran que ambos grupos, control e hipotiroideos presentan una actividad enzimática en citosol sin diferencias significativas. Por otra parte, el hipotiroidismo produjo un aumento de la actividad en la fracción mitocondrial en el día post-natal 15 ($p < 0,0122$) en contraste a los valores basales de entre 90-115 pmoles/min.mg observados en todos los grupos. Esta condición se mantiene incluso después del tratamiento con PK, lo que significa que la enzima está internalizada y la digestión con PK no afectó su actividad (Figura 30).

Con el fin de confirmar los resultados obtenidos por la conversión de 3H-L-Arg a 3H-L-citrulina, mitocondrias purificadas de hígado de rata de los distintos grupos se incubaron con la sonda DAF-FM y se representó la IF de igual manera que para mitocondrias de hígado.

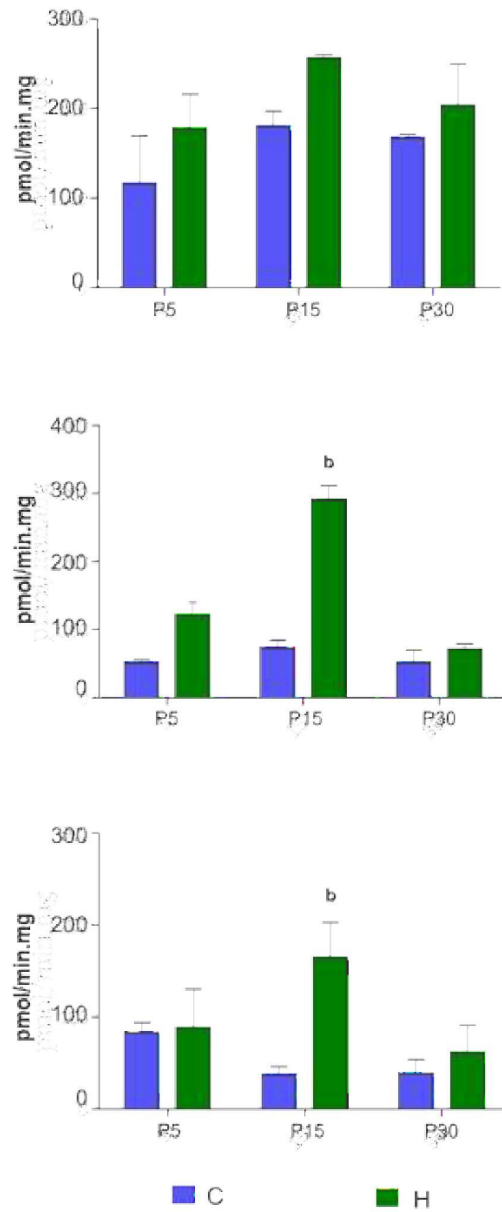


Figura 31. Actividad de NOS Ca²⁺ dependiente durante las etapas de desarrollo post-natal. Se ensayaron fracciones citosólicas, mitocondriales y mitocondriales tratadas con PK provenientes de cerebro (n= 5). **b**: Diferencias significativas del grupo H respecto a su C en cada estadio (p<0,005). C: control, H: hipotiroideo.

Resultados

El análisis de las IF (Figura 32) permitió observar, que durante el desarrollo normal se observó que la producción de NO aumentó hacia el final de la etapa perinatal, observándose un patrón diferente en el hipotiroidismo, donde en el día 30 postnatal se observaron los valores mínimos de DAF. Sin embargo, el hipotiroidismo condujo a un aumento significativo de la fluorescencia en el día 15 postnatal duplicando la producción de NO respecto al control, tal como ocurrió con la actividad enzimática ensayada anteriormente. Estos resultados son consistentes con la localización mitocondrial observada por western blot, donde las mitocondrias de cerebro exhiben mayor expresión y aumento de la actividad en el día 15 durante el desarrollo hipotiroideo.

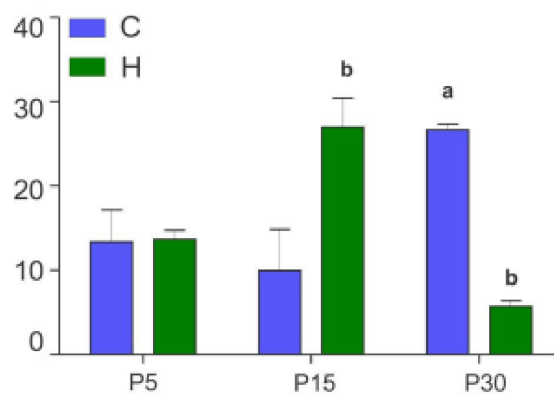


Figura 32. Histogramas representando la media de intensidad de fluorescencia (IF) para DAF. Análisis de mitocondrias purificadas de cerebro (n=4). **a**: diferencias significativas dentro del grupo C ($p < 0,05$), **b**: diferencias significativas de H respecto a su control ($p < 0,01$). C: control, H: hipotiroideo.

9.2 Consecuencia del aumento de NO mitocondrial en la producción de oxidantes a través de la cadena de transporte de electrones.

9.2.1 Actividad del complejo I y IV de la cadena respiratoria mitocondrial

La actividad del complejo I fue evaluada por reducción de 3-dimetoxi-6-metil-1,4-benzoquinona en mitocondrias purificadas de cerebro. Los resultados demostraron que durante el desarrollo neonatal normal la actividad máxima se alcanza en el día 15 post-natal (80 nmoles/min.mg). En este estadio el grupo hipotiroideo muestra una reducción significativa de la misma respecto a su control en el día 15 y respecto a los hipotiroideos de otros estadios evaluados (**b**: $p < 0,0036$), señalando una inhibición del CI. En tanto que las mitocondrias de los grupos tratados con L-NAME lograron incrementar la actividad de CI en el día 15, revirtiendo este efecto de inhibición (**c**: $p < 0,005$).

Por otra parte, no se advirtieron cambios durante el desarrollo neonatal del grupo control en las actividades de complejo IV medido por oxidación de citocromo c. El hipotiroidismo provocó una reducción de la actividad del 50% en los días 5 y 15 y menor pero aún significativa en el día 30 post-natal (**b**: $p < 0,0011$). El grupo hipotiroideo tratado con L-NAME reveló valores comparables a los observados en el grupo control recién en el día 30 post-natal (**c**: $p < 0,0021$).

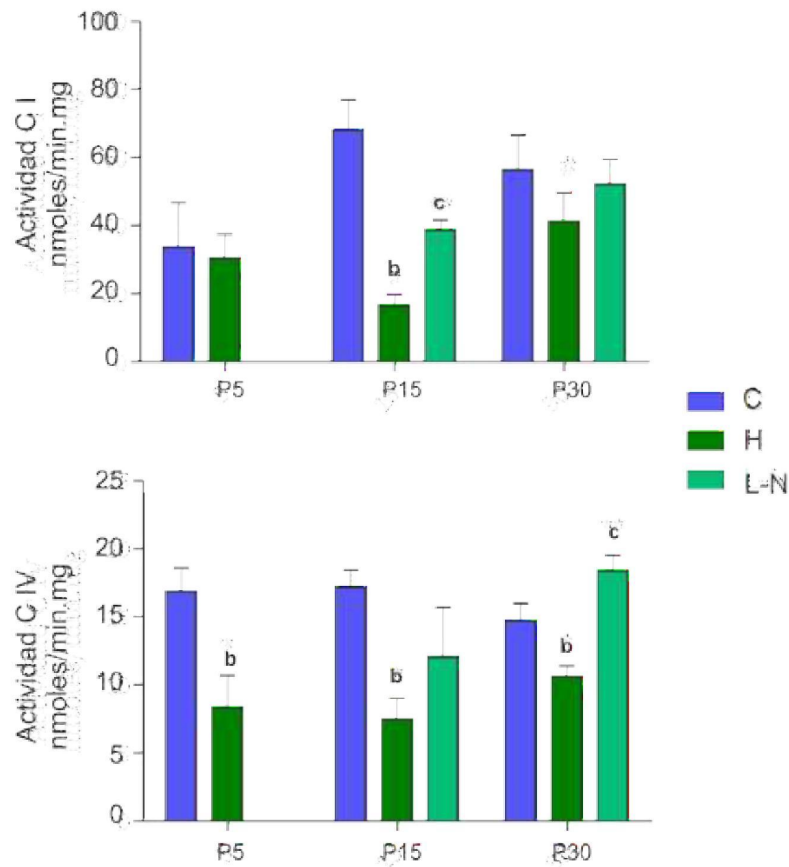


Figura 33 Determinación de las actividades enzimáticas de los complejos I y IV de la cadena respiratoria (n=6). **b**: diferencias significativas entre grupo C respecto de H en cada estadio ($p < 0,0035$), **c**: diferencias significativas entre grupo hipotiroideo y tratado con L-N ($p < 0,005$). C: grupo control, L-N: grupo hipotiroideo + L-NAME.

9.2.2 Producción de anión superóxido

Considerando el efecto que produjo el hipotiroidismo durante el desarrollo neonatal sobre las actividades de complejos I y IV se efectuó la medición de la producción de O_2^- sensible a L-NAME por citometría de flujo, usando la sonda DHE en células aisladas de

Resultados

cerebro. La media de intensidad de fluorescencia IF permite asumir que el hipotiroidismo generó un aumento en los niveles de superóxido, de 4 veces con respecto al control en el día 15 post-natal que fue revertido por el tratamiento con L-NAME hasta valores controles, indicando una producción de superóxido dependiente de NO que no se modificó en ningún otro estadio del desarrollo en el cerebro por el hipotiroidismo.

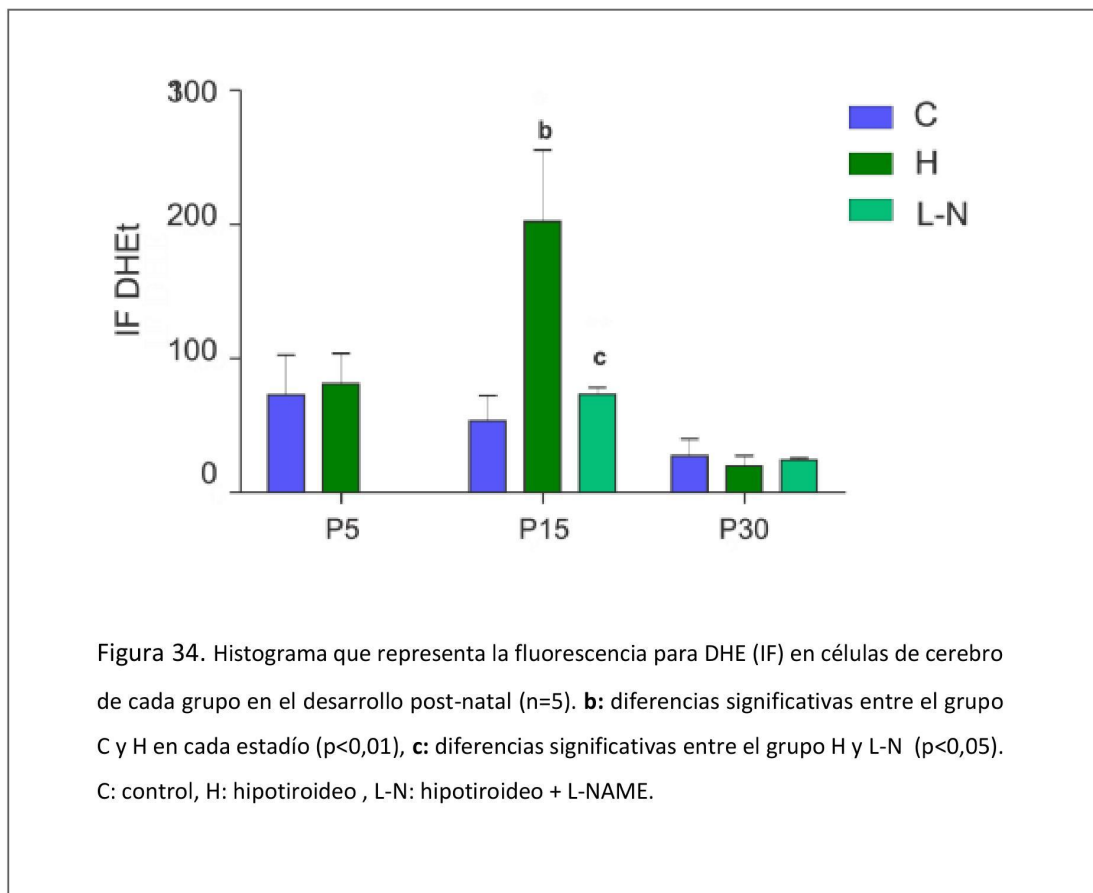
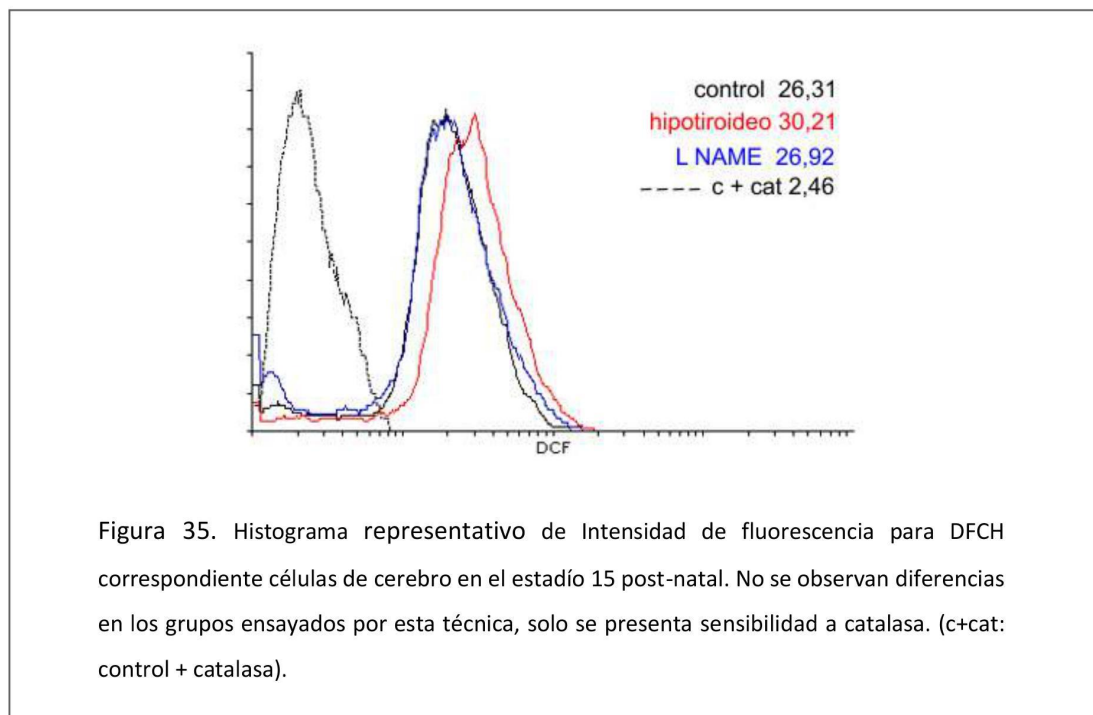


Figura 34. Histograma que representa la fluorescencia para DHE (IF) en células de cerebro de cada grupo en el desarrollo post-natal (n=5). **b:** diferencias significativas entre el grupo C y H en cada estadio ($p < 0,01$), **c:** diferencias significativas entre el grupo H y L-N ($p < 0,05$). C: control, H: hipotiroideo, L-N: hipotiroideo + L-NAME.

9.2.3 Tasa de producción de H₂O₂

De acuerdo al patrón de producción de NO y la IF para DHE se dirigió el análisis de la producción de H₂O₂ al estadio en el cual hipotiroidismo resultó en un aumento máximo tanto de NO como O₂⁻, que para cerebro fue post-natal 15 (P15).

Se ensayó la producción total de H₂O₂ sensible a L-NAME células aisladas de cerebro por citometría de flujo utilizando DCFH y se utilizó como control de especificidad la reducción de la fluorescencia por el agregado de catalasa. Como puede observarse en la Figura 35 los valores están aumentados pero no presentan grandes variaciones ni en los grupos hipotiroideos ni en los pre-incubados con L-NAME respecto al grupo control.



Resultados

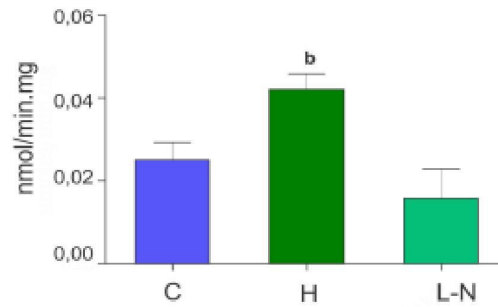


Figura 36. Histograma que representa la producción de H₂O₂ en mitocondrias de cerebro en P15. **b**: diferencias significativas respecto a l grupo C ($p < 0,0318$) por análisis de varianza y test de Dunnett *post hoc*. $n = 4$ para cada grupo.

En su conjunto, estos resultados demuestran que la cadena respiratoria mitocondrial madura y responde diferencialmente en cada etapa perinatal y que en el hipotiroidismo congénito, el aumento de niveles mitocondriales de NO produce la inhibición de la actividad del complejo I y IV. Como resultado se altera el perfil energético mitocondrial y resulta en la producción de especies reactivas del oxígeno, las cuales podrían modificar vías de señalización específicas durante el desarrollo.

9.3 Cambios de la dinámica mitocondrial producidos por el hipotiroidismo en el desarrollo post-natal del cerebro.

9.3.1 Análisis de la regulación transcripcional de proteínas de fusión/fisión mitocondrial.

La evaluación de los niveles de ARNm para Mfn2 y Opa1 reveló que tanto en el desarrollo perinatal normal como en el hipotiroidismo congénito no se modificaron los niveles de transcripción. Sin embargo, el tratamiento de los animales hipotiroideos con L-NAME en el día 15 post-natal provocó un aumento en la expresión de las proteínas de fusión mitocondrial. Por otro lado, cuando se analizaron los niveles de ARNm para Drp 1 se observó que el hipotiroidismo generó un aumento significativo de la expresión en el día post-natal 30 y que el mismo fue revertido por el tratamiento con L-NAME hasta niveles control, como se muestra en la Figura 37.

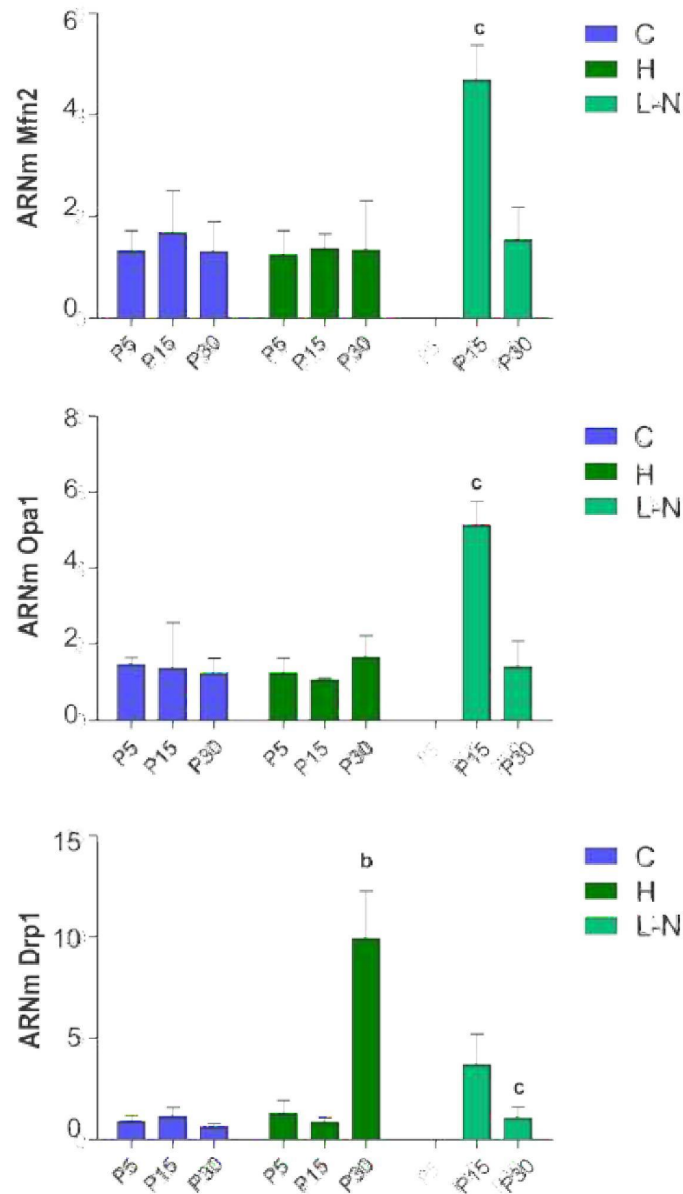


Figura 37. Modulación de los niveles de ARNm de Mfn-2, Opa1 y Drp 1 en el desarrollo hipotiroideo, evaluados mediante RT-qPCR. (n=7). **b**: diferencias significativas del grupo hipotiroideo respecto a su control en cada estadio ($p < 0,001$), **c**: diferencias significativas de H respecto al tratamiento con L-NAME. ($p < 0,001$). C: control, H:hipotiroideo , L-N: hipotiroideo + L-NAME.

9.3.2 Expresión de proteínas de dinámica mitocondrial.

La evaluación de la expresión por western blot de las proteínas de dinámica ensayadas por RT-qPCR permitió confirmar que el hipotiroidismo incrementa los niveles de Drp 1 en la fracción mitocondrial en P30 y que el tratamiento con L-NAME disminuye la presencia de Drp 1 mitocondrial a valores comparables al grupo control en ese estadio, en forma consecuente con los resultados obtenidos a partir del ARNm (Figura 38). En cuanto a las proteínas involucradas en fusión mitocondrial, en el día 30, el hipotiroidismo incrementó la expresión de Mfn2 en mitocondrias. Sin embargo, en el caso de Opa 1, sólo se incrementaron significativamente los niveles de proteína durante los días 15 y 30 en el desarrollo normal.

Resultados

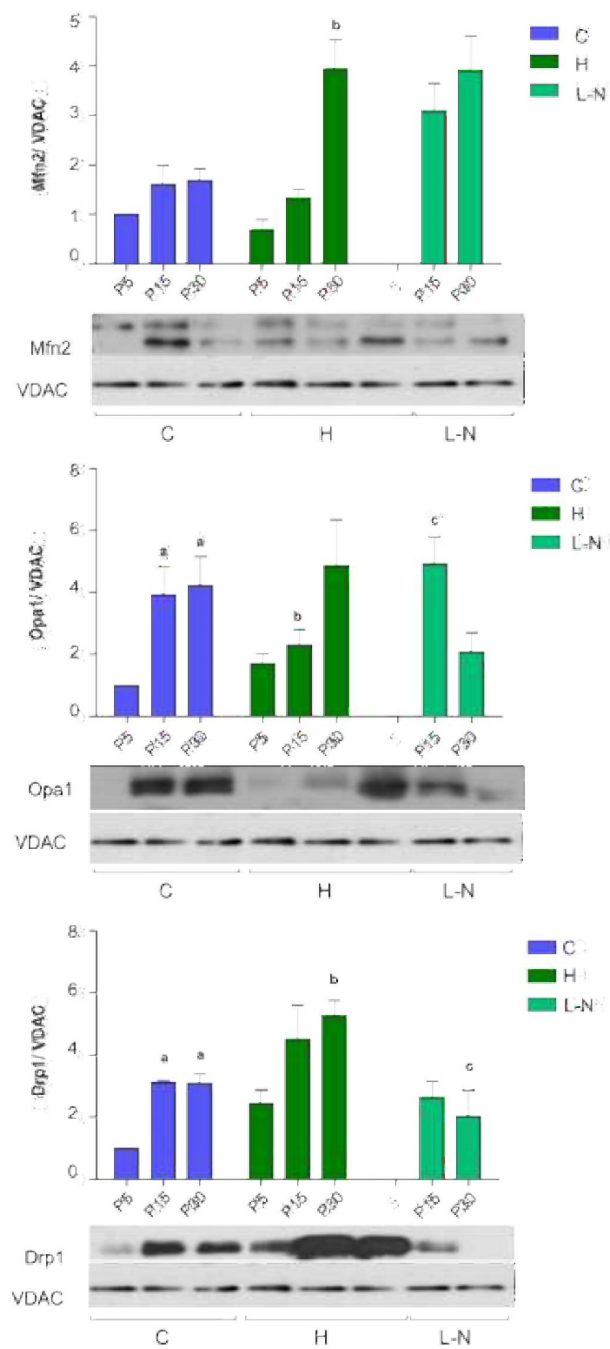


Figura 38. Modulación de la expresión de Drp - 1, Opa 1 y Mfn-2 en el desarrollo hipotiroideo. Evaluados mediante western blot en fracciones mitocondriales de cerebro. (n=7). **a:** diferencias significativas dentro del grupo ($p < 0,005$), **b:** diferencias significativas de H respecto a su control ($p < 0,005$), **c:** diferencias significativas de H respecto a L-N ($p < 0,05$). C: control, H: hipotiroideo, L-N: hipotiroideo + L-NAME.

9.4 Efecto del NO perinatal en el patrón apoptótico/proliferativo del cerebro: alteración en el desarrollo hipotiroideo.

Se ha demostrado que altos niveles de ROS durante el desarrollo alteran no sólo la muerte de células neuronales y no neuronales en el cerebro sino también los patrones de migración y sinaptogénesis.

Considerando los resultados expuestos en las secciones anteriores en los que el hipotiroidismo congénito a través del incremento de NO generó un desbalance en la producción de ROS y una disfunción mitocondrial, nuestro objetivo fue descubrir la consecuencia de la expresión mitocondrial de nNOS en las alteraciones observadas durante el desarrollo hipotiroideo en el cerebro tanto en neurogénesis, como en el establecimiento de la memoria y plasticidad sináptica.

9.4.1 Regulación de la activación de JNK y Erk por el estado tiroideo

En trabajos previos demostramos que las HT a través del aumento de ROS, regulan en el hígado de rata la activación de la MAPK Erk1/2 (Franco 2006). Erk se encuentra involucrada en proliferación, así como también diferenciación neuronal. De esta manera, decidimos estudiar en base a los resultados anteriores la activación de Erk a lo largo del desarrollo postnatal normal e hipotiroideo, incluyendo también el análisis de la fosforilación de JNK, otra MAPK involucrada en plasticidad sináptica cuya activación se vinculó recientemente al incremento de ROS y NO (Snyder, Shroff et al. 2009).

Se realizó el estudio de las formas fosforiladas activas mediante *Western blot* a partir de lisados totales de cerebro de ratas de los diferentes grupos en relación de la quinasa total. El análisis de la expresión y activación de Erk (Figura 39) reveló que en el grupo control la forma fosforilada activa se incrementó en forma significativa en P30 respecto los estadios P5-P15 del desarrollo. El hipotiroidismo por otra parte redujo la activación de Erk en P30 respecto a su valor control.

Resultados

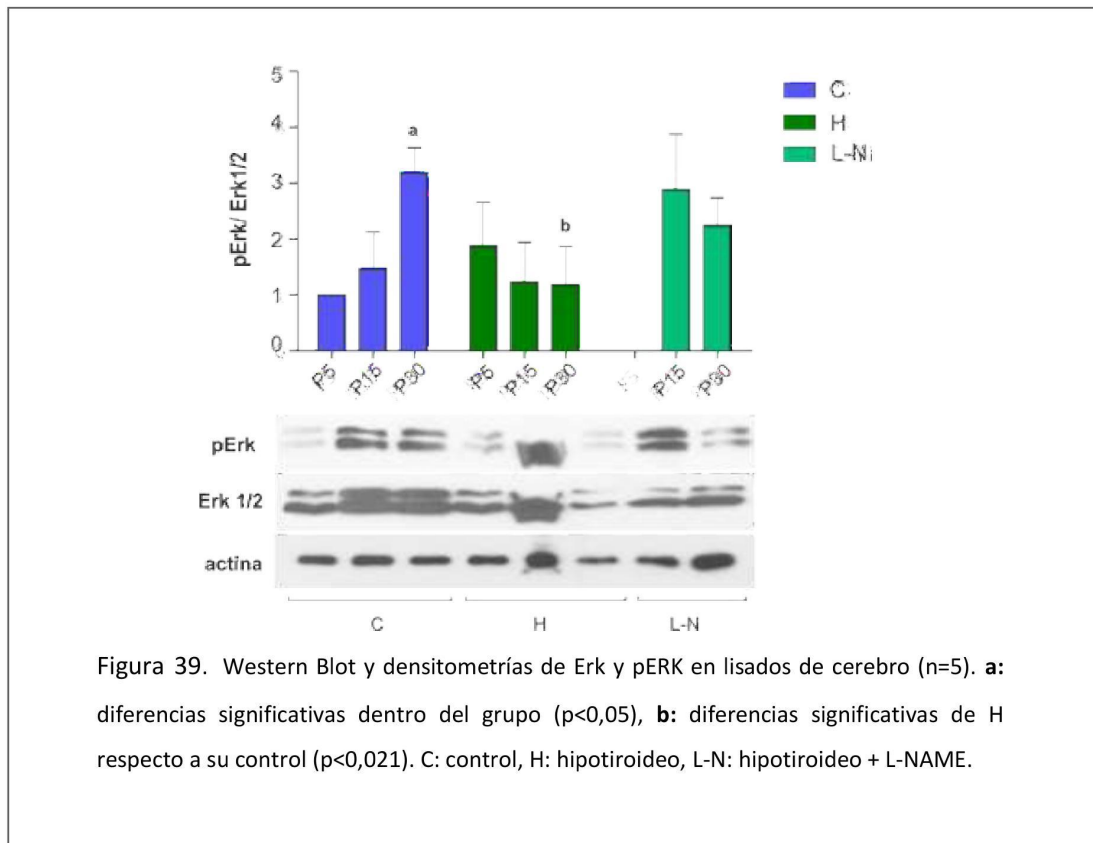


Figura 39. Western Blot y densitometrías de Erk y pERK en lisados de cerebro (n=5). **a**: diferencias significativas dentro del grupo ($p < 0,05$), **b**: diferencias significativas de H respecto a su control ($p < 0,021$). C: control, H: hipotiroideo, L-N: hipotiroideo + L-NAME.

En contraste, no hubo regulación en la expresión de JNK ya que la misma se mantiene constante durante el desarrollo tanto normal como hipotiroideo. Tanto en P5 como P30, el hipotiroidismo aumentó la fosforilación y activación de JNK respecto a los animales controles de cada estadio. El tratamiento con L-NAME provocó una reducción en la fosforilación de JNK en P30 comparable a P30C (Figura 40).

Resultados

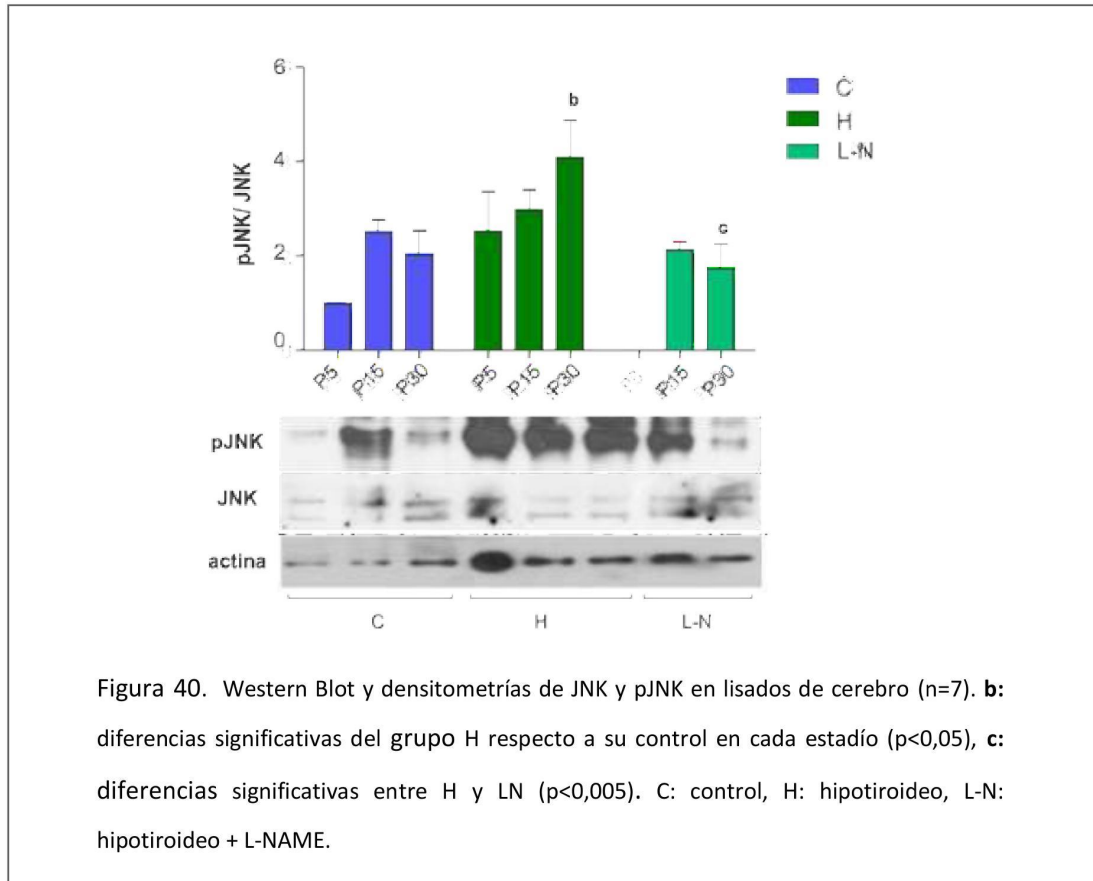


Figura 40. Western Blot y densitometrías de JNK y pJNK en lisados de cerebro (n=7). **b**: diferencias significativas del grupo H respecto a su control en cada estadio ($p < 0,05$), **c**: diferencias significativas entre H y LN ($p < 0,005$). C: control, H: hipotiroideo, L-N: hipotiroideo + L-NAME.

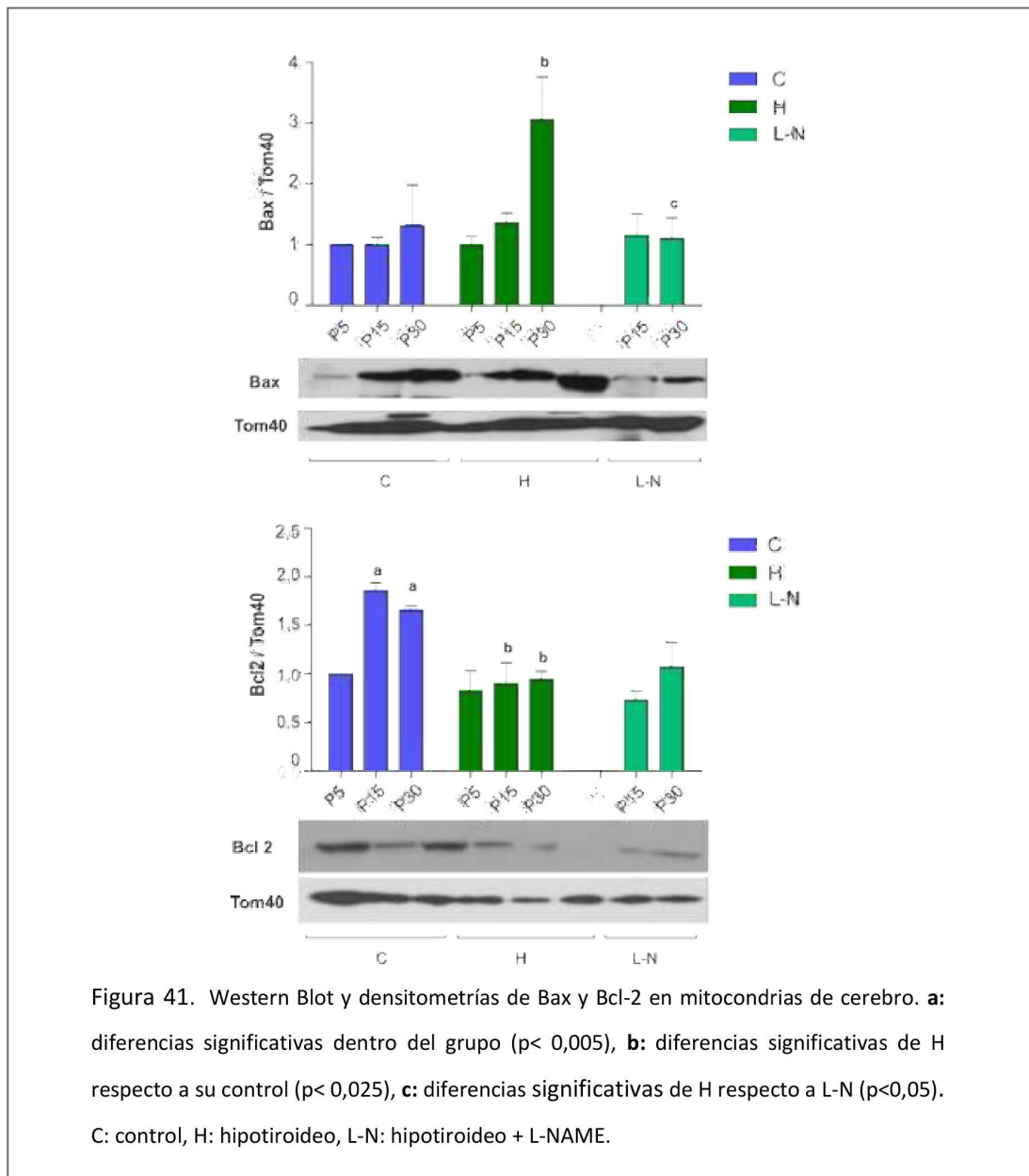
Los resultados sugieren que la activación de las vías de señalización Erk y JNK exhiben un aumento gradual de la activación durante el desarrollo normal y se ven modificadas por el hipotiroidismo congénito a través del aumento en los niveles de NO y oxidantes.

9.4.2 Influencia del NO en la asociación mitocondrial Bax y Bcl-2 y liberación citosólica de cit c.

Observando la activación de JNK que produce el aumento de NO, y ROS dependientes de NO en el hipotiroidismo, decidimos evaluar el efecto sobre la apoptosis generada por la vía intrínseca o mitocondrial. El análisis de la expresión de Bax y Bcl-2 se realizó mediante la detección con anticuerpos específicos por SDS-PAGE y western blot de fracciones mitocondriales purificadas de cerebro de cada grupo y se midió la expresión de VDAC como control de fracción y normalizador.

Como puede verse en la Figura 41 la expresión mitocondrial de Bax en cerebro en P30 se incrementó 2.5 veces en el grupo hipotiroideo respecto al grupo control y pudo revertir significativamente por la inhibición de la producción de NO en el grupo de animales tratados con L-NAME indicando que hay un reclutamiento de Bax en la membrana mitocondrial que es dependiente de NO.

A diferencia de la expresión de Bax, el análisis de la expresión mitocondrial del Bcl-2 reveló una modulación visible durante la etapa perinatal del desarrollo normal, en P15 aumentó 1.8 veces respecto a P5. Se puede observar a su vez, que el hipotiroidismo redujo la asociación de Bcl-2 a la membrana mitocondrial hasta un 50% en P15 respecto a su control. Esta disminución no logró revertirse por L-NAME.



Para determinar si el reclutamiento de Bax en mitocondria junto con la disminución de Bcl-2 puede desencadenar la apoptosis por la vía intrínseca, el siguiente paso fue evaluar la liberación de citocromo *c*, en fracciones citosólicas de cerebro de cada grupo por western blot. El análisis de las densitometrías permite observar que a partir del día postnatal 15 el hipotiroidismo produjo la liberación de citocromo *c*. En P30 se observó

Resultados

la diferencia máxima (2.5 veces vs. control). En ambos estadíos (P15-P30) el tratamiento con L-NAME logró revertir este fenómeno (c $p < 0,005$).

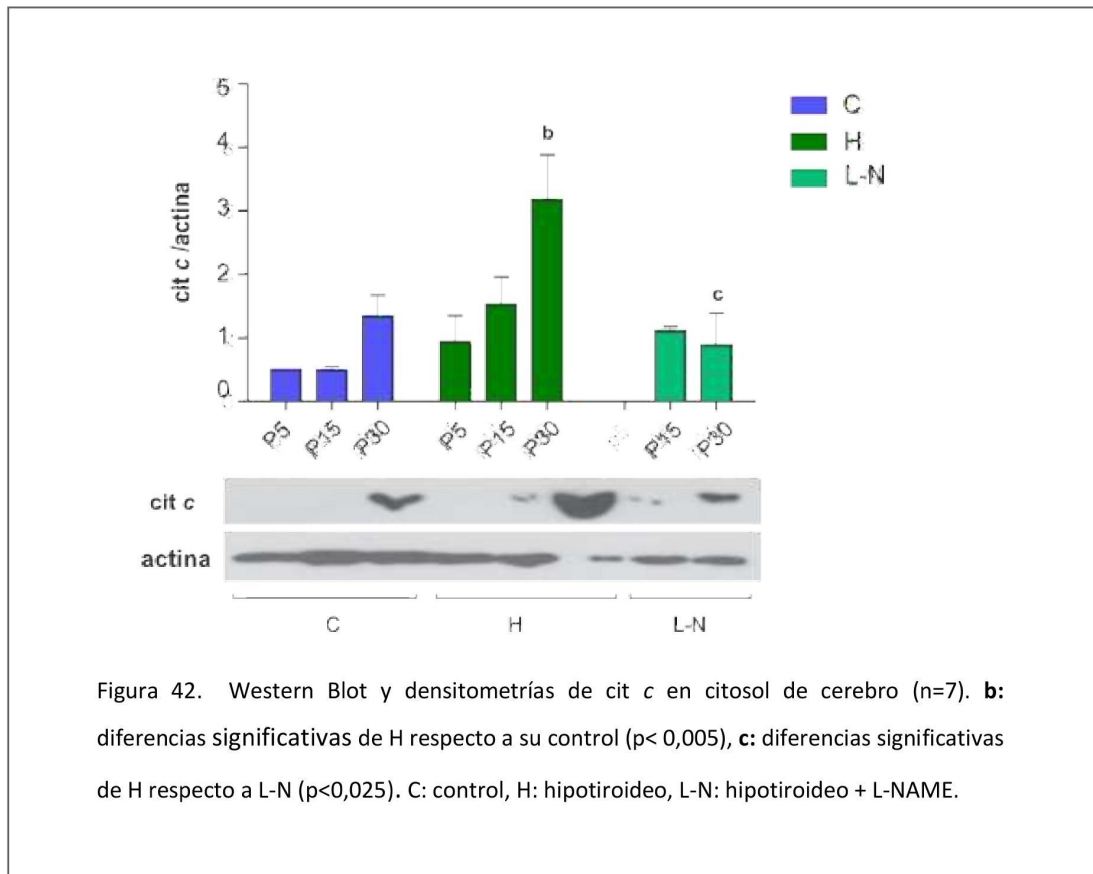


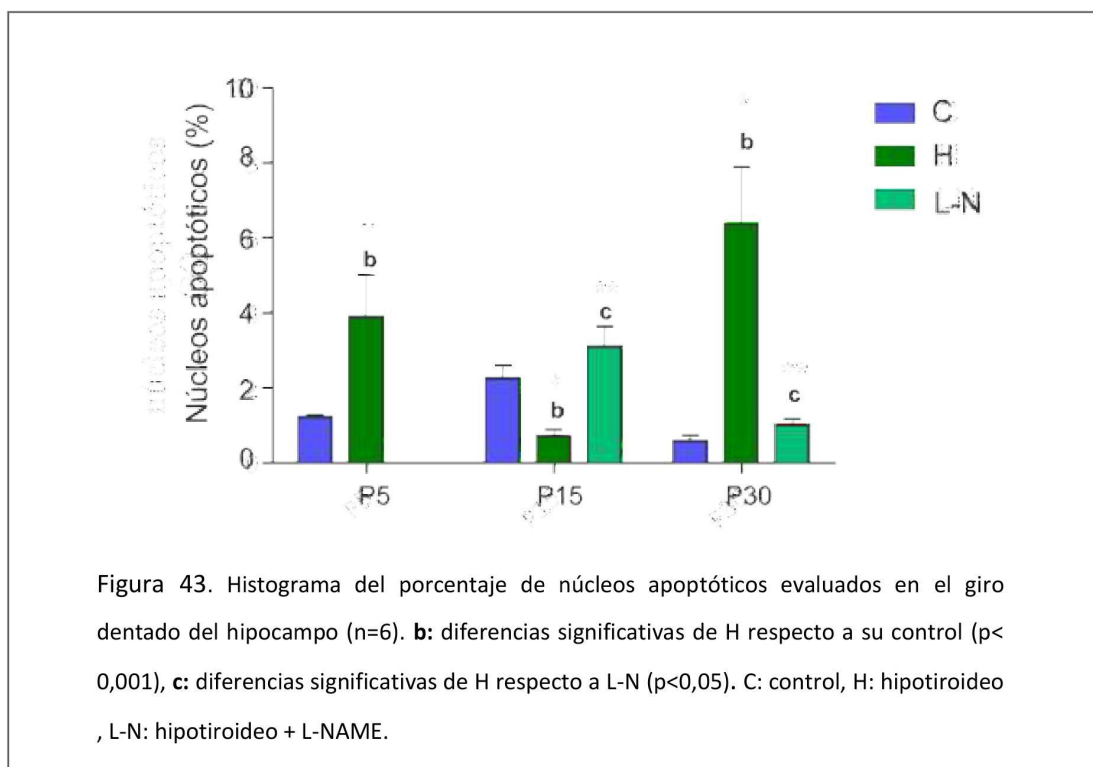
Figura 42. Western Blot y densitometrías de cit *c* en citosol de cerebro (n=7). **b**: diferencias significativas de H respecto a su control ($p < 0,005$), **c**: diferencias significativas de H respecto a L-N ($p < 0,025$). C: control, H: hipotiroideo, L-N: hipotiroideo + L-NAME.

9.4.3 Regulación de apoptosis y proliferación en el desarrollo del cerebro, consecuencias del hipotiroidismo.

Con el propósito de corroborar que la asociación mitocondrial de Bax y liberación de citocromo *c* analizadas previamente conducen a apoptosis en cerebro, se realizó el ensayo de TUNEL en cortes histológicos de cerebro para los tratamientos en cada estadío. El análisis se centró en el giro dentado del hipocampo que se caracteriza por ser la zona donde se hallan los progenitores neurales y presenta actividad durante la etapa postnatal. Los resultados corresponden al porcentaje de núcleos positivos (FITC) respecto el total de núcleos por campo analizados (DAPI).

Resultados

Durante el desarrollo normal se puede observar que en P15 el porcentaje de apoptosis es de 2,5% siendo el máximo en la etapa postnatal. Por otro lado, la modulación de la apoptosis se ve completamente alterada por el hipotiroidismo, aumentando 3 veces en P5 y 10 veces en P30 respecto a sus controles. Estos resultados denotan que el patrón de apoptosis se halla completamente invertido por el hipotiroidismo en el desarrollo del cerebro hasta P30 y, a su vez, tal como se muestra en el gráfico revierten completamente por el tratamiento con L-NAME a valores controles.

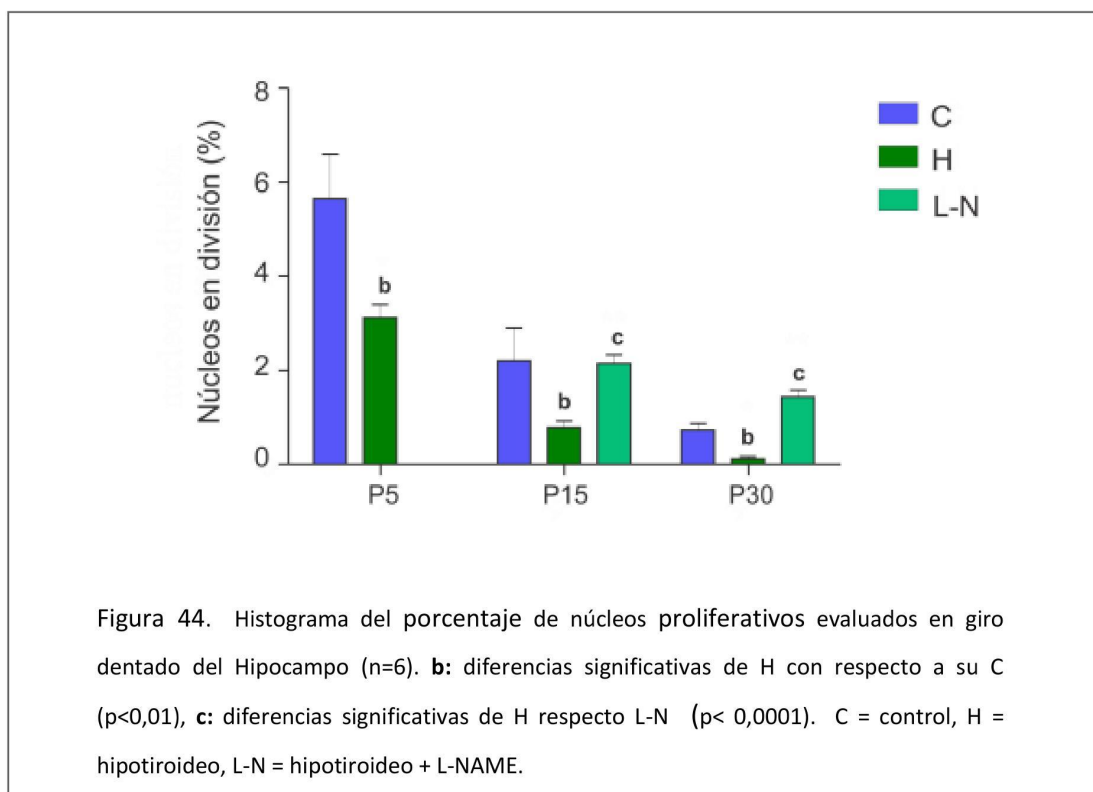


Considerando que la falta de HT produce incremento en la muerte celular y es consistente con alteraciones en el patrón de neurogénesis (Mohan, Sinha et al. 2012) evaluamos proliferación en cortes histológicos de cerebro de animales previamente inyectados en tres dosis sucesivas con BrdU realizando luego una inmunohistoquímica para BrdU con anticuerpos específicos conjugados con alexa fluor 588.

Resultados

El análisis se realizó como porcentaje de núcleos positivos para BrdU (verde) respecto a núcleos totales por campo (DAPI) de los grupos control, hipotiroideo e hipotiroideo + L-NAME para cada estadio. Ambos grupos, tanto control como hipotiroideo presentaron la proliferación máxima en el día postnatal 5, la cual disminuyó 70% en P30.

El hipotiroidismo disminuyó el porcentaje de núcleos proliferantes respecto de los animales controles en P5H y P30H; entre 2 y 5 veces respectivamente. La administración de L-NAME permitió a los animales hipotiroideos recuperar la proliferación de progenitores neurales en todos los casos.



Como conclusión, estos resultados indicaron que el aumento de NO mitocondrial y la consecuente producción de ROS condujo a la activación de quinasa JNK y la disminución en la fosforilación de ERK en estadios específicos durante el desarrollo, activando la vía intrínseca de apoptosis dependiente de Bax que tuvo como consecuencia la liberación de citocromo c en el día 30 postnatal. El resultado se evidenció como un cambio en el patrón

apoptótico y de proliferación en el cerebro de los animales hipotiroideos que en P30 revierte al inhibir la generación de NO.

9.5 Alteraciones producidas por el NO en genes del metabolismo mitocondrial involucrados en LTP durante la etapa perinatal.

Se sabe que muchas enfermedades neurodegenerativas tienen su raíz en alteraciones de genes mitocondriales, recientemente se vincularon genes que modifican el metabolismo mitocondrial a alteraciones en propiedades de la plasticidad sináptica (De Roo, Klauser et al. 2008). En base a estos antecedentes y los resultados de apoptosis y proliferación hipocampal, decidimos analizar los niveles del ARNm para los genes Atf4, PkCy, Chp que regulan la fisiología mitocondrial, son estimulados por el aumento de ROS y se ven implicados en el mecanismo de LTP.

Se sintetizaron los cDNA por rt-PCR desde 2µg de ARN aislado de cerebro de los animales de cada grupo. Se utilizaron como normalizador el gen de GAPDH y calibrador la expresión relativa de cada gen respecto al cDNA de cerebro de un postnatal 90 (P90), considerado como animal adulto control.

Los resultados indicaron que el hipotiroidismo incrementó la expresión de estos genes a medida que avanza el desarrollo post-natal. La expresión de Atf4 fue aumentada significativamente en P5H respecto del control. Tanto PkCy, Atf4 y Chp incrementaron su expresión en P30H respecto a su control (PkCy 4 veces, $p < 0,05$; Atf4 8 veces, $p < 0,025$, Chp 10 veces $p < 0,05$), y en este estadio, la administración de L-NAME fue capaz de revertir en forma absoluta la expresión de los 3 genes a valores observados en animales eutiroideos, demostrando la importancia del NO en la regulación de la expresión de dichos genes.

Se utilizó el gen de Neurogranina RC3, también involucrado en LTP pero directamente vinculado tanto a la acción de las hormonas tiroideas como del NO. Muchas enfermedades neurodegenerativas se correlacionan con una disminución en su expresión. Como puede verse en los niveles de ARNm para RC3, cuando se administra L-NAME los

Resultados

niveles de expresión se incrementan hasta 15 veces, sin cambios producidos por el hipotiroidismo.

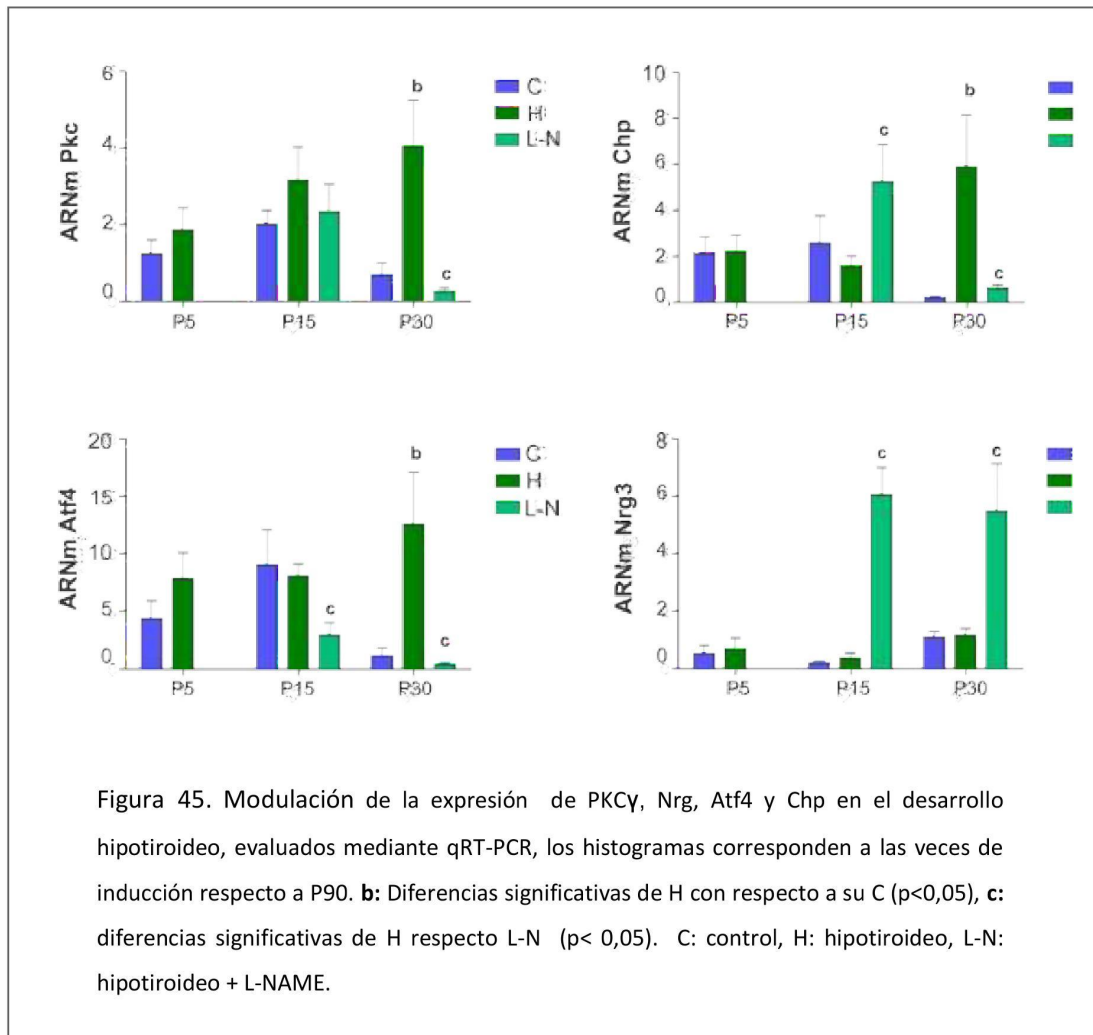


Figura 45. Modulación de la expresión de PKC γ , Nrg, Atf4 y Chp en el desarrollo hipotiroideo, evaluados mediante qRT-PCR, los histogramas corresponden a las veces de inducción respecto a P90. **b**: Diferencias significativas de H con respecto a su C ($p < 0,05$), **c**: diferencias significativas de H respecto L-N ($p < 0,05$). C: control, H: hipotiroideo, L-N: hipotiroideo + L-NAME.

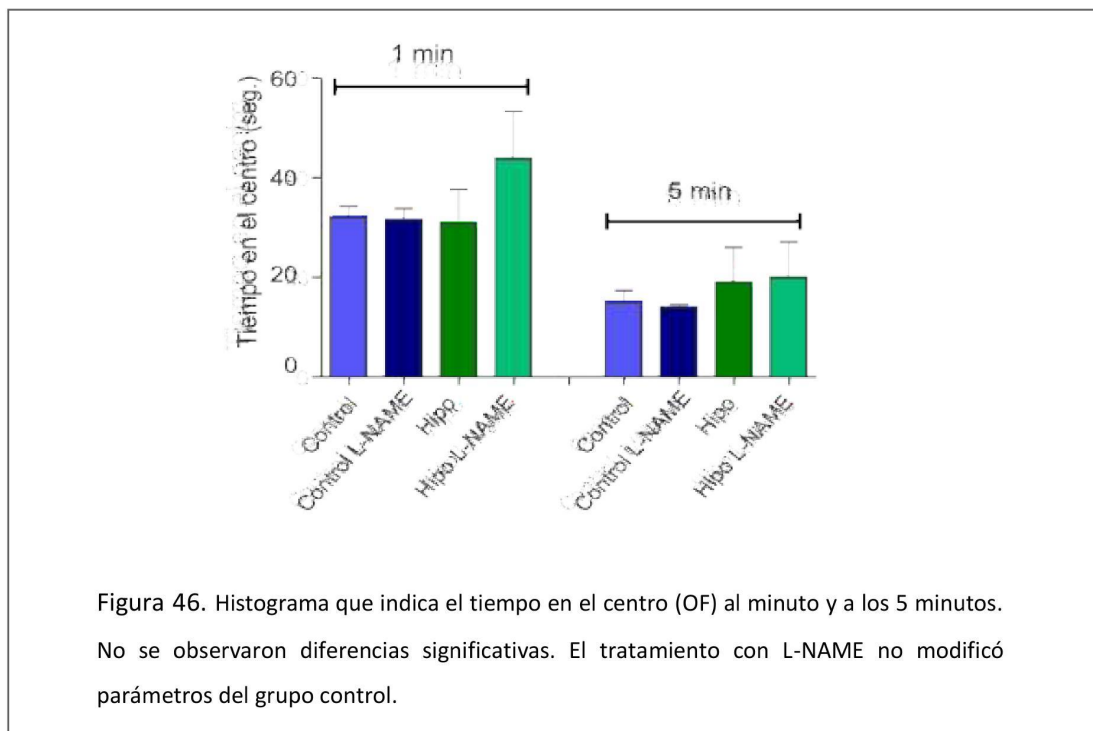
9.6 Evaluación de alteraciones conductuales provocadas por el hipotiroidismo congénito a través del aumento post-natal del NO.

Considerando que previamente demostramos el aumento en la producción de oxidantes mediada por NO y que la apoptosis en células de hipocampo durante el desarrollo postnatal provocadas por el hipotiroidismo resultó en la expresión aumentada de genes

Resultados

de estrés involucrados en LTP, como paso siguiente nos planteamos evaluar el efecto que tiene la alteración de estos parámetros en ensayos conductuales.

A partir de test conductuales y motores se estudió cómo el hipotiroidismo congénito afecta el desarrollo del comportamiento relacionado a la ansiedad, aprendizaje espacial, capacidad de memoria, desarrollo motriz. Los tests realizados fueron el *open field* y el *Grip Strength Test* a los 30/80 días postnatales de los diferentes grupos.



Como primer paso, en los ensayos conductuales de *open field* se incluyó un grupo control + L-NAME para corroborar que la inhibición de nNOS en el hipotiroidismo revierte el fenómeno de LTP descartando un efecto *per se* por la administración de L-NAME. En el gráfico de la Figura 46 se puede observar cómo los animales control tratados con L-NAME no presentan diferencias en los niveles de ansiedad medidas por el tiempo que permanecen en el centro del *open field* con respecto a sus contrapartes sin tratar. A su vez, evaluando el mismo parámetro como se indica en la figura 47, podemos observar que

Resultados

los animales hipotiroideos presentan un comportamiento de tipo ansioso significativamente mayor ($p > 0,05$) al de los animales control. En cambio los animales del grupo hipotiroideo tratados con L-NAME no son distinguibles estadísticamente del grupo control; sin embargo, tampoco presentan diferencias conductuales estadísticamente significativas con el grupo hipotiroideo infiriendo una reversión parcial del fenotipo.

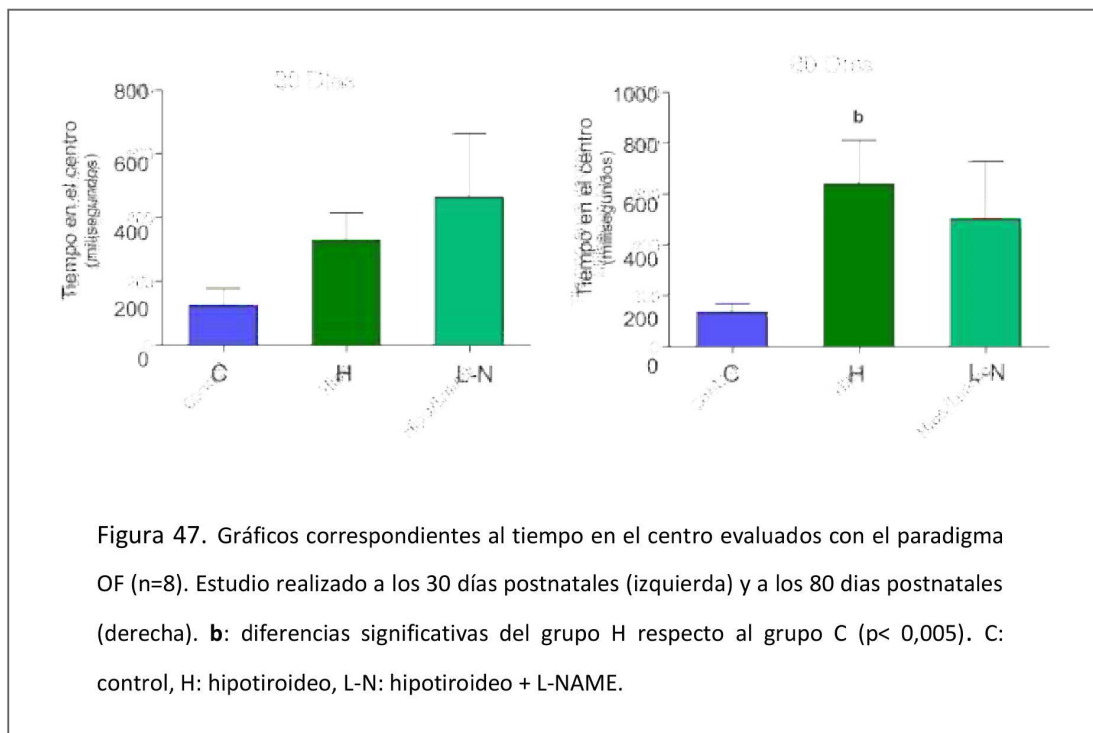


Figura 47. Gráficos correspondientes al tiempo en el centro evaluados con el paradigma OF ($n=8$). Estudio realizado a los 30 días postnatales (izquierda) y a los 80 días postnatales (derecha). **b**: diferencias significativas del grupo H respecto al grupo C ($p < 0,005$). C: control, H: hipotiroideo, L-N: hipotiroideo + L-NAME.

Otro parámetro importante para evaluar ansiedad y locomoción en el *open field*, es la cantidad de cruces por el centro del campo que realizan los animales estudiados. En este caso fue posible observar una reversión total del fenotipo hipotiroideo por parte del grupo tratado con L-NAME a los 80 días de edad, a pesar de no observarse diferencias a los 30 días, dando cuenta de una capacidad de aprendizaje/madurez cognitivo mayor.

Resultados

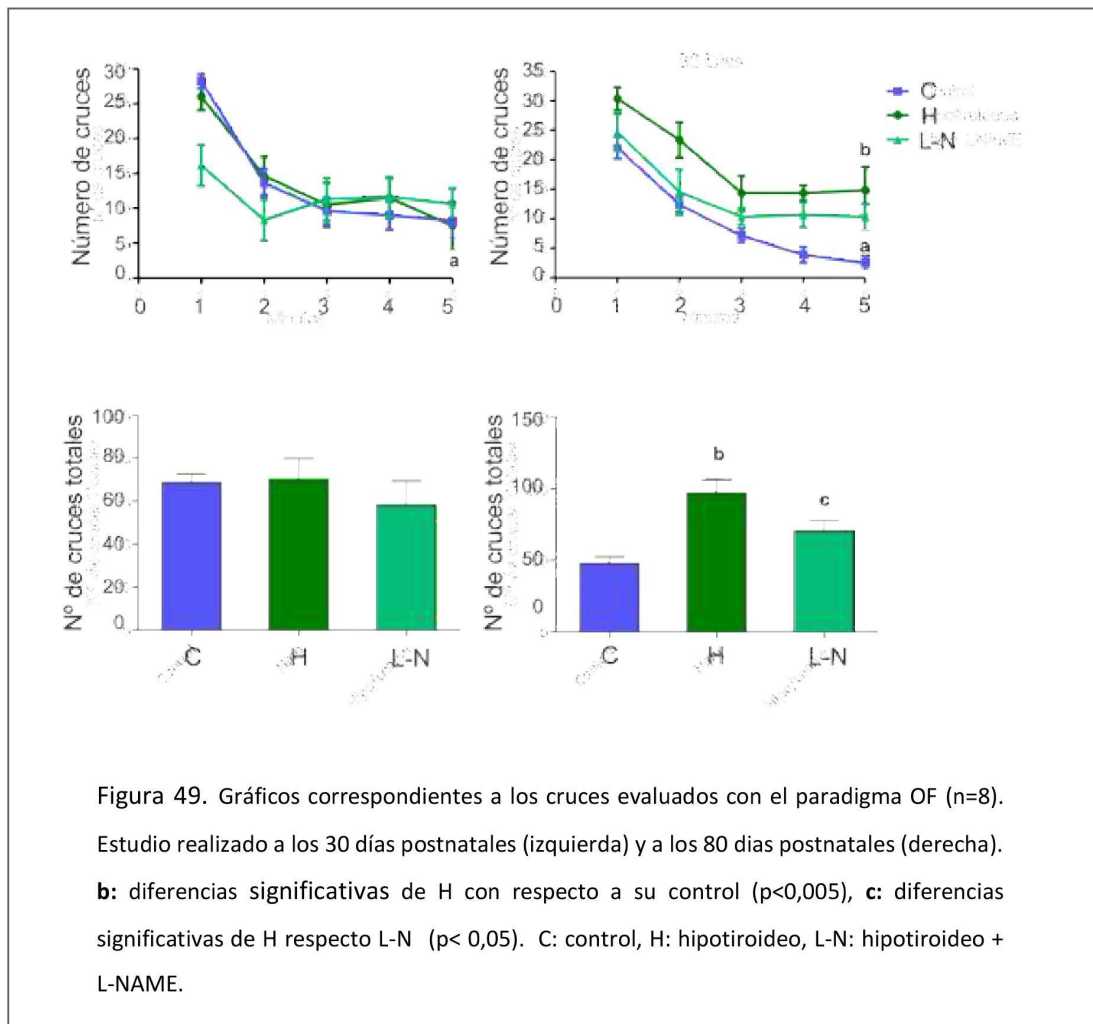


Figura 49. Gráficos correspondientes a los cruces evaluados con el paradigma OF (n=8). Estudio realizado a los 30 días postnatales (izquierda) y a los 80 días postnatales (derecha). **b**: diferencias significativas de H con respecto a su control ($p < 0,005$), **c**: diferencias significativas de H respecto L-N ($p < 0,05$). C: control, H: hipotiroideo, L-N: hipotiroideo + L-NAME.

Por último, se evaluó el número de veces que los animales se levantaban sobre sus patas traseras (rearings). Al igual que el tiempo en el centro del campo, este parámetro es asociado a conductas relacionadas a la ansiedad y al aprendizaje espacial. En este caso se observó una mejora significativa en este parámetro por parte del grupo tratado con respecto al grupo hipotiroideo a los 80 días.

Resultados

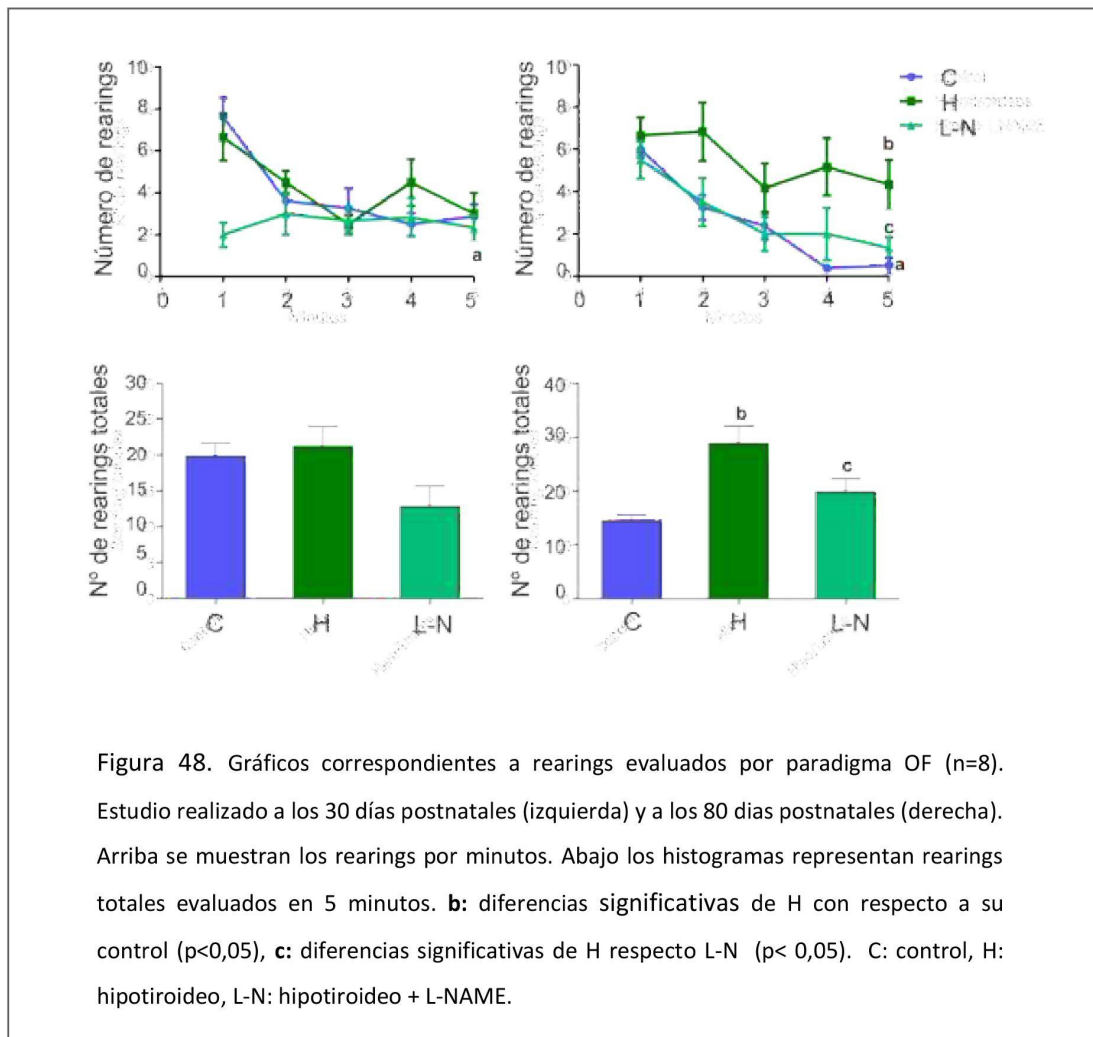
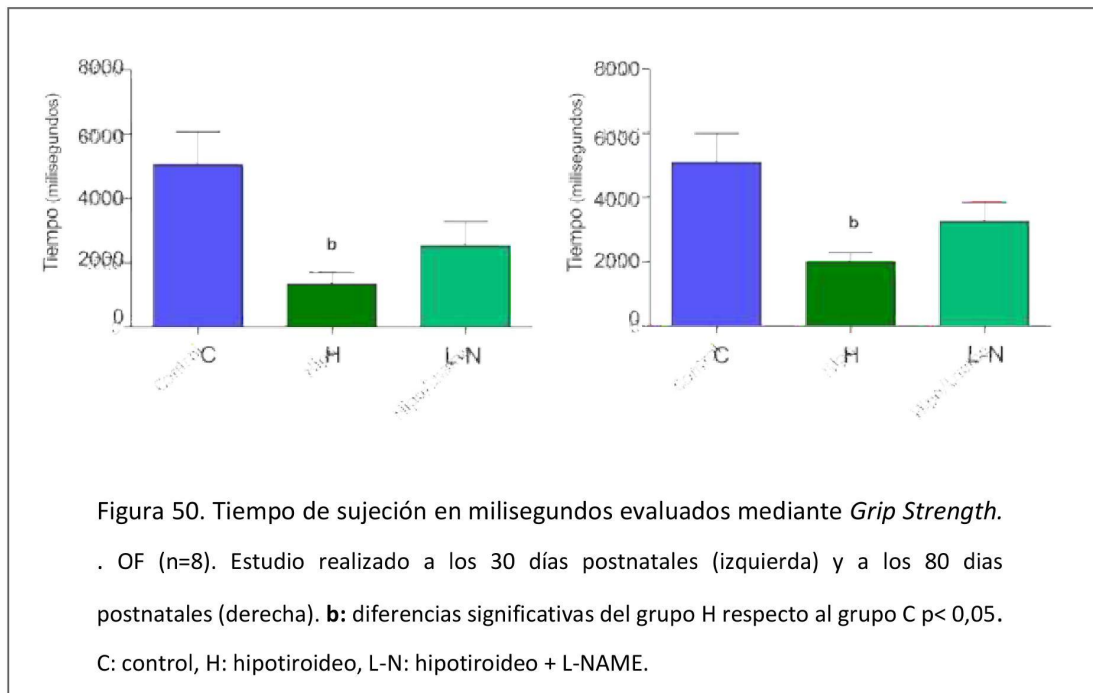


Figura 48. Gráficos correspondientes a rearings evaluados por paradigma OF (n=8). Estudio realizado a los 30 días postnatales (izquierda) y a los 80 días postnatales (derecha). Arriba se muestran los rearings por minutos. Abajo los histogramas representan rearings totales evaluados en 5 minutos. **b**: diferencias significativas de H con respecto a su control ($p < 0,05$), **c**: diferencias significativas de H respecto L-N ($p < 0,05$). C: control, H: hipotiroideo, L-N: hipotiroideo + L-NAME.

El *Grip Strength test*, ensayo que permite medir la fuerza de agarre de las extremidades anteriores es utilizado como indicador de la función neuromuscular. Como se ve en la Figura 49, las ratas hipotiroideas presentan una disminución significativa de la performance con respecto a lo observado en las ratas del grupo control tanto a los 30 como a los 80 días, $p < 0,05$. En cambio, las ratas hipotiroideas tratadas con L-NAME, tanto a los 30 como a los 80 días, mostraron un mejor rendimiento en los resultados de dicho test. Esta mejoría parcial no significativa fue suficiente como para que el grupo tratado no sea distinguible estadísticamente al grupo control observándose una reversión parcial del fenotipo hipotiroideo.

Resultados



Los resultados comprendidos en éste último capítulo demuestran que aumento de NO producido por el hipotiroidismo congénito en la etapa perinatal, modificó el metabolismo mitocondrial e incrementó la expresión de genes relacionados con el deterioro cognitivo en P30. Este fenómeno sumado a la apoptosis observada previamente se vincula a anomalías conductuales asociadas a la ansiedad y aprendizaje observadas en los animales a los 80 días post-natales.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

10 DISCUSIÓN.

El hipotiroidismo es un desorden endócrino asociado a la disminución de la utilización del oxígeno y de la tasa de proliferación celular (Hoch 1988, Carreras, Peralta et al. 2001, Moro, Marra et al. 2004) que, cuando se genera de manera congénita tiene como consecuencias malformaciones, retraso en el crecimiento, anomalías en el desarrollo de órganos y déficit cognitivo (Rastogi and LaFranchi 2010, Kallen and Norstedt Wikner 2014)

A nivel mitocondrial el hipotiroidismo genera disfunción en la cadena respiratoria, aumentando la producción de radicales libres, y disminuye las defensas antioxidantes (Amara, Bouaziz et al. 2010, Jena and Bhanja 2014) contrariamente a lo esperado, dado que la supresión metabólica que ejerce la falta de HT, al disminuir la utilización de O₂ también disminuiría la tasa de ROS producidas habitualmente, a través de la cadena respiratoria.

Por otra parte, trabajos realizados en nuestro laboratorio demostraron que la disminución de hormonas tiroideas, luego de 28 días de tratamiento con metimazol, incrementan la expresión y translocación de nNOS en mitocondrias de hígado de rata (Franco2006). Como consecuencia, se produce la nitración e inhibición del complejo I, reduciendo el consumo de oxígeno basal.

A su vez, el NO, a través de la inhibición de la cadena respiratoria, conduce al aumento de ROS. Anteriormente se implicaba la generación de ROS sólo en procesos fisiopatológicos; en los últimos años, se ha demostrado su participación en la regulación de múltiples vías de señalización específica (Coyoy, Olguin-Albuerne et al. 2013, Urao and Ushio-Fukai 2013, Basu, Rajakaruna et al. 2014)

En esta Tesis, se describen los mecanismos por los cuales el NO genera alteraciones durante el desarrollo post-natal de hígado y cerebro actuando sobre vías de señalización mitocondriales, en la fisiopatología del hipotiroidismo congénito.

Discusión y conclusiones

Se utilizó un modelo de hipotiroidismo congénito por administración de metimazol, el cual produjo un cambio en el patrón de expresión de la enzima nNOS y su localización subcelular. El aumento de NO provocó la inhibición de los complejos I y IV de la cadena respiratoria mitocondrial incrementando la producción de ROS lo que modificó la dinámica mitocondrial tanto en cerebro como en hígado. Estos cambios finalmente condujeron a la activación de vías apoptóticas que en cerebro alteraron el patrón apoptótico/proliferativo de células neuronales afectando los procesos de establecimiento de la memoria.

Como primera aproximación, se evaluaron los niveles de TSH en grupos hipotiroideos y control en cada estadio post-natal estudiado (P5-P15 y P30) para confirmar el efecto del metimazol administrado a las madres sobre la producción de hormona tiroidea embrionaria y post-natal. Los resultados hallados son consecuentes con un hipotiroidismo embrionario y perinatal en rata, y se relacionan directamente con la disminución de T3 y T4 provocada por metimazol (Hood, Liu et al. 1999). Estudios anteriores permiten establecer que el metimazol atraviesa la barrera placentaria y se transmite por la leche materna (Mortimer, Cannell et al. 1997, Streetman and Khanderia 2003). De acuerdo con la literatura, el hipotiroidismo materno y durante la primera mitad del desarrollo embrionario resulta en un retraso del crecimiento, el cual se evidenció por el peso corporal reducido que mostró el grupo hipotiroideo respecto a los controles en los estadios post-natales 15-30. Si bien el hipotiroidismo inducido por metimazol reduce la ingesta diaria en ratas adultas y recién nacidas (Alva-Sanchez, Pacheco-Rosado et al. 2012), está ampliamente demostrado que la disminución en el peso corporal se debe mayormente a la disminución en la producción de hormona de crecimiento (GH, del inglés growth hormone) que muestran crías de madres a las que se administró metimazol (Ahmed, Abd El-Tawab et al. 2010) o incluso, la reducción del peso puede deberse a que disminuye la expresión de IGF-I (del inglés: insulin-like growth factor-1, el cual depende de HT y afecta a la proliferación celular además de proteger contra la apoptosis (Xing, Govoni et al. 2012).

Trabajos anteriores realizados por nuestro laboratorio y por varios grupos de investigación asociaron numerosas patologías, tales como diabetes y obesidad, sepsis,

Discusión y conclusiones

enfermedades neurodegenerativas y particularmente el status tiroideo con modificaciones de la expresión de nNOS y eNOS. A su vez estas dos enzimas se ven fuertemente involucradas en la fisiopatología de la enfermedad (Carrillo-Sepulveda, Ceravolo et al. 2010, Finocchietto, Holod et al. 2011).

Por otra parte, previamente documentamos que durante el desarrollo embrionario y postnatal temprano del hígado de rata, una variante mitocondrial de nNOS regula a través del estado oxidativo la proliferación de los hepatocitos (Carreras, Converso et al. 2004). De este modo, el análisis del patrón de expresión de nNOS en hígado nos permitió observar que durante el desarrollo post-natal, modificó el patrón de localización mitocondrial generando un incremento en mitocondrias en el día 30 post-natal. Si bien la actividad de la enzima sólo se ve aumentada en la fracción citosólica, los resultados de expresión son consistentes con la producción de NO ensayada en mitocondrias por incorporación de DAF (figura 24).

Durante el desarrollo fetal y neonatal existe un incremento en la función mitocondrial con el fin de proveer la energía para el desarrollo adecuado de los tejidos. La maduración de la cadena respiratoria mitocondrial entonces, varía según el tipo de tejido y el estadio del desarrollo (Valcarce, Vitorica et al. 1990, Almeida, Bates et al. 1994) . Del análisis de las actividades de los complejos de la cadena respiratoria en mitocondrias de hígado, podemos concluir que durante el desarrollo post-natal normal no se alteró la actividad del complejo IV en mitocondrias de hígado, mientras que aumentó la actividad del complejo I. En el hipotiroidismo congénito la actividad del complejo I permaneció igual al basal (P5), siendo significativamente menor que los controles en los estadios P15 y P30, y revertido por la infusión de L-NAME a valores controles (figura25). Si bien se sabe que las HT regulan la expresión de las diferentes subunidades de los complejos I y IV de la cadena respiratoria (Sheehan, Kumar et al. 2004), la evidencia sugiere que no existe una correlación de la expresión de las mismas con la actividad de los complejos, especialmente en hígado (Fernandez-Vizarra, Enriquez et al. 2011). Por otra parte, la localización subcelular de nNOS sería esencial para la focalización de los efectos del NO sobre la regulación del consumo de oxígeno mitocondrial, como lo describieron previamente (Carreras, Peralta et al. 2001) en

Discusión y conclusiones

hígado y músculo esquelético de rata y (Barouch, Harrison et al. 2002) en corazón de ratón. De esta manera, y considerando que el NO actúa directamente sobre los complejos de la cadena respiratoria para disminuir su actividad y que el tratamiento con el inhibidor L-NAME revirtió las actividades de CI, se confirma la relación entre el NO mitocondrial y la disminución de actividad del C I provocada por el hipotiroidismo.

De acuerdo a lo descrito por (Poderoso, Carreras et al. 1996) a concentraciones bajas de NO (menores a 100nM) aumenta la producción mitocondrial de O_2^- y H_2O_2 a través de la inhibición del complejo citocromo oxidasa. Si bien, en los resultados de actividad de complejo IV no se ve una inhibición significativa, la producción de O_2^- ensayada en hepatocitos se incremento significativamente por el hipotiroidismo en el día 30 y fue revertida por el tratamiento con L-NAME entre los días (5-15) indicando que responde al aumento en los niveles de NO mitocondrial. Una de las formas de incrementar la producción de superóxido podría ser por aumento de la actividad de NADPH oxidasas, pero numerosos trabajos indican que la activación de las mismas conduciría a la estimulación de la producción de NO y no de manera contraria, es decir que la expresión y actividad de NADPH oxidasas no son inducidas por aumento de NO y tampoco revertidas por inhibición del mismo (Bodiga, Gruenloh et al. 2010).

Por otra parte, a concentraciones mayores de NO (0,5 μ M), se dirige la actividad de la cadena respiratoria en su mayoría, a la formación de O_2^- . Este O_2^- al unirse al NO produce ONOO-, que es capaz de inhibir la actividad del C I por nitración. Si bien se describió que el aumento de NO mitocondrial puede resultar en una inhibición selectiva del complejo I sin formación de ONOO- por inhibición de la enzima α -cetoglutarato deshidrogenasa, encargada de proporcionar el NADH al complejo I (Hsu, Srinivas et al. 2005), en el 2006, Franco demostró que la disminución de hormonas tiroideas genera una reducción en el metabolismo mitocondrial, por medio de la nitración del complejo I en mitocondrias de hígado de rata y su consecuente inhibición. De acuerdo a la producción de H_2O_2 ensayada en mitocondrias de hígado en el estadio 30 (Figura 27), estadio en el cual se observó la producción máxima de O_2^- , no hay diferencias significativas entre las producciones de los

Discusión y conclusiones

diferentes grupos, estos datos podrían estar indicando que el O_2^- se desplazó hacia la formación de ONOO⁻.

Hay cada vez más evidencia que relaciona el aumento de ROS con los cambios producidos en la dinámica mitocondrial (Su, Chiu et al. 2014, Watanabe, Saotome et al. 2014). Sin embargo, esta interacción es bidireccional; pero hasta el presente no se hallan bien definidos los parámetros que la regulan. Así, la fisión mitocondrial puede a menudo generar un aumento en la producción de ROS, así como también está documentado el aumento de fisión resultante de la producción de ROS por inhibición de la cadena de transporte de electrones (Guillery, Malka et al. 2008).

En la presente tesis se evaluó en hígado de rata la expresión de las proteínas que regulan la dinámica mitocondrial por q-PCR y western blot con el objeto de establecer una correlación entre los cambios en la producción de oxidantes y la estructura mitocondrial. Durante el desarrollo normal, se observó la disminución del ARNm para Opa1, sin manifestarse diferencias en la transcripción de Mfn2 y Drp-1. Sin embargo, el hipotiroidismo produjo un incremento transcripcional sobre Mfn2 en el día 15 y Drp1 en el día 30 postnatal (Figura 28), consecuente con el aumento de estrés oxidativo mediado por NO y siendo esta inducción revertida por L-NAME.

En cuanto a los niveles mitocondriales de las proteínas de dinámica evaluados mediante western blot, durante el desarrollo normal de hígado se observó una disminución progresiva en la expresión de las proteínas de fusión Mfn2 y Opa1 y un aumento de Drp1 involucrada en fisión. Este patrón podría explicar la distribución aislada de las mitocondrias en hepatocitos adultos (Kuznetsov, Hermann et al. 2009). En el hipotiroidismo congénito no se observaron cambios en la expresión de las proteínas de dinámica durante el desarrollo perinatal, ni respuesta por el tratamiento con el inhibidor de la NOS.

Muchos de los efectos mitocondriales de las hormonas tiroideas en el hígado, están relacionados al NO y vinculados a cambios en el metabolismo mitocondrial y basal. En otros tejidos y órganos tales como el cerebro la relevancia de las hormonas tiroideas es

Discusión y conclusiones

fundamental durante el desarrollo embrionario y postnatal temprano, ya que coordinan los procesos de morfogénesis y maduración del sistema nervioso central. Estas hormonas regulan el crecimiento dendrítico y axonal y la formación sináptica. La deficiencia de hormonas tiroideas en los períodos prenatal y neonatal produce retraso en el crecimiento y severo deterioro cognitivo. El deterioro cognitivo puede manifestarse como déficit en atención y procesamiento de memoria, inteligencia general y habilidades visual-espaciales.

Teniendo el conocimiento de que el NO en el cerebro actúa como un mensajero secundario y tiene importantes funciones como neurotransmisor y neuromodulador además de la creciente evidencia que lo relaciona a los procesos de (long term potentiation) LTP, uno de los principales objetivos de esta tesis fue evaluar el cambio en los niveles mitocondriales de NO y las vías específicas a través de las cuales actúa para generar las consecuencias del desarrollo hipotiroideo anómalo en cerebro. Durante el hipotiroidismo congénito los patrones postnatales de expresión mitocondrial de nNOS fueron alterados aumentando considerablemente en los días 15 y 30 postnatal. En 2002, en nuestro laboratorio se advirtió que durante el desarrollo embrionario y postnatal normal del cerebro, una variante de nNOS se reclutaba a la membrana interna mitocondrial (Riobó,2002); sin embargo, los niveles mitocondriales de nNOS son superiores respecto al desarrollo normal en las etapas postnatales evaluadas. Hay cada vez más evidencia que relaciona la expresión aumentada de nNOS con enfermedades neurodegenerativas a través del daño oxidativo/nitrosativo generado (Ortiz Mdel, Lores-Arnaiz et al. 2013, Aliev, Priyadarshini et al. 2014) y considerando que la cadena respiratoria mitocondrial es una de las fuentes de ROS principales en la célula, es importante considerar el efecto nocivo que podría tener su confinamiento en la mitocondria.

La Oxido Nítrico Sintasa Neuronal es una variante cuya actividad se ve regulada por los niveles de Ca intracelulares. En cerebro la isoforma predominante es la neuronal, y dado que el análisis de las variantes de mtNOS sugiere que no cruza con eNOS (Lacza, Snipes et al. 2003, Ghafourifar and Cadenas 2005, Hall, Wang et al. 2012), se pueden atribuir los niveles de actividad de NOS Ca-dependiente ensayados a la isoforma neuronal especialmente en las fracciones mitocondriales donde la actividad Ca dependiente

Discusión y conclusiones

aumenta en P15 paralelamente con la expresión de nNOS en el hipotiroidismo congénito (Figura 31). Los resultados demuestran que posterior al tratamiento de la fracción mitocondrial con proteínasa K, utilizada con el fin de remover proteínas de la superficie mitocondrial, la expresión de nNOS se mantiene aumentada significativamente por el hipotiroidismo en P15 y P30.

Tal como describimos anteriormente en mitocondrias de hígado, la expresión de nNOS se ve regulada por las hormonas tiroideas. Adicionalmente, Hosseini y col. relacionaron en el 2010 el aumento de óxido nítrico en cerebro producido por el hipotiroidismo neonatal con anomalías en el comportamiento ensayado mediante tests conductuales; sin embargo, no se estableció el origen de dicha alteración. Considerando que en hígado el hipotiroidismo genera el aumento de ROS por inhibición de la actividad de los complejos I y IV de la cadena de transporte de electrones, analizamos el efecto del NO sobre los complejos I y IV en mitocondrias de cerebro, cómo influye este fenómeno en la formación de ROS y en qué momento específico del desarrollo post-natal. Nuestros resultados muestran que el hipotiroidismo congénito generó la disminución de la actividad del complejo IV en estadios tempranos (Figura 33) y redujo de manera significativa la actividad de complejo I en P15, este comportamiento se revirtió cuando inhibimos la producción de NO por infusión con L-NAME en animales hipotiroideos. De manera que el NO produce en primera instancia la inhibición reversible del complejo IV para luego inhibir por nitración al complejo I; este fenómeno ocurre a concentraciones mayores y recíproco al aumento de oxidantes, como se discutió previamente. El patrón de los niveles de DHE nos permitió asociar la producción de superóxido a los niveles de NO mitocondrial y la disfunción observada principalmente en el complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial más que a los valores citosólicos; de esta manera, se dirigió el análisis de la producción de H_2O_2 a los estadios donde el hipotiroidismo resultó en un aumento significativo tanto de NO como O_2^- , el cual fue P15 para cerebro. El análisis de los niveles de O_2^- y H_2O_2 , a su vez, fue consistente con la inhibición de complejo I indicando que a los 15 días post-natales el hipotiroidismo ejerce un efecto inhibitorio sobre la actividad mitocondrial y el desbalance redox a través del aumento mitocondrial de NO. Antecedentes del estudio en hipotiroidismo neonatal de los

Discusión y conclusiones

niveles de ROS y la expresión de enzimas antioxidantes demuestran que este período del desarrollo en el cerebro está sujeto a importantes cambios en los niveles basales de actividad enzimática por lo cual un aumento de ROS generado por la falta de hormonas tiroideas puede conducir a drásticas alteraciones morfológicas y a la proliferación celular (Bhanja and Jena 2013).

Muchas de las enfermedades neurodegenerativas están asociadas a cambios no sólo en ultraestructura sino en la morfología y dinámica de los eventos de fusión-fisión mitocondrial (Cuesta, Pedrola et al. 2002, Zuchner, Mersiyanova et al. 2004, Waterham, Koster et al. 2007, Deng, Dodson et al. 2008, Poole, Thomas et al. 2008, Yang, Weissman et al. 2008). La neurodegeneración asociada a esas patologías sugiere que la función y supervivencia de neuronas depende de la dinámica mitocondrial. Anteriormente se discutió el papel de ROS en los cambios sufridos en la fusión-fisión mitocondrial. Sin embargo, en el contexto del desarrollo neuronal, tanto la producción de ROS como la dinámica mitocondrial varían de acuerdo a los requerimientos energéticos y de diferenciación del tejido (Villeneuve, Stauch et al. 2014). Estudios recientes asociaron la neuroapoptosis y alteraciones en sinaptogénesis en ratas de 5 días post-natales sometidas a anestesia (isofluorano y óxido nitroso) , al aumento de la fisión mitocondrial por reclutamiento de Drp-1 en mitocondrias de cerebro ocasionada por el desbalance redox (Boscolo, Milanovic et al. 2013); A su vez se demostró que las anomalías en el comportamiento y morfología del cerebro ocasionadas por estrés durante la etapa prenatal generan aumento de ROS y sobreexpresión de Drp-1 y Mfn2 que llevan finalmente a la apoptosis y mitofagia de mitocondrias hipocampales (Feng, Zou et al. 2012). Estos trabajos apoyan nuestros resultados donde la expresión aumentada de nNOS y ROS observada en P15 incrementó la fisión mitocondrial por expresión y reclutamiento mitocondrial de Drp-1 en el siguiente estadio (P30). Todos estos cambios son revertidos por la inhibición del NO y se evidencia que en P15 la administración del inhibidor de NOS incrementa la transcripción de Mfn-2 y Opa1 que participan en el proceso de fusión pudiendo de esta manera compensar la fisión aumentada que el hipotiroidismo genera en P15. En paralelo, el aumento de Drp-1 se correlacionó con el observado en hígado en la

Discusión y conclusiones

etapa perinatal más tardía (Figura 38) y se logró revertir por inhibición de la producción de L-NAME. Se sabe que la sobreexpresión de Mfns o un dominante negativo de Drp1 previenen parcialmente la fisión mitocondrial y la muerte neuronal por NO. Otro estudio encontró que el estrés oxidativo promueve la fisión mitocondrial en neuronas granulares del cerebelo, y que la sobreexpresión de Mfn2 contribuye a la protección de las mismas (Jahani-Asl, Cheung et al. 2007). En este trabajo nos planteamos evaluar que contribución tienen las alteraciones en la dinámica mitocondrial y su relación con el aumento de ROS durante el desarrollo en el hipotiroidismo.

Las MAPKs mediante su vía señalización median múltiples procesos celulares durante el desarrollo normal del cerebro, incluyendo la expresión génica, el movimiento, el metabolismo, la diferenciación, la proliferación y la muerte celular programada y frecuentemente son reguladas por ROS (Grewal, York et al. 1999) Las MAPKs Erk 1/2 responden a señales extracelulares como factores de crecimiento, y hormonas activan la vía Erk (Sweatt 2001), mientras que JNK se activa principalmente por estímulos de estrés y se asocian en gran medida con la muerte celular programada en el cerebro (Xia, Dickens et al. 1995). En el hipocampo, Erk ha estado implicado en los fenómenos de plasticidad neural, tales como potenciación a largo plazo (LTP), depresión a largo plazo (LTD) y formación de la memoria (Ping and Schafe 2010) y recientemente se ha evidenciado que JNK se ve también implicado en la modulación de la plasticidad del hipocampo (Sweatt 2001, Seo, Hong et al. 2012). El estudio de la regulación de Erk establece la relación entre la activación hipocampal de la quinasa con aprendizaje realizado en Morris Water Maze y también la fosforilación en la región CA1 durante LTP (Sweatt 2001). Por otra parte, se sabe que el hipotiroidismo es capaz de alterar el patrón de activación en cerebelo de rata durante la etapa 8-12 post-natal (Mathies, Mattson et al. 2009). En base a lo expuesto en la bibliografía, nuestros resultados indican que efectivamente hay un patrón de activación durante el desarrollo, que es máximo en P30 cuando ya el SNC se encuentra maduro, y que el hipotiroidismo disminuye precisamente la fosforilación de Erk en ese período crítico, la que podría estar afectando tanto el aprendizaje como la sinaptogénesis o la proliferación hipocampal. Contrariamente, el hipotiroidismo incrementó considerablemente la

Discusión y conclusiones

fosforilación de JNK en los días 5 y 30 post-natales lo que es consecuente tanto al aumento de NO (P5) como de la producción de ROS dependientes de NO (P30) y reversible de manera significativa por administración de L-NAME, esto concuerda con datos que revelan que el hipotiroidismo hiperfosforila a JNK en cerebro post-natal de rata para disminuir el transporte axonal y conducir a la apoptosis hipocampal vía PI3K/Akt/GsK3 en el día 7 postnatal en un modelo de neurodegeneración (Cattani, Goulart et al. 2013, Shah, Lee et al. 2014)

Una de las vías apoptóticas principales la constituye la vía intrínseca que involucra la señalización mitocondrial y el reclutamiento de las proteínas Bax y Bcl-2, estudios recientes en un modelo neurodegenerativo de Alzheimer en rata demuestran que la activación hipocampal de JNK conduce a la apoptosis a través del aumento de la expresión de Bax en función de Bcl-2 y tiene como consecuencia alteraciones en el comportamiento, paralelamente en este modelo el aumento de ROS disminuye la expresión de Erk (Ramin, Azizi et al. 2011, Ashabi, Ramin et al. 2012). En nuestro modelo, los cambios en JNK y el aumento de Bax en la superficie mitocondrial se correlacionan con la literatura, pero también puede verse en la Figura 41 que el aumento de oxidantes generados en forma dependiente de NO en el estadio 15 post-natal conducen en ese estadio a la disminución de Bcl-2 en mitocondrias y que el reclutamiento de Bax se produce en P30.

El hipocampo es el principal componente en la consolidación de la memoria, y el más sensible a la privación de hormonas tiroideas. El hipotiroidismo genera dificultades cognitivas y retrasos en el aprendizaje asociados a alteraciones hipocampales (Gerges and Alkadhi 2004, Gerges, Alzoubi et al. 2004, Zhu, Wang et al. 2006) y conduce a cambios en la plasticidad y transmisión sináptica en el cerebro adulto; a su vez, el déficit de hormonas tiroideas en el cerebro adulto conduce a la pérdida de neuronas hipocampales (Alva-Sanchez, Ortiz-Butron et al. 2002, Gilbert 2004). Sin embargo, el mecanismo por el cual genera el daño celular se desconoce. Se observó que durante el hipotiroidismo las mitocondrias sinápticas se vuelven más susceptibles al estrés oxidativo y aumentan los niveles de factores pro-apoptóticos (Zhuravliova, Barbakadze et al. 2012). El análisis de la liberación de citocromo c en nuestro modelo reveló que el reclutamiento de Bax en P30 se

Discusión y conclusiones

condice exactamente con el estadio en que se produce el aumento citosólico de citocromo c (Figura 42). El estudio de la expresión de las proteínas de la familia de Bcl-2 en el desarrollo normal del cerebro muestra una expresión elevada en las dos primeras semanas post-natales y luego va disminuyendo en la cuarta semana post-natal, el balance entre proteínas pro y anti apoptóticas determina una ventana de susceptibilidad para el cerebro en desarrollo a los agentes que dirigen la apoptosis por la vía mitocondrial (Shimohama, Fujimoto et al. 1998, Soane, Siegel et al. 2008). Por otra parte, el desarrollo apropiado del SNC requiere un balance coordinado entre eventos de proliferación y apoptosis (Kim and Sun 2011). La activación de la apoptosis por la vía intrínseca, originada por la liberación de citocromo c desde la mitocondria al citosol, es principalmente regulada por incrementos en los niveles de ROS. En esta tesis corroboramos que el hipotiroidismo congénito mediante el aumento de ROS, alteró el patrón mitocondrial de Bcl-2 y Bax produciendo apoptosis por la vía mitocondrial. Los resultados de apoptosis ensayada por TUNEL coincidieron con la liberación mitocondrial de citocromo c, en este modelo, la inhibición en la producción de NO por administración de L-NAME fue capaz de revertir ambos efectos e incluso el reclutamiento mitocondrial de Bax ocasionados por el hipotiroidismo. Es importante considerar que a través del NO el hipotiroidismo generó un aumento en la expresión de Drp-1 en P30 como se discutió anteriormente, este fenómeno coincide con el aumento de la apoptosis observado en la Figura 43, y a su vez es consistente con la afirmación de que la fisión mitocondrial es necesaria para la apoptosis generada por la vía intrínseca. Todavía se desconoce qué evento se produce primero, pero estudios realizados en cultivos de neuronas corticales de rata confirman que la down-regulación de Drp-1 evita la fragmentación y posterior liberación de citocromo c y revierte la muerte celular inducida por NO (Barsoum, Yuan et al. 2006).

Todos estos cambios que el hipotiroidismo congénito generó en la etapa perinatal y que convergen en la alteración completa del patrón apoptótico-proliferativo, se asocian con las alteraciones conductuales de aprendizaje y ansiedad. Dado que el aprendizaje tiene sus bases fisiológicas en el fenómeno de LTP (De Roo, Klauser et al. 2008), nuestros resultados permitieron corroborar el impacto del hipotiroidismo congénito en dicho fenómeno. Tanto

Discusión y conclusiones

Pkc como CHP se ven fuertemente involucradas en la transmisión sináptica, y si bien son necesarios para el establecimiento de plasticidad sináptica en el cerebro en desarrollo (Nakamura, Miyake et al. 2002, Sinha, Khare et al. 2009, Mogha, Guariglia et al. 2012), estudios realizados en ratas transgénicas con síndrome de ADHD (Desorden de hiperactividad, déficit de atención y autismo), correlacionan la expresión hipocampal aumentada para los genes de CHP y Pkc en la etapa postnatal de 28 días. Dichos genes regulan la activación o inhibición de Calcineurina y finalmente su acción sobre los receptores NMDA en el fenómeno de LTP (Zhang-James, Middleton et al. 2012). En nuestro modelo, resultados similares del aumento transcripcional en CHP y Pkc indican que el hipotiroidismo congénito puede regular la transcripción de genes involucrados en LTP, probablemente mediante la liberación del Ca^+ mitocondrial. Esta liberación puede producirse durante el fenómeno de liberación de citocromo c, como también por una modificación del contacto entre el retículo plasmático y la mitocondria, el cual esta mediado por la acción de Mfn2 y Drp-1 entre otras proteínas mitocondriales (Takeuchi, Kim et al. 2015).

En cuanto a la regulación transcripcional de Atf4, nuestros resultados mostraron que el hipotiroidismo congénito produce un aumento significativo en la etapa P5 y P30. ATF4 es un factor de transcripción involucrado en la vía CREB capaz de dirigir la apoptosis en cerebro por diversos factores, como influjo de Ca y la activación de JNK y se ve fuertemente estimulado en patologías neurodegenerativas como Alzheimer (DeGracia, Kumar et al. 2002). De acuerdo con los resultados obtenidos, la disfunción mitocondrial y fosforilación de JNK podrían estar regulando la transcripción de ATF4 para inducir apoptosis, como lo demuestran nuestros resultados de apoptosis hipocampal; pero a su vez, incrementos en los niveles de ARNm de ATF4 actúan a través de la vía de CREB subiendo el umbral de los fenómenos de LTP y LTD, impidiendo que estos ocurran y dado que tenemos una inducción temprana de la transcripción de ATF4 en P5, este fenómeno podría ocurrir anteriormente a P30 (Costa-Mattioli, Gobert et al. 2007).

De esta manera, el efecto del hipotiroidismo sobre los tres genes involucrados en LTP que se asocian a la disfunción mitocondrial observada en cerebro durante el desarrollo, parece

Discusión y conclusiones

ser impulsado por aumento de los niveles de Ca mitocondriales producto de la permeabilización mitocondrial y alteraciones en la estructura y dinámica mitocondrial, a su vez estas consecuencias son reversibles si se inhibe la producción de NO entre días los 7-15 postnatales.

Por otra parte, los niveles de ARNm para Neurogranina no se alteraron ni por el hipotiroidismo ni por el aumento de NO ocurrido en esta etapa perinatal. Nrg también regula el fenómeno de LTP pero se ve directamente vinculada tanto a la acción de las hormonas tiroideas como del NO y menos asociada a metabolismo mitocondrial. De este modo, estos resultados demostraron que los efectos sobre LTP no son dados precisamente por los aumento de NO, sino la acción del mismo sobre el metabolismo y estructura mitocondrial y sus consecuencias, como los son la producción de oxidantes, la permeabilización de la membrana externa y la liberación de citocromo c. Sin embargo, la administración de L-NAME dirige un aumento de 15 veces en los niveles de expresión de Nrg, indicando una liberación en la represión transcripcional más que un efecto compensatorio. Resultados similares se obtuvieron en estudios del gen reportero de Nrg sometido a diferentes dosis de NO, Se observó que el NO tiene un efecto bifásico sobre la transcripción de Nrg; a tasas bajas de NO, éste incrementa la transcripción pero a tasas elevadas o sobreexpresión de nNOS la transcripción de Nrg disminuye hasta un 40% lo que indicaría que de alguna manera a niveles fisiopatológicos de NO, como los que se observan durante la etapa perinatal en nuestro modelo de hipotiroidismo, puede reprimir la transcripción de Nrg (Gui, Song et al. 2007).

Muchos estudios farmacológicos o genéticos en roedores han mostrado correlaciones entre la capacidad de expresar las propiedades de LTP y LTD con el rendimiento de aprendizaje en estudios de comportamiento (Tang, Shimizu et al. 1999, Cui, Wang et al. 2004). En esta tesis nos proponemos ver el efecto de la activación de genes de estrés que modulan el fenómeno de LTP con el desempeño de animales perinatales y adultos en estudios de aprendizaje y neuromotores.

Discusión y conclusiones

Está descrito que la falta de hormona T3 incrementa la latencia en comportamientos relacionados a la disminución en la sensibilidad del sistema nervioso central por esta hormona, aumentando la actividad motora y disminuyendo la ansiedad.

La exposición forzada a un ambiente novedoso es considerado aversivo y estresante (Welker 1959, Bardo, Donohew et al. 1996) El tiempo en el centro del campo abierto (open field), la cantidad de cruces por el centro del mismo y el número de levantamientos en sus patas traseras (rearings) son parámetros utilizados para evaluar la emocionalidad de los animales, evidenciando los niveles de ansiedad que experimentan ante este tipo de ambientes novedosos. A su vez, estos parámetros pueden ser usados como marcadores de habituación y aprendizaje en el open field (Platel and Porsolt 1982, Vianna, Alonso et al. 2000). En los experimentos conductuales realizados se observó que los animales hipotiroideos aumentaron el número de cruces, permanencia en el centro y rearings consistente con lo observado en animales con hipotiroidismo perinatal (Darbra, Balada et al. 1995) . Notablemente los animales tratados con L-NAME revierten estos parámetros, acercándose a lo observado en los animales control. Por su parte, a través del grip test, técnica que permite realizar estudios sobre los efectos en el desarrollo neuromotor de ratas y ratones (Meyer, Tilson et al. 1979), se observó una mejoría en el mismo entre los 30 y 80 días de los animales tratados con respecto a los hipotiroideos, los cuales además de no observar mejorías entre el primer test y el último, presentaban problemas en el tono muscular asociado a un desarrollo deficiente. Estos resultados evidencian que el hipotiroidismo congénito conduce a alteraciones en el desarrollo disminuyendo la competencia neuromotora, incrementando la locomoción y ansiedad en los animales con hipotiroidismo.

Nuestros resultados sugieren que el NO, que modula la activación e interrelación de los genes relacionados a LTP, juega un papel central en el desarrollo del comportamiento. Este fenómeno se evidencia en la reversión parcial y en algunos casos total del fenotipo hipotiroideo por el tratamiento con el inhibidor de la NOS (L-NAME).

Discusión y conclusiones

Por otra parte, déficits cognitivos están ampliamente asociados a la muerte de neuronas hipocampales (Royo, Conte et al. 2006). En nuestro modelo pudimos corroborar que el hipotiroidismo a través del aumento de NO produce la muerte de células hipocampales, que de alguna manera podría correlacionarse con las anomalías conductuales y motoras observadas.

El objetivo de este estudio fue evaluar si L-NAME puede atenuar la disfunción metabólica y estructural de la mitocondria, el reclutamiento mitocondrial de Bax, la liberación de citocromo c y la muerte celular en el hipocampo, y dilucidar cómo los mecanismos del NO mitocondrial se relacionan con la respuesta neuronal inducida por ROS en una etapa específica del desarrollo del cerebro postnatal. Podemos concluir que en lo que respecta al aprendizaje o establecimiento de la memoria, al ser un fenómeno complejo en el que intervienen numerosos factores, el efecto del NO no es tan evidente. Sin embargo, el L-NAME pudo revertir completamente los efectos a nivel de estructura mitocondrial y muerte celular producidos por falta de hormona tiroidea en el hipocampo perinatal, indicando que esos procesos son fuertemente inducidos en el hipotiroidismo congénito mediante el aumento mitocondrial de NO.

Uno de los primeros parámetros modificados por el hipotiroidismo es la ansiedad dado que el comportamiento ansioso está asociado a la liberación de dopamina, alteraciones en el desarrollo cerebelar e incluso alteraciones en el sistema serotoninérgico, causadas por la deficiencia de hormonas tiroideas (Koibuchi 2008, Olivares, Silva-Almeida et al. 2012). La segunda alteración más importante sufrida en humanos y muy estudiada en animales es la deficiencia en el aprendizaje, como anteriormente se mencionó, por retraso en la migración de la capa granulosa del hipocampo, alteraciones en el perfil génico durante el desarrollo o malformaciones durante la maduración del SNC. Las hormonas tiroideas juegan un complejo papel en la determinación de patrones conductuales como consecuencia de su acción integral durante el desarrollo y mantenimiento de las funciones fisiológicas (Pineda-Reynoso, Cano-Europa et al. 2010, Markova, Chernopiatko et al. 2013, Vasudevan, Morgan et al. 2013).

11 CONCLUSIONES.

En la presente tesis se analizaron las consecuencias del hipotiroidismo congénito en la etapa perinatal, en dos tejidos blanco de hormonas tiroideas como son el hígado y cerebro, teniendo como objeto relacionar los cambios en la localización de nNOS que produce el hipotiroidismo congénito con los procesos mitocondriales asociados a la fisiopatología de esta enfermedad.

Los resultados conducen a las siguientes conclusiones:

- El hipotiroidismo congénito se manifestó en la etapa perinatal con una disminución del peso corporal desde el día 15 de las crías.
- En el hígado, el hipotiroidismo modificó el patrón de expresión y localización de nNOS llevando a cambios significativos en la etapa perinatal tardía con aumento en la producción de NO mitocondrial. En esta etapa, se produjo la inhibición del complejo I y el aumento de la producción de O_2^- ; estos parámetros no presentaron una variación significativa durante el desarrollo normal.
- Los cambios generados por el hipotiroidismo a través del aumento de NO modificaron la regulación transcripcional de las proteínas de dinámica mitocondrial, incrementando los niveles de Mfn2 en la etapa temprana y Drp1 en la etapa más tardía del desarrollo hepático.
- Durante el desarrollo perinatal del cerebro, donde ocurren la morfogénesis, formación de sinapsis y consolidación de la memoria, se observan los cambios más importantes producidos por el NO mitocondrial. El incremento de NO mitocondrial se produce en forma temprana, y a través del aumento en la producción de ROS, dirige cambios en la dinámica mitocondrial, estimulando la expresión de la proteína de fisión Drp1 en forma NO-dependiente.

Discusión y conclusiones

- El aumento de ROS en cerebro, consecuencia del aumento de NO, genera en la etapa perinatal tardía, disminución de la activación de Erk1/2 y una activación de JNK que, junto al reclutamiento de Bax en la mitocondria, desencadena la liberación de citocromo *c* al citosol. Estos cambios podrían ser consecuentes con la apoptosis en células hipocampales y probablemente estén asociados al incremento de la expresión de Drp1.

Por otro lado, estudios en el mecanismo de establecimiento de la memoria a partir del fenómeno de LTP revelan que el NO altera la expresión genes involucrados en dicho fenómeno en las etapas más tardías del desarrollo perinatal, probablemente a través del aumento de ROS. Estos cambios se asociaron con alteraciones conductuales, principalmente ansiedad y alteraciones de la memoria espacial, que fueron observadas en los animales hipotiroideos. Las anomalías conductuales que comúnmente se observan en el hipotiroidismo pueden ser revertidas en mayor o menor medida por la inhibición de la producción de NO en la etapa temprana del desarrollo perinatal.

11.1 Direcciones futuras

Dado que se plantea al óxido nítrico mitocondrial como principal efector, debido al aumento de ROS como consecuencia de la disfunción de los complejos I y IV de la cadena respiratoria, consecuente con la localización mitocondrial de nNOS, se observa que la inhibición en la producción de NO reduce los niveles mitocondriales de nNOS, de manera que se podría plantear como pregunta futura cual es el papel del NO en el reclutamiento mitocondrial de la enzima.

Por otra parte, se plantea en esta tesis que la apoptosis de neuronas hipocampales y la alteración del fenómeno de LTP son consecuencias principales del hipotiroidismo a través del aumento del NO mitocondrial. Son necesarias más investigaciones para dilucidar el mecanismo específico que podría vincular el aumento de Drp1 con el reclutamiento mitocondrial de Bax y cómo está relacionada la activación de JNK con el proceso

Discusión y conclusiones

apoptótico en este modelo. A su vez, el aumento de genes de estrés involucrados en LTP podría vincularse a la apoptosis hipocampal y a las alteraciones conductuales; el vínculo correcto entre la bioquímica mitocondrial y la conducta lo podrían constituir ensayos fisiológicos que permitan medir el fenómeno de LTP, tan afectado por el NO.

REFERENCIAS

12 REFERENCIAS.

Adams, M. E., H. A. Mueller and S. C. Froehner (2001). "In vivo requirement of the alpha-syntrophin PDZ domain for the sarcolemmal localization of nNOS and aquaporin-4." J Cell Biol **155**(1): 113-122.

Ara, J., S. Przedborski, A. B. Naini, V. Jackson-Lewis, R. R. Trifiletti, J. Horwitz and H. Ischiropoulos (1998). "Inactivation of tyrosine hydroxylase by nitration following exposure to peroxynitrite and 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(13): 7659-7663.

Balaban, R. S., S. Nemoto and T. Finkel (2005). "Mitochondria, oxidants, and aging." Cell **120**(4): 483-495.

Balaszczuk, A. M., A. Tomat, S. Bellucci, A. Fellet and C. Arranz (2002). "Nitric oxide synthase blockade and body fluid volumes." Braz J Med Biol Res **35**(1): 131-134.

Bates, K., C. E. Ruggeroli, S. Goldman and M. A. Gaballa (2002). "Simvastatin restores endothelial NO-mediated vasorelaxation in large arteries after myocardial infarction." Am J Physiol Heart Circ Physiol **283**(2): H768-775.

Beckman, J. S., T. W. Beckman, J. Chen, P. A. Marshall and B. A. Freeman (1990). "Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(4): 1620-1624.

Bender, T. and J. C. Martinou (2013). "Where killers meet--permeabilization of the outer mitochondrial membrane during apoptosis." Cold Spring Harb Perspect Biol **5**(1): a011106.

Bergh, J. J., H. Y. Lin, L. Lansing, S. N. Mohamed, F. B. Davis, S. Mousa and P. J. Davis (2005). "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**(7): 2864-2871.

Bernal, J. and B. Morte (2013). "Thyroid hormone receptor activity in the absence of ligand: physiological and developmental implications." Biochim Biophys Acta **1830**(7): 3893-3899.

Boveris, A., L. B. Valdez, S. Alvarez, T. Zaobornyj, A. D. Boveris and A. Navarro (2003). "Kidney mitochondrial nitric oxide synthase." Antioxid Redox Signal **5**(3): 265-271.

Bradley, D. J., H. C. Towle and W. S. Young, 3rd (1994). "Alpha and beta thyroid hormone receptor (TR) gene expression during auditory neurogenesis: evidence for TR isoform-specific transcriptional regulation in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(2): 439-443.

Brand, M. D. (2005). "The efficiency and plasticity of mitochondrial energy transduction." Biochem Soc Trans **33**(Pt 5): 897-904.

Brand, M. D. (2010). "The sites and topology of mitochondrial superoxide production." Exp Gerontol **45**(7-8): 466-472.

Bredt, D. S. and S. H. Snyder (1990). "Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(2): 682-685.

Brenman, J. E., H. Xia, D. S. Chao, S. M. Black and D. S. Bredt (1997). "Regulation of neuronal nitric oxide synthase through alternative transcripts." Dev Neurosci **19**(3): 224-231.

Bustamante, J., G. Bersier, R. A. Badin, C. Cymeryng, A. Parodi and A. Boveris (2002). "Sequential NO production by mitochondria and endoplasmic reticulum during induced apoptosis." Nitric Oxide **6**(3): 333-341.

Cao, X., F. Kambe, M. Yamauchi and H. Seo (2009). "Thyroid-hormone-dependent activation of the phosphoinositide 3-kinase/Akt cascade requires Src and enhances neuronal survival." Biochem J **424**(2): 201-209.

Carreras, M. C., J. G. Peralta, D. P. Converso, P. V. Finocchietto, I. Rebagliati, A. A. Zaninovich and J. J. Poderoso (2001). "Modulation of liver mitochondrial NOS is implicated in thyroid-dependent regulation of O₂ uptake." Am J Physiol Heart Circ Physiol **281**(6): H2282-2288.

Carreras, M. C. and J. J. Poderoso (2007). "Mitochondrial nitric oxide in the signaling of cell integrated responses." Am J Physiol Cell Physiol **292**(5): C1569-1580.

Cavallo, A., A. Gnoni, E. Conte, L. Siculella, F. Zanotti, S. Papa and G. V. Gnoni (2011). "3,5-diiodo-L-thyronine increases FoF1-ATP synthase activity and cardiolipin level in liver mitochondria of hypothyroid rats." J Bioenerg Biomembr **43**(4): 349-357.

Cooper, D. S. (1984). "Antithyroid drugs." N Engl J Med **311**(21): 1353-1362.

Crane, B. R., A. S. Arvai, D. K. Ghosh, C. Wu, E. D. Getzoff, D. J. Stuehr and J. A. Tainer (1998). "Structure of nitric oxide synthase oxygenase dimer with pterin and substrate." Science **279**(5359): 2121-2126.

Crane, B. R., R. J. Rosenfeld, A. S. Arvai, D. K. Ghosh, S. Ghosh, J. A. Tainer, D. J. Stuehr and E. D. Getzoff (1999). "N-terminal domain swapping and metal ion binding in nitric oxide synthase dimerization." Embo j **18**(22): 6271-6281.

Cui, Z., H. Wang, Y. Tan, K. A. Zaia, S. Zhang and J. Z. Tsien (2004). "Inducible and reversible NR1 knockout reveals crucial role of the NMDA receptor in preserving remote memories in the brain." Neuron **41**(5): 781-793.

Chandel, N. S. (2010). "Mitochondrial regulation of oxygen sensing." Adv Exp Med Biol **661**: 339-354.

Chen, P. F., A. L. Tsai, V. Berka and K. K. Wu (1996). "Endothelial nitric-oxide synthase. Evidence for bidomain structure and successful reconstitution of catalytic activity from two separate domains generated by a baculovirus expression system." J Biol Chem **271**(24): 14631-14635.

Cheng, S. Y., J. L. Leonard and P. J. Davis (2010). "Molecular aspects of thyroid hormone actions." Endocr Rev **31**(2): 139-170.

Chinta, S. J. and J. K. Andersen (2006). "Reversible inhibition of mitochondrial complex I activity following chronic dopaminergic glutathione depletion in vitro: implications for Parkinson's disease." Free Radic Biol Med **41**(9): 1442-1448.

Chipuk, J. E., T. Moldoveanu, F. Llambi, M. J. Parsons and D. R. Green (2010). "The BCL-2 family reunion." Mol Cell **37**(3): 299-310.

Daury, L., M. Busson, F. Casas, I. Cassar-Malek, C. Wrutniak-Cabello and G. Cabello (2001). "The triiodothyronine nuclear receptor c-ErbA α 1 inhibits avian MyoD transcriptional activity in myoblasts." FEBS Lett **508**(2): 236-240.

Davis, C. W., B. J. Hawkins, S. Ramasamy, K. M. Irrinki, B. A. Cameron, K. Islam, V. P. Daswani, P. J. Doonan, Y. Manevich and M. Madesh (2010). "Nitration of the mitochondrial complex I subunit NDUF8 elicits RIP1- and RIP3-mediated necrosis." Free Radic Biol Med **48**(2): 306-317.

Davis, P. J., A. Shih, H. Y. Lin, L. J. Martino and F. B. Davis (2000). "Thyroxine promotes association of mitogen-activated protein kinase and nuclear thyroid hormone receptor (TR) and causes serine phosphorylation of TR." J Biol Chem **275**(48): 38032-38039.

Deeb, R. S., G. Hao, S. S. Gross, M. Laine, J. H. Qiu, B. Resnick, E. J. Barbar, D. P. Hajjar and R. K. Upmacis (2006). "Heme catalyzes tyrosine 385 nitration and inactivation of prostaglandin H2 synthase-1 by peroxynitrite." J Lipid Res **47**(5): 898-911.

Del Viscovo, A., A. Secondo, A. Esposito, F. Goglia, M. Moreno and L. M. Canzoniero (2012). "Intracellular and plasma membrane-initiated pathways involved in the [Ca²⁺]_i elevations induced by iodothyronines (T3 and T2) in pituitary GH3 cells." Am J Physiol Endocrinol Metab **302**(11): E1419-1430.

Dhanasekaran, D. N. and E. P. Reddy (2008). "JNK signaling in apoptosis." Oncogene **27**(48): 6245-6251.

Di Sole, F., K. Vadnagara, O. W. Moe and V. Babich (2012). "Calcineurin homologous protein: a multifunctional Ca²⁺-binding protein family." Am J Physiol Renal Physiol **303**(2): F165-179.

Diez-Guerra, F. J. (2010). "Neurogranin, a link between calcium/calmodulin and protein kinase C signaling in synaptic plasticity." IUBMB Life **62**(8): 597-606.

Dong, H., C. L. Yauk, A. Williams, A. Lee, G. R. Douglas and M. G. Wade (2007). "Hepatic gene expression changes in hypothyroid juvenile mice: characterization of a novel negative thyroid-responsive element." Endocrinology **148**(8): 3932-3940.

Dudkina, N. V., H. Eubel, W. Keegstra, E. J. Boekema and H. P. Braun (2005). "Structure of a mitochondrial supercomplex formed by respiratory-chain complexes I and III." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(9): 3225-3229.

Elfering, S. L., T. M. Sarkela and C. Giulivi (2002). "Biochemistry of mitochondrial nitric-oxide synthase." J Biol Chem **277**(41): 38079-38086.

Farrugia, G. and R. Balzan (2012). "Oxidative stress and programmed cell death in yeast." Front Oncol **2**: 64.

Farsetti, A., B. Desvergne, P. Hallenbeck, J. Robbins and V. M. Nikodem (1992). "Characterization of myelin basic protein thyroid hormone response element and its function in the context of native and heterologous promoter." J Biol Chem **267**(22): 15784-15788.

Farwell, A. P., S. A. Dubord-Tomasetti, A. Z. Pietrzykowski and J. L. Leonard (2006). "Dynamic nongenomic actions of thyroid hormone in the developing rat brain." Endocrinology **147**(5): 2567-2574.

Feil, R. and T. Kleppisch (2008). "NO/cGMP-dependent modulation of synaptic transmission." Handb Exp Pharmacol(184): 529-560.

Ferreira, A. C., L. P. Lima, R. L. Araujo, G. Muller, R. P. Rocha, D. Rosenthal and D. P. Carvalho (2005). "Rapid regulation of thyroid sodium-iodide symporter activity by thyrotrophin and iodine." J Endocrinol **184**(1): 69-76.

Finkel, T. (2011). "Signal transduction by reactive oxygen species." J Cell Biol **194**(1): 7-15.

Fischmann, T. O., A. Hruza, X. D. Niu, J. D. Fossetta, C. A. Lunn, E. Dolphin, A. J. Prongay, P. Reichert, D. J. Lundell, S. K. Narula and P. C. Weber (1999). "Structural characterization of nitric oxide synthase isoforms reveals striking active-site conservation." Nat Struct Biol **6**(3): 233-242.

Forstermann, U. and W. C. Sessa (2012). "Nitric oxide synthases: regulation and function." Eur Heart J **33**(7): 829-837, 837a-837d.

Frandsenn, U., J. Bangsbo, M. Sander, L. Hoffner, A. Betak, B. Saltin and Y. Hellsten (2001). "Exercise-induced hyperaemia and leg oxygen uptake are not altered during effective

inhibition of nitric oxide synthase with N(G)-nitro-L-arginine methyl ester in humans." J Physiol **531**(Pt 1): 257-264.

French, S., C. Giulivi and R. S. Balaban (2001). "Nitric oxide synthase in porcine heart mitochondria: evidence for low physiological activity." Am J Physiol Heart Circ Physiol **280**(6): H2863-2867.

Galo, M. G., L. E. Unates and R. N. Farias (1981). "Effect of membrane fatty acid composition on the action of thyroid hormones on (Ca²⁺ + Mg²⁺)-adenosine triphosphatase from rat erythrocyte." J Biol Chem **256**(14): 7113-7114.

Garcin, E. D., C. M. Bruns, S. J. Lloyd, D. J. Hosfield, M. Tiso, R. Gachhui, D. J. Stuehr, J. A. Tainer and E. D. Getzoff (2004). "Structural basis for isozyme-specific regulation of electron transfer in nitric-oxide synthase." J Biol Chem **279**(36): 37918-37927.

Garthwaite, G., K. Bartus, D. Malcolm, D. Goodwin, M. Kollb-Sielecka, C. Dooleniya and J. Garthwaite (2006). "Signaling from blood vessels to CNS axons through nitric oxide." J Neurosci **26**(29): 7730-7740.

Garthwaite, J. (2008). "Concepts of neural nitric oxide-mediated transmission." Eur J Neurosci **27**(11): 2783-2802.

Ghafourifar, P. and C. Richter (1997). "Nitric oxide synthase activity in mitochondria." FEBS Lett **418**(3): 291-296.

Ghosh, D. K., H. M. Abu-Soud and D. J. Stuehr (1995). "Reconstitution of the second step in NO synthesis using the isolated oxygenase and reductase domains of macrophage NO synthase." Biochemistry **34**(36): 11316-11320.

Giulivi, C., A. Boveris and E. Cadenas (1995). "Hydroxyl radical generation during mitochondrial electron transfer and the formation of 8-hydroxydesoxyguanosine in mitochondrial DNA." Arch Biochem Biophys **316**(2): 909-916.

Giulivi, C., J. J. Poderoso and A. Boveris (1998). "Production of nitric oxide by mitochondria." J Biol Chem **273**(18): 11038-11043.

Gruez, A., D. Pignol, M. Zeghouf, J. Coves, M. Fontecave, J. L. Ferrer and J. C. Fontecilla-Camps (2000). "Four crystal structures of the 60 kDa flavoprotein monomer of the sulfite reductase indicate a disordered flavodoxin-like module." J Mol Biol **299**(1): 199-212.

Gui, J., Y. Song, N. L. Han and F. S. Sheu (2007). "Characterization of transcriptional regulation of neurogranin by nitric oxide and the role of neurogranin in SNP-induced cell death: implication of neurogranin in an increased neuronal susceptibility to oxidative stress." Int J Biol Sci **3**(4): 212-224.

Gunter, T. E., D. I. Yule, K. K. Gunter, R. A. Eliseev and J. D. Salter (2004). "Calcium and mitochondria." FEBS Lett **567**(1): 96-102.

Hall, A. V., H. Antoniou, Y. Wang, A. H. Cheung, A. M. Arbus, S. L. Olson, W. C. Lu, C. L. Kau and P. A. Marsden (1994). "Structural organization of the human neuronal nitric oxide synthase gene (NOS1)." J Biol Chem **269**(52): 33082-33090.

Haun, F., T. Nakamura, A. D. Shiu, D. H. Cho, T. Tsunemi, E. A. Holland, A. R. La Spada and S. A. Lipton (2013). "S-nitrosylation of dynamin-related protein 1 mediates mutant huntingtin-induced mitochondrial fragmentation and neuronal injury in Huntington's disease." Antioxid Redox Signal **19**(11): 1173-1184.

Hekimi, S., J. Lapointe and Y. Wen (2011). "Taking a "good" look at free radicals in the aging process." Trends Cell Biol **21**(10): 569-576.

Heuer, H. and T. J. Visser (2009). "Minireview: Pathophysiological importance of thyroid hormone transporters." Endocrinology **150**(3): 1078-1083.

Janssens, S. P., A. Shimouchi, T. Quertermous, D. B. Bloch and K. D. Bloch (1992). "Cloning and expression of a cDNA encoding human endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide synthase." J Biol Chem **267**(21): 14519-14522.

Jassam, N., T. J. Visser, T. Brisco, D. Bathia, P. McClean and J. H. Barth (2011). "Consumptive hypothyroidism: a case report and review of the literature." Ann Clin Biochem **48**(Pt 2): 186-189.

Kanai, A. J., L. L. Pearce, P. R. Clemens, L. A. Birder, M. M. VanBibber, S. Y. Choi, W. C. de Groat and J. Peterson (2001). "Identification of a neuronal nitric oxide synthase in isolated

cardiac mitochondria using electrochemical detection." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(24): 14126-14131.

Kim, D. W., J. W. Park, M. C. Willingham and S. Y. Cheng (2014). "A histone deacetylase inhibitor improves hypothyroidism caused by a TRalpha1 mutant." Hum Mol Genet **23**(10): 2651-2664.

Kim, W. R. and W. Sun (2011). "Programmed cell death during postnatal development of the rodent nervous system." Dev Growth Differ **53**(2): 225-235.

Klatt, P., K. Schmidt, F. Brunner and B. Mayer (1994). "Inhibitors of brain nitric oxide synthase. Binding kinetics, metabolism, and enzyme inactivation." J Biol Chem **269**(3): 1674-1680.

Knott, A. B., G. Perkins, R. Schwarzenbacher and E. Bossy-Wetzel (2008). "Mitochondrial fragmentation in neurodegeneration." Nat Rev Neurosci **9**(7): 505-518.

Kuiper, G. G., E. Enmark, M. Peltö-Huikko, S. Nilsson and J. A. Gustafsson (1996). "Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(12): 5925-5930.

Kumar, A., R. A. Sinha, M. Tiwari, L. Pal, A. Shrivastava, R. Singh, K. Kumar, S. Kumar Gupta and M. M. Godbole (2006). "Increased pro-nerve growth factor and p75 neurotrophin receptor levels in developing hypothyroid rat cerebral cortex are associated with enhanced apoptosis." Endocrinology **147**(10): 4893-4903.

Landles, C., S. Chalk, J. H. Steel, I. Rosewell, B. Spencer-Dene, N. Lalani el and M. G. Parker (2003). "The thyroid hormone receptor-associated protein TRAP220 is required at distinct embryonic stages in placental, cardiac, and hepatic development." Mol Endocrinol **17**(12): 2418-2435.

Lange, P. S., J. C. Chavez, J. T. Pinto, G. Coppola, C. W. Sun, T. M. Townes, D. H. Geschwind and R. R. Ratan (2008). "ATF4 is an oxidative stress-inducible, prodeath transcription factor in neurons in vitro and in vivo." J Exp Med **205**(5): 1227-1242.

Larsen, F. J., T. A. Schiffer, E. Weitzberg and J. O. Lundberg (2012). "Regulation of mitochondrial function and energetics by reactive nitrogen oxides." Free Radic Biol Med **53**(10): 1919-1928.

Leal, A. L., T. U. Pantaleao, D. G. Moreira, M. P. Marassi, V. S. Pereira, D. Rosenthal and V. M. Correa da Costa (2007). "Hypothyroidism and hyperthyroidism modulates Ras-MAPK intracellular pathway in rat thyroids." Endocrine **31**(2): 174-178.

Lee, B. K. and Y. S. Jung (2012). "The Na⁺/H⁺ exchanger-1 inhibitor cariporide prevents glutamate-induced necrotic neuronal death by inhibiting mitochondrial Ca²⁺ overload." J Neurosci Res **90**(4): 860-869.

Lee, J. M., M. C. Grabb, G. J. Zipfel and D. W. Choi (2000). "Brain tissue responses to ischemia." J Clin Invest **106**(6): 723-731.

Lee, Y. J., S. Y. Jeong, M. Karbowski, C. L. Smith and R. J. Youle (2004). "Roles of the mammalian mitochondrial fission and fusion mediators Fis1, Drp1, and Opa1 in apoptosis." Mol Biol Cell **15**(11): 5001-5011.

Lee, Y. S. and A. J. Silva (2009). "The molecular and cellular biology of enhanced cognition." Nat Rev Neurosci **10**(2): 126-140.

Lein, E. S., M. J. Hawrylycz, N. Ao, M. Ayres, A. Bensinger, A. Bernard, A. F. Boe, M. S. Boguski, K. S. Brockway, E. J. Byrnes, L. Chen, L. Chen, T. M. Chen, M. C. Chin, J. Chong, B. E. Crook, A. Czaplinska, C. N. Dang, S. Datta, N. R. Dee, A. L. Desaki, T. Desta, E. Diep, T. A. Dolbeare, M. J. Donelan, H. W. Dong, J. G. Dougherty, B. J. Duncan, A. J. Ebbert, G. Eichele, L. K. Estin, C. Faber, B. A. Facer, R. Fields, S. R. Fischer, T. P. Fliss, C. Frensley, S. N. Gates, K. J. Glattfelder, K. R. Halverson, M. R. Hart, J. G. Hohmann, M. P. Howell, D. P. Jeung, R. A. Johnson, P. T. Karr, R. Kawal, J. M. Kidney, R. H. Knapik, C. L. Kuan, J. H. Lake, A. R. Laramee, K. D. Larsen, C. Lau, T. A. Lemon, A. J. Liang, Y. Liu, L. T. Luong, J. Michaels, J. J. Morgan, R. J. Morgan, M. T. Mortrud, N. F. Mosqueda, L. L. Ng, R. Ng, G. J. Orta, C. C. Overly, T. H. Pak, S. E. Parry, S. D. Pathak, O. C. Pearson, R. B. Puchalski, Z. L. Riley, H. R. Rockett, S. A. Rowland, J. J. Royall, M. J. Ruiz, N. R. Sarno, K. Schaffnit, N. V. Shapovalova, T. Sivasay, C. R. Slaughterbeck, S. C. Smith, K. A. Smith, B. I. Smith, A. J. Sodt, N. N. Stewart, K. R. Stumpf, S. M. Sunkin, M. Sutram, A. Tam, C. D. Teemer, C. Thaller, C. L. Thompson, L. R. Varnam, A. Visel, R. M. Whitlock, P. E. Wohnoutka, C. K. Wolkey, V. Y. Wong, M. Wood, M. B. Yaylaoglu, R. C. Young, B. L. Youngstrom, X. F. Yuan, B. Zhang, T. A. Zwingman and A. R. Jones (2007). "Genome-wide atlas of gene expression in the adult mouse brain." Nature **445**(7124): 168-176.

Liu, Y., H. C. Zaun, J. Orlowski and S. L. Ackerman (2013). "CHP1-mediated NHE1 biosynthetic maturation is required for Purkinje cell axon homeostasis." J Neurosci **33**(31): 12656-12669.

Lopez-Garcia, M. P. and S. M. Sanz-Gonzalez (2000). "Peroxynitrite generated from constitutive nitric oxide synthase mediates the early biochemical injury in short-term cultured hepatocytes." FEBS Lett **466**(1): 187-191.

Lopez, C. J., I. Qayyum, O. P. Mishra and M. Delivoria-Papadopoulos (2005). "Effect of nitration on protein tyrosine phosphatase and protein phosphatase activity in neuronal cell membranes of newborn piglets." Neurosci Lett **386**(2): 78-81.

Lowenstein, C. J., J. L. Dinerman and S. H. Snyder (1994). "Nitric oxide: a physiologic messenger." Ann Intern Med **120**(3): 227-237.

Ma, T., M. A. Trinh, A. J. Wexler, C. Bourbon, E. Gatti, P. Pierre, D. R. Cavener and E. Klann (2013). "Suppression of eIF2alpha kinases alleviates Alzheimer's disease-related plasticity and memory deficits." Nat Neurosci **16**(9): 1299-1305.

MacMillan-Crow, L. A., J. S. Greendorfer, S. M. Vickers and J. A. Thompson (2000). "Tyrosine nitration of c-SRC tyrosine kinase in human pancreatic ductal adenocarcinoma." Arch Biochem Biophys **377**(2): 350-356.

Marsden, P. A., K. T. Schappert, H. S. Chen, M. Flowers, C. L. Sundell, J. N. Wilcox, S. Lamas and T. Michel (1992). "Molecular cloning and characterization of human endothelial nitric oxide synthase." FEBS Lett **307**(3): 287-293.

Martinez, B., P. del Hoyo, M. A. Martin, J. Arenas, A. Perez-Castillo and A. Santos (2001). "Thyroid hormone regulates oxidative phosphorylation in the cerebral cortex and striatum of neonatal rats." J Neurochem **78**(5): 1054-1063.

Mayer, B., M. John and E. Bohme (1990). "Purification of a Ca²⁺/calmodulin-dependent nitric oxide synthase from porcine cerebellum. Cofactor-role of tetrahydrobiopterin." FEBS Lett **277**(1-2): 215-219.

Menendez-Hurtado, A., E. Vega-Nunez, A. Santos and A. Perez-Castillo (1997). "Regulation by thyroid hormone and retinoic acid of the CCAAT/enhancer binding protein alpha and beta genes during liver development." Biochem Biophys Res Commun **234**(3): 605-610.

Miyashita, T. and J. C. Reed (1995). "Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene." Cell **80**(2): 293-299.

Moeller, L. C. and M. Broecker-Preuss (2011). "Transcriptional regulation by nonclassical action of thyroid hormone." Thyroid Res **4 Suppl 1**: S6.

Mozdy, A. D., J. M. McCaffery and J. M. Shaw (2000). "Dnm1p GTPase-mediated mitochondrial fission is a multi-step process requiring the novel integral membrane component Fis1p." J Cell Biol **151**(2): 367-380.

Osna, N. A., J. Haorah, V. M. Krutik and T. M. Donohue, Jr. (2004). "Peroxynitrite alters the catalytic activity of rodent liver proteasome in vitro and in vivo." Hepatology **40**(3): 574-582.

Otera, H., C. Wang, M. M. Cleland, K. Setoguchi, S. Yokota, R. J. Youle and K. Mihara (2010). "Mff is an essential factor for mitochondrial recruitment of Drp1 during mitochondrial fission in mammalian cells." J Cell Biol **191**(6): 1141-1158.

Pacher, P., J. S. Beckman and L. Liaudet (2007). "Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease." Physiol Rev **87**(1): 315-424.

Paine, M. J., A. P. Garner, D. Powell, J. Sibbald, M. Sales, N. Pratt, T. Smith, D. G. Tew and C. R. Wolf (2000). "Cloning and characterization of a novel human dual flavin reductase." J Biol Chem **275**(2): 1471-1478.

Park, M. Y., Y. J. Jeong, G. C. Kang, M. H. Kim, S. H. Kim, H. J. Chung, J. Y. Jung and W. J. Kim (2014). "Nitric oxide-induced apoptosis of human dental pulp cells is mediated by the mitochondria-dependent pathway." Korean J Physiol Pharmacol **18**(1): 25-32.

Patwari, P. and R. T. Lee (2007). "Thioredoxins, mitochondria, and hypertension." Am J Pathol **170**(3): 805-808.

Petrovic, N., G. Cvijic and V. Davidovic (2001). "The activity of antioxidant enzymes and the content of uncoupling protein-1 in the brown adipose tissue of hypothyroid rats: comparison with effects of iopanoic acid." Physiol Res **50**(3): 289-297.

Piantadosi, C. A. (2012). "Regulation of mitochondrial processes by protein S-nitrosylation." Biochim Biophys Acta **1820**(6): 712-721.

Poderoso, J. J., M. C. Carreras, C. Lisdero, N. Riobo, F. Schopfer and A. Boveris (1996). "Nitric oxide inhibits electron transfer and increases superoxide radical production in rat heart mitochondria and submitochondrial particles." Arch Biochem Biophys **328**(1): 85-92.

Poderoso, J. J., C. Lisdero, F. Schopfer, N. Riobo, M. C. Carreras, E. Cadenas and A. Boveris (1999). "The regulation of mitochondrial oxygen uptake by redox reactions involving nitric oxide and ubiquinol." J Biol Chem **274**(53): 37709-37716.

Radi, R., A. Cassina, R. Hodara, C. Quijano and L. Castro (2002). "Peroxynitrite reactions and formation in mitochondria." Free Radic Biol Med **33**(11): 1451-1464.

Rathje, M., H. Fang, J. L. Bachman, V. Anggono, U. Gether, R. L. Huganir and K. L. Madsen (2013). "AMPA receptor pHluorin-GluA2 reports NMDA receptor-induced intracellular acidification in hippocampal neurons." Proc Natl Acad Sci U S A **110**(35): 14426-14431.

Reaume, C. J. and M. B. Sokolowski (2009). "cGMP-dependent protein kinase as a modifier of behaviour." Handb Exp Pharmacol(191): 423-443.

Renken, C., G. Siragusa, G. Perkins, L. Washington, J. Nulton, P. Salamon and T. G. Frey (2002). "A thermodynamic model describing the nature of the crista junction: a structural motif in the mitochondrion." J Struct Biol **138**(1-2): 137-144.

Riobo, N. A., M. Melani, N. Sanjuan, M. L. Fiszman, M. C. Gravielle, M. C. Carreras, E. Cadenas and J. J. Poderoso (2002). "The modulation of mitochondrial nitric-oxide synthase activity in rat brain development." J Biol Chem **277**(45): 42447-42455.

Rojo, M., F. Legros, D. Chateau and A. Lombes (2002). "Membrane topology and mitochondrial targeting of mitofusins, ubiquitous mammalian homologs of the transmembrane GTPase Fzo." J Cell Sci **115**(Pt 8): 1663-1674.

Rujviphat, J., G. Meglei, J. L. Rubinstein and G. A. McQuibban (2009). "Phospholipid association is essential for dynamin-related protein Mgm1 to function in mitochondrial membrane fusion." J Biol Chem **284**(42): 28682-28686.

Russwurm, M., C. Russwurm, D. Koesling and E. Mergia (2013). "NO/cGMP: the past, the present, and the future." Methods Mol Biol **1020**: 1-16.

Sampath, P. D. and V. Kannan (2009). "Mitigation of mitochondrial dysfunction and regulation of eNOS expression during experimental myocardial necrosis by alpha-mangostin, a xanthonic derivative from *Garcinia mangostana*." Drug Chem Toxicol **32**(4): 344-352.

Schmidt, H. H. and F. Murad (1991). "Purification and characterization of a human NO synthase." Biochem Biophys Res Commun **181**(3): 1372-1377.

Schonhoff, C. M., B. Gaston and J. B. Mannick (2003). "Nitrosylation of cytochrome c during apoptosis." J Biol Chem **278**(20): 18265-18270.

Schussler, G. C. (2000). "The thyroxine-binding proteins." Thyroid **10**(2): 141-149.

Sena, L. A. and N. S. Chandel (2012). "Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species." Mol Cell **48**(2): 158-167.

Sheehan, T. E., P. A. Kumar and D. A. Hood (2004). "Tissue-specific regulation of cytochrome c oxidase subunit expression by thyroid hormone." Am J Physiol Endocrinol Metab **286**(6): E968-974.

Sherman, M. P., E. E. Aeberhard, V. Z. Wong, J. M. Griscavage and L. J. Ignarro (1993). "Pyrrolidine dithiocarbamate inhibits induction of nitric oxide synthase activity in rat alveolar macrophages." Biochem Biophys Res Commun **191**(3): 1301-1308.

Shi, Y. B. (2009). "Dual functions of thyroid hormone receptors in vertebrate development: the roles of histone-modifying cofactor complexes." Thyroid **19**(9): 987-999.

Silvestri, E., M. Moreno, L. Schiavo, P. de Lange, A. Lombardi, A. Chambery, A. Parente, A. Lanni and F. Goglia (2006). "A proteomics approach to identify protein expression changes in rat liver following administration of 3,5,3'-triiodo-L-thyronine." J Proteome Res **5**(9): 2317-2327.

Sinha, K., J. Das, P. B. Pal and P. C. Sil (2013). "Oxidative stress: the mitochondria-dependent and mitochondria-independent pathways of apoptosis." Arch Toxicol **87**(7): 1157-1180.

Sisalli, M. J., A. Secondo, A. Esposito, V. Valsecchi, C. Savoia, G. F. Di Renzo, L. Annunziato and A. Scorziello (2014). "Endoplasmic reticulum refilling and mitochondrial calcium

extrusion promoted in neurons by NCX1 and NCX3 in ischemic preconditioning are determinant for neuroprotection." Cell Death Differ **21**(7): 1142-1149.

Smith, B. C., E. S. Underbakke, D. W. Kulp, W. R. Schief and M. A. Marletta (2013). "Nitric oxide synthase domain interfaces regulate electron transfer and calmodulin activation." Proc Natl Acad Sci U S A **110**(38): E3577-3586.

Sonntag, M., A. Deussen and J. Schrader (1992). "Role of nitric oxide in local blood flow control in the anaesthetized dog." Pflugers Arch **420**(2): 194-199.

Souza, J. M. and R. Radi (1998). "Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase inactivation by peroxynitrite." Arch Biochem Biophys **360**(2): 187-194.

Stamler, J. S. and G. Meissner (2001). "Physiology of nitric oxide in skeletal muscle." Physiol Rev **81**(1): 209-237.

Stathatos, N. (2012). "Thyroid physiology." Med Clin North Am **96**(2): 165-173.

Strait, K. A., H. L. Schwartz, A. Perez-Castillo and J. H. Oppenheimer (1990). "Relationship of c-erbA mRNA content to tissue triiodothyronine nuclear binding capacity and function in developing and adult rats." J Biol Chem **265**(18): 10514-10521.

Tait, S. W. and D. R. Green (2012). "Mitochondria and cell signalling." J Cell Sci **125**(Pt 4): 807-815.

Takakura, K., J. S. Beckman, L. A. MacMillan-Crow and J. P. Crow (1999). "Rapid and irreversible inactivation of protein tyrosine phosphatases PTP1B, CD45, and LAR by peroxynitrite." Arch Biochem Biophys **369**(2): 197-207.

Takehara, Y., T. Kanno, T. Yoshioka, M. Inoue and K. Utsumi (1995). "Oxygen-dependent regulation of mitochondrial energy metabolism by nitric oxide." Arch Biochem Biophys **323**(1): 27-32.

Tal, M. C., M. Sasai, H. K. Lee, B. Yordy, G. S. Shadel and A. Iwasaki (2009). "Absence of autophagy results in reactive oxygen species-dependent amplification of RLR signaling." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(8): 2770-2775.

Tang, Y. P., E. Shimizu, G. R. Dube, C. Rampon, G. A. Kerchner, M. Zhuo, G. Liu and J. Z. Tsien (1999). "Genetic enhancement of learning and memory in mice." Nature **401**(6748): 63-69.

Tatoyan, A. and C. Giulivi (1998). "Purification and characterization of a nitric-oxide synthase from rat liver mitochondria." J Biol Chem **273**(18): 11044-11048.

Timmermans, W., H. Xiong, C. C. Hoogenraad and H. J. Krugers (2013). "Stress and excitatory synapses: from health to disease." Neuroscience **248**: 626-636.

Uria-Avellanal, C. and N. J. Robertson (2014). "Na(+)/H(+) exchangers and intracellular pH in perinatal brain injury." Transl Stroke Res **5**(1): 79-98.

Vadaszova, A., S. Hudecova, O. Krizanova and T. Soukup (2006). "Levels of myosin heavy chain mRNA transcripts and protein isoforms in the fast extensor digitorum longus muscle of 7-month-old rats with chronic thyroid status alterations." Physiol Res **55**(6): 707-710.

Vitecek, J., A. Lojek, G. Valacchi and L. Kubala (2012). "Arginine-based inhibitors of nitric oxide synthase: therapeutic potential and challenges." Mediators Inflamm **2012**: 318087.

Wakefield, I. D., J. E. March, P. A. Kemp, J. P. Valentin, T. Bennett and S. M. Gardiner (2003). "Comparative regional haemodynamic effects of the nitric oxide synthase inhibitors, S-methyl-L-thiocitrulline and L-NAME, in conscious rats." Br J Pharmacol **139**(6): 1235-1243.

Wang, Y., M. S. Goligorsky, M. Lin, J. N. Wilcox and P. A. Marsden (1997). "A novel, testis-specific mRNA transcript encoding an NH₂-terminal truncated nitric-oxide synthase." J Biol Chem **272**(17): 11392-11401.

Whitlock, J. R., A. J. Heynen, M. G. Shuler and M. F. Bear (2006). "Learning induces long-term potentiation in the hippocampus." Science **313**(5790): 1093-1097.

Wrutniak, C., I. Cassar-Malek, S. Marchal, A. Rasclé, S. Heusser, J. M. Keller, J. Flechon, M. Dauca, J. Samarut, J. Ghysdael and et al. (1995). "A 43-kDa protein related to c-Erb A alpha 1 is located in the mitochondrial matrix of rat liver." J Biol Chem **270**(27): 16347-16354.

Yen, P. M. (2001). "Physiological and molecular basis of thyroid hormone action." Physiol Rev **81**(3): 1097-1142.

Yoneda, M., A. Chomyn, A. Martinuzzi, O. Hurko and G. Attardi (1992). "Marked replicative advantage of human mtDNA carrying a point mutation that causes the MELAS encephalomyopathy." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(23): 11164-11168.

Zhang, H. M., N. Lin, Y. Dong, Q. Su and M. Luo (2013). "Protein kinase Calpha is involved in impaired perinatal hypothyroid rat brain development." J Neurosci Res **91**(2): 211-219.

Zhang, Y. H., C. Z. Jin, J. H. Jang and Y. Wang (2014). "Molecular mechanisms of neuronal nitric oxide synthase in cardiac function and pathophysiology." J Physiol **592**(Pt 15): 3189-3200.

Zhong, L. and N. Z. Gerges (2010). "Neurogranin and synaptic plasticity balance." Commun Integr Biol **3**(4): 340-342.

Zorzano, A., M. Liesa, D. Sebastian, J. Segales and M. Palacin (2010). "Mitochondrial fusion proteins: dual regulators of morphology and metabolism." Semin Cell Dev Biol **21**(6): 566-574.

Zou, A. P. and A. W. Cowley, Jr. (1997). "Nitric oxide in renal cortex and medulla. An in vivo microdialysis study." Hypertension **29**(1 Pt 2): 194-198.

Darbra, S., A. Garau, F. Balada, J. Sala and M. A. Marti-Carbonell (2003). "Perinatal hypothyroidism effects on neuromotor competence, novelty-directed exploratory and anxiety-related behaviour and learning in rats." Behav Brain Res **143**(2): 209-215.

Haba, G., H. Nishigori, M. Sasaki, K. Tohyama, K. Kudo, Y. Matsumura, T. Sugiyama, K. Kagami, Y. Tezuka, A. Sanbe and H. Nishigori (2014). "Altered magnetic resonance images of brain and social behaviors of hatchling, and expression of thyroid hormone receptor betamRNA in cerebellum of embryos after Methimazole administration." Psychopharmacology (Berl) **231**(1): 221-230.

Lahera, V., M. G. Salom, F. Miranda-Guardiola, S. Moncada and J. C. Romero (1991). "Effects of NG-nitro-L-arginine methyl ester on renal function and blood pressure." Am J Physiol **261**(6 Pt 2): F1033-1037.

Pineda-Reynoso, M., E. Cano-Europa, V. Blas-Valdivia, A. Hernandez-Garcia, M. Franco-Colin and R. Ortiz-Butron (2010). "Hypothyroidism during neonatal and perinatal period induced by thyroidectomy of the mother causes depressive-like behavior in prepubertal rats." Neuropsychiatr Dis Treat **6**: 137-143.

Riobo, N. A., M. Melani, N. Sanjuan, M. L. Fiszman, M. C. Gravielle, M. C. Carreras, E. Cadenas and J. J. Poderoso (2002). "The modulation of mitochondrial nitric-oxide synthase activity in rat brain development." J Biol Chem **277**(45): 42447-42455.

Sala-Roca, J., M. A. Marti-Carbonell, A. Garau, S. Darbra and F. Balada (2002). "Effects of chronic dysthyroidism on activity and exploration." Physiol Behav **77**(1): 125-133.

Shimokawa, N., B. Yousefi, S. Morioka, S. Yamaguchi, A. Ohsawa, H. Hayashi, A. Azuma, H. Mizuno, M. Kasagi, H. Masuda, H. Jingu, S. I. Furudate, A. Haijima, Y. Takatsuru, T. Iwasaki, M. Umezu and N. Koibuchi (2014). "Altered cerebellum development and dopamine distribution in a rat genetic model with congenital hypothyroidism." J Neuroendocrinol **26**(3): 164-175.

Tatoyan, A. and C. Giulivi (1998). "Purification and characterization of a nitric-oxide synthase from rat liver mitochondria." J Biol Chem **273**(18): 11044-11048.

Wahlsten, D. (2011). Chapter 3 - Tests of Mouse Behavior. Mouse Behavioral Testing. D. Wahlsten. London, Academic Press: 39-51.

Cadenas, E. and K. J. Davies (2000). "Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging." Free Radic Biol Med **29**(3-4): 222-230.

Chang, C. R. and C. Blackstone (2010). "Dynamic regulation of mitochondrial fission through modification of the dynamin-related protein Drp1." Ann N Y Acad Sci **1201**: 34-39.

De Roo, M., P. Klauser, P. M. Garcia, L. Poglia and D. Muller (2008). "Spine dynamics and synapse remodeling during LTP and memory processes." Prog Brain Res **169**: 199-207.

Gray, J. J., A. E. Zommer, R. J. Bouchard, N. Duval, C. Blackstone and D. A. Linseman (2013). "N-terminal cleavage of the mitochondrial fusion GTPase OPA1 occurs via a caspase-independent mechanism in cerebellar granule neurons exposed to oxidative or nitrosative stress." Brain Res **1494**: 28-43.

Hood, A., Y. P. Liu, V. H. Gattone, 2nd and C. D. Klaassen (1999). "Sensitivity of thyroid gland growth to thyroid stimulating hormone (TSH) in rats treated with antithyroid drugs." Toxicol Sci **49**(2): 263-271.

Inukai, N., M. Uchida, Y. Miyazaki, T. Suzuki, H. Yoshikawa, K. Tanaka, H. Morita and T. Takizawa (2010). "Nitric oxide production and its contribution to hepatocyte proliferation in normal juvenile rats." J Vet Med Sci **72**(7): 861-867.

Mohan, V., R. A. Sinha, A. Pathak, L. Rastogi, P. Kumar, A. Pal and M. M. Godbole (2012). "Maternal thyroid hormone deficiency affects the fetal neocortico genesis by reducing the proliferating pool, rate of neurogenesis and indirect neurogenesis." Exp Neurol **237**(2): 477-488.

Nakamura, T., P. Cieplak, D. H. Cho, A. Godzik and S. A. Lipton (2010). "S-nitrosylation of Drp1 links excessive mitochondrial fission to neuronal injury in neurodegeneration." Mitochondrion **10**(5): 573-578.

Snyder, C. M., E. H. Shroff, J. Liu and N. S. Chandel (2009). "Nitric oxide induces cell death by regulating anti-apoptotic BCL-2 family members." PLoS One **4**(9): e7059.

Ahmed, O. M., S. M. Abd El-Tawab and R. G. Ahmed (2010). "Effects of experimentally induced maternal hypothyroidism and hyperthyroidism on the development of rat offspring: I. The development of the thyroid hormones-neurotransmitters and adenosinergic system interactions." Int J Dev Neurosci **28**(6): 437-454.

Aliev, G., M. Priyadarshini, V. P. Reddy, N. H. Grieg, Y. Kaminsky, R. Cacabelos, G. M. Ashraf, N. R. Jabir, M. A. Kamal, V. N. Nikolenko, A. A. Zamyatnin, Jr., V. V. Benberin and S. O. Bachurin (2014).

"Oxidative stress mediated mitochondrial and vascular lesions as markers in the pathogenesis of Alzheimer disease." Curr Med Chem **21**(19): 2208-2217.

Almeida, A., T. E. Bates and J. B. Clark (1994). "Development of mitochondrial respiratory-chain complexes in neonatal rat brain." Biochem Soc Trans **22**(4): 409s.

Alva-Sanchez, C., R. Ortiz-Butron, M. Cuellar-Garcia, A. Hernandez-Garcia and J. Pacheco-Rosado (2002). "Anatomical changes in CA3 hippocampal region by hypothyroidism in rats." Proc West Pharmacol Soc **45**: 125-126.

Alva-Sanchez, C., J. Pacheco-Rosado, T. Fregoso-Aguilar and I. Villanueva (2012). "The long-term regulation of food intake and body weight depends on the availability of thyroid hormones in the brain." Neuro Endocrinol Lett **33**(7): 703-708.

Amara, I. B., H. Bouaziz, F. Guerhazi and N. Zeghal (2010). "Effect of selenium on hypothyroidism induced by methimazole (MMI) in lactating rats and their pups." Acta Biol Hung **61**(2): 145-157.

Ashabi, G., M. Ramin, P. Azizi, Z. Taslimi, S. Z. Alamdary, A. Haghparast, N. Ansari, F. Motamedi and F. Khodagholi (2012). "ERK and p38 inhibitors attenuate memory deficits and increase CREB phosphorylation and PGC-1 α levels in Abeta-injected rats." Behav Brain Res **232**(1): 165-173.

Bardo, M. T., R. L. Donohew and N. G. Harrington (1996). "Psychobiology of novelty seeking and drug seeking behavior." Behav Brain Res **77**(1-2): 23-43.

Barouch, L. A., R. W. Harrison, M. W. Skaf, G. O. Rosas, T. P. Cappola, Z. A. Kobeissi, I. A. Hobai, C. A. Lemmon, A. L. Burnett, B. O'Rourke, E. R. Rodriguez, P. L. Huang, J. A. Lima, D. E. Berkowitz and J. M. Hare (2002). "Nitric oxide regulates the heart by spatial confinement of nitric oxide synthase isoforms." Nature **416**(6878): 337-339.

Barsoum, M. J., H. Yuan, A. A. Gerencser, G. Liot, Y. Kushnareva, S. Graber, I. Kovacs, W. D. Lee, J. Waggoner, J. Cui, A. D. White, B. Bossy, J. C. Martinou, R. J. Youle, S. A. Lipton, M. H. Ellisman, G. A.

Perkins and E. Bossy-Wetzel (2006). "Nitric oxide-induced mitochondrial fission is regulated by dynamin-related GTPases in neurons." *Embo j* **25**(16): 3900-3911.

Basu, S., S. Rajakaruna, B. C. Dickinson, C. J. Chang and A. S. Menko (2014). "Endogenous hydrogen peroxide production in the epithelium of the developing embryonic lens." *Mol Vis* **20**: 458-467.

Bhanja, S. and S. Jena (2013). "Modulation of antioxidant enzyme expression by PTU-induced hypothyroidism in cerebral cortex of postnatal rat brain." *Neurochem Res* **38**(1): 42-49.

Bodiga, S., S. K. Gruenloh, Y. Gao, V. L. Manthathi, N. Dubasi, J. R. Falck, M. Medhora and E. R. Jacobs (2010). "20-HETE-induced nitric oxide production in pulmonary artery endothelial cells is mediated by NADPH oxidase, H₂O₂, and PI3-kinase/Akt." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **298**(4): L564-574.

Boscolo, A., D. Milanovic, J. A. Starr, V. Sanchez, A. Oklopcic, L. Moy, C. C. Ori, A. Erisir and V. Jevtovic-Todorovic (2013). "Early exposure to general anesthesia disturbs mitochondrial fission and fusion in the developing rat brain." *Anesthesiology* **118**(5): 1086-1097.

Carreras, M. C., D. P. Converso, A. S. Lorenti, M. Barbich, D. M. Levisman, A. Jaitovich, V. G. Antico Arciuch, S. Galli and J. J. Poderoso (2004). "Mitochondrial nitric oxide synthase drives redox signals for proliferation and quiescence in rat liver development." *Hepatology* **40**(1): 157-166.

Carreras, M. C., J. G. Peralta, D. P. Converso, P. V. Finocchietto, I. Rebagliati, A. A. Zaninovich and J. J. Poderoso (2001). "Modulation of liver mitochondrial NOS is implicated in thyroid-dependent regulation of O₂ uptake." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **281**(6): H2282-2288.

Carrillo-Sepulveda, M. A., G. S. Ceravolo, Z. B. Fortes, M. H. Carvalho, R. C. Tostes, F. R. Laurindo, R. C. Webb and M. L. Barreto-Chaves (2010). "Thyroid hormone stimulates NO production via activation of the PI3K/Akt pathway in vascular myocytes." *Cardiovasc Res* **85**(3): 560-570.

Cattani, D., P. B. Goulart, V. L. Cavalli, E. Winkelmann-Duarte, A. Q. Dos Santos, P. Pierozan, D. F. de Souza, V. M. Woehl, M. C. Fernandes, F. R. Silva, C. A. Goncalves, R. Pessoa-Pureur and A. Zamoner

(2013). "Congenital hypothyroidism alters the oxidative status, enzyme activities and morphological parameters in the hippocampus of developing rats." Mol Cell Endocrinol **375**(1-2): 14-26.

Costa-Mattioli, M., D. Gobert, E. Stern, K. Gamache, R. Colina, C. Cuello, W. Sossin, R. Kaufman, J. Pelletier, K. Rosenblum, K. Krnjevic, J. C. Lacaille, K. Nader and N. Sonenberg (2007). "eIF2alpha phosphorylation bidirectionally regulates the switch from short- to long-term synaptic plasticity and memory." Cell **129**(1): 195-206.

Coyoy, A., M. Olguin-Albuerne, P. Martinez-Briseno and J. Moran (2013). "Role of reactive oxygen species and NADPH-oxidase in the development of rat cerebellum." Neurochem Int **62**(7): 998-1011.

Cuesta, A., L. Pedrola, T. Sevilla, J. Garcia-Planells, M. J. Chumillas, F. Mayordomo, E. LeGuern, I. Marin, J. J. Vilchez and F. Palau (2002). "The gene encoding ganglioside-induced differentiation-associated protein 1 is mutated in axonal Charcot-Marie-Tooth type 4A disease." Nat Genet **30**(1): 22-25.

Cui, Z., H. Wang, Y. Tan, K. A. Zaia, S. Zhang and J. Z. Tsien (2004). "Inducible and reversible NR1 knockout reveals crucial role of the NMDA receptor in preserving remote memories in the brain." Neuron **41**(5): 781-793.

Darbra, S., F. Balada, A. Garau, P. Gatell, J. Sala and M. A. Marti-Carbonell (1995). "Perinatal alterations of thyroid hormones and behaviour in adult rats." Behav Brain Res **68**(2): 159-164.

De Roo, M., P. Klauser, P. M. Garcia, L. Poglia and D. Muller (2008). "Spine dynamics and synapse remodeling during LTP and memory processes." Prog Brain Res **169**: 199-207.

DeGracia, D. J., R. Kumar, C. R. Owen, G. S. Krause and B. C. White (2002). "Molecular pathways of protein synthesis inhibition during brain reperfusion: implications for neuronal survival or death." J Cereb Blood Flow Metab **22**(2): 127-141.

Deng, H., M. W. Dodson, H. Huang and M. Guo (2008). "The Parkinson's disease genes pink1 and parkin promote mitochondrial fission and/or inhibit fusion in *Drosophila*." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(38): 14503-14508.

Feng, Z., X. Zou, H. Jia, X. Li, Z. Zhu, X. Liu, P. Bucheli, O. Ballevre, Y. Hou, W. Zhang, J. Wang, Y. Chen and J. Liu (2012). "Maternal docosahexaenoic acid feeding protects against impairment of learning and memory and oxidative stress in prenatally stressed rats: possible role of neuronal mitochondria metabolism." Antioxid Redox Signal **16**(3): 275-289.

Fernandez-Vizarra, E., J. A. Enriquez, A. Perez-Martos, J. Montoya and P. Fernandez-Silva (2011). "Tissue-specific differences in mitochondrial activity and biogenesis." Mitochondrion **11**(1): 207-213.

Finocchietto, P. V., S. Holod, F. Barreyro, J. G. Peralta, Y. Alippe, A. Giovambattista, M. C. Carreras and J. J. Poderoso (2011). "Defective leptin-AMP-dependent kinase pathway induces nitric oxide release and contributes to mitochondrial dysfunction and obesity in ob/ob mice." Antioxid Redox Signal **15**(9): 2395-2406.

Gerges, N. Z. and K. A. Alkadhi (2004). "Hypothyroidism impairs late LTP in CA1 region but not in dentate gyrus of the intact rat hippocampus: MAPK involvement." Hippocampus **14**(1): 40-45.

Gerges, N. Z., K. H. Alzoubi, C. R. Park, D. M. Diamond and K. A. Alkadhi (2004). "Adverse effect of the combination of hypothyroidism and chronic psychosocial stress on hippocampus-dependent memory in rats." Behav Brain Res **155**(1): 77-84.

Ghafourifar, P. and E. Cadenas (2005). "Mitochondrial nitric oxide synthase." Trends Pharmacol Sci **26**(4): 190-195.

Gilbert, M. E. (2004). "Alterations in synaptic transmission and plasticity in area CA1 of adult hippocampus following developmental hypothyroidism." Brain Res Dev Brain Res **148**(1): 11-18.

Grewal, S. S., R. D. York and P. J. Stork (1999). "Extracellular-signal-regulated kinase signalling in neurons." Curr Opin Neurobiol **9**(5): 544-553.

Gui, J., Y. Song, N. L. Han and F. S. Sheu (2007). "Characterization of transcriptional regulation of neurogranin by nitric oxide and the role of neurogranin in SNP-induced cell death: implication of neurogranin in an increased neuronal susceptibility to oxidative stress." Int J Biol Sci **3**(4): 212-224.

Guillery, O., F. Malka, P. Frachon, D. Milea, M. Rojo and A. Lombes (2008). "Modulation of mitochondrial morphology by bioenergetics defects in primary human fibroblasts." Neuromuscul Disord **18**(4): 319-330.

Hall, E. D., J. A. Wang and D. M. Miller (2012). "Relationship of nitric oxide synthase induction to peroxynitrite-mediated oxidative damage during the first week after experimental traumatic brain injury." Exp Neurol **238**(2): 176-182.

Hoch, F. L. (1988). "Lipids and thyroid hormones." Prog Lipid Res **27**(3): 199-270.

Hood, A., Y. P. Liu, V. H. Gattone, 2nd and C. D. Klaassen (1999). "Sensitivity of thyroid gland growth to thyroid stimulating hormone (TSH) in rats treated with antithyroid drugs." Toxicol Sci **49**(2): 263-271.

Hsu, M., B. Srinivas, J. Kumar, R. Subramanian and J. Andersen (2005). "Glutathione depletion resulting in selective mitochondrial complex I inhibition in dopaminergic cells is via an NO-mediated pathway not involving peroxynitrite: implications for Parkinson's disease." J Neurochem **92**(5): 1091-1103.

Jahani-Asl, A., E. C. Cheung, M. Neuspiel, J. G. MacLaurin, A. Fortin, D. S. Park, H. M. McBride and R. S. Slack (2007). "Mitofusin 2 protects cerebellar granule neurons against injury-induced cell death." J Biol Chem **282**(33): 23788-23798.

Jena, S. and S. Bhanja (2014). "Hypothyroidism alters antioxidant defence system in rat brainstem during postnatal development and adulthood." Neurol Sci **35**(8): 1269-1274.

Kallen, B. and B. Norstedt Wikner (2014). "Maternal hypothyroidism in early pregnancy and infant structural congenital malformations." J Thyroid Res **2014**: 160780.

Kim, W. R. and W. Sun (2011). "Programmed cell death during postnatal development of the rodent nervous system." Dev Growth Differ **53**(2): 225-235.

Koibuchi, N. (2008). "The role of thyroid hormone on cerebellar development." Cerebellum **7**(4): 530-533.

Kuznetsov, A. V., M. Hermann, V. Saks, P. Hengster and R. Margreiter (2009). "The cell-type specificity of mitochondrial dynamics." Int J Biochem Cell Biol **41**(10): 1928-1939.

Lacza, Z., J. A. Snipes, J. Zhang, E. M. Horvath, J. P. Figueroa, C. Szabo and D. W. Busija (2003). "Mitochondrial nitric oxide synthase is not eNOS, nNOS or iNOS." Free Radic Biol Med **35**(10): 1217-1228.

Markova, N., A. Chernopiatko, C. A. Schroeter, D. Malin, A. Kubatiev, S. Bachurin, J. Costa-Nunes, H. M. Steinbusch and T. Strelakova (2013). "Hippocampal gene expression of deiodinases 2 and 3 and effects of 3,5-diiodo-L-thyronine T2 in mouse depression paradigms." Biomed Res Int **2013**: 565218.

Mathies, A. K., A. E. Mattson and K. A. Scheidt (2009). "Intermolecular Cross-Acyloin Reactions by Fluoride-Promoted Additions of O-Silyl Thiazolium Carbinols." Synlett **2009**(3): 377-383.

Meyer, O. A., H. A. Tilson, W. C. Byrd and M. T. Riley (1979). "A method for the routine assessment of fore- and hindlimb grip strength of rats and mice." Neurobehav Toxicol **1**(3): 233-236.

Referencias |

Mogha, A., S. R. Guariglia, P. R. Debata, G. Y. Wen and P. Banerjee (2012). "Serotonin 1A receptor-mediated signaling through ERK and PKC α is essential for normal synaptogenesis in neonatal mouse hippocampus." Transl Psychiatry **2**: e66.

Moro, L., E. Marra, F. Capuano and M. Greco (2004). "Thyroid hormone treatment of hypothyroid rats restores the regenerative capacity and the mitochondrial membrane permeability properties of the liver after partial hepatectomy." Endocrinology **145**(11): 5121-5128.

Mortimer, R. H., G. R. Cannell, R. S. Addison, L. P. Johnson, M. S. Roberts and I. Bernus (1997). "Methimazole and propylthiouracil equally cross the perfused human term placental lobule." J Clin Endocrinol Metab **82**(9): 3099-3102.

Nakamura, N., Y. Miyake, M. Matsushita, S. Tanaka, H. Inoue and H. Kanazawa (2002). "KIF1B β 2, capable of interacting with CHP, is localized to synaptic vesicles." J Biochem **132**(3): 483-491.

Olivares, E. L., C. Silva-Almeida, F. M. Pestana, R. Sonoda-Cortes, I. G. Araujo, N. C. Rodrigues, A. S. Mecawi, W. S. Cortes, M. P. Marassi, L. C. Reis and F. F. Rocha (2012). "Social stress-induced hypothyroidism is attenuated by antidepressant treatment in rats." Neuropharmacology **62**(1): 446-456.

Ortiz Mdel, C., S. Lores-Arnaiz, M. F. Albertoni Borghese, S. Balonga, A. Lavagna, A. L. Filipuzzi, D. Cicerchia, M. Majowicz and J. Bustamante (2013). "Mitochondrial dysfunction in brain cortex mitochondria of STZ-diabetic rats: effect of L-Arginine." Neurochem Res **38**(12): 2570-2580.

Pineda-Reynoso, M., E. Cano-Europa, V. Blas-Valdivia, A. Hernandez-García, M. Franco-Colin and R. Ortiz-Butron (2010). "Hypothyroidism during neonatal and perinatal period induced by thyroidectomy of the mother causes depressive-like behavior in prepubertal rats." Neuropsychiatr Dis Treat **6**: 137-143.

Ping, J. and G. E. Schafer (2010). "The NO-cGMP-PKG signaling pathway coordinately regulates ERK and ERK-driven gene expression at pre- and postsynaptic sites following LTP-inducing stimulation of thalamo-amygdala synapses." Neural Plast **2010**: 540940.

Platel, A. and R. D. Porsolt (1982). "Habituation of exploratory activity in mice: a screening test for memory enhancing drugs." Psychopharmacology (Berl) **78**(4): 346-352.

Poderoso, J. J., M. C. Carreras, C. Lisdero, N. Riobo, F. Schopfer and A. Boveris (1996). "Nitric oxide inhibits electron transfer and increases superoxide radical production in rat heart mitochondria and submitochondrial particles." Arch Biochem Biophys **328**(1): 85-92.

Poole, A. C., R. E. Thomas, L. A. Andrews, H. M. McBride, A. J. Whitworth and L. J. Pallanck (2008). "The PINK1/Parkin pathway regulates mitochondrial morphology." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(5): 1638-1643.

Ramin, M., P. Azizi, F. Motamedi, A. Haghighparast and F. Khodaghali (2011). "Inhibition of JNK phosphorylation reverses memory deficit induced by beta-amyloid (1-42) associated with decrease of apoptotic factors." Behav Brain Res **217**(2): 424-431.

Rastogi, M. V. and S. H. LaFranchi (2010). "Congenital hypothyroidism." Orphanet J Rare Dis **5**: 17.

Royo, N. C., V. Conte, K. E. Saatman, S. Shimizu, C. M. Belfield, K. M. Soltesz, J. E. Davis, S. T. Fujimoto and T. K. McIntosh (2006). "Hippocampal vulnerability following traumatic brain injury: a potential role for neurotrophin-4/5 in pyramidal cell neuroprotection." Eur J Neurosci **23**(5): 1089-1102.

Seo, J., J. Hong, S. J. Lee and S. Y. Choi (2012). "c-Jun N-terminal phosphorylation is essential for hippocampal synaptic plasticity." Neurosci Lett **531**(1): 14-19.

Referencias |

Shah, S. A., H. Y. Lee, R. A. Bressan, D. J. Yun and M. O. Kim (2014). "Novel osmotin attenuates glutamate-induced synaptic dysfunction and neurodegeneration via the JNK/PI3K/Akt pathway in postnatal rat brain." Cell Death Dis **5**: e1026.

Sheehan, T. E., P. A. Kumar and D. A. Hood (2004). "Tissue-specific regulation of cytochrome c oxidase subunit expression by thyroid hormone." Am J Physiol Endocrinol Metab **286**(6): E968-974.

Shimohama, S., S. Fujimoto, Y. Sumida and H. Tanino (1998). "Differential expression of rat brain bcl-2 family proteins in development and aging." Biochem Biophys Res Commun **252**(1): 92-96.

Sinha, R. A., P. Khare, A. Rai, S. K. Maurya, A. Pathak, V. Mohan, G. K. Nagar, M. K. Mudiam, M. M. Godbole and S. Bandyopadhyay (2009). "Anti-apoptotic role of omega-3-fatty acids in developing brain: perinatal hypothyroid rat cerebellum as apoptotic model." Int J Dev Neurosci **27**(4): 377-383.

Soane, L., Z. T. Siegel, R. A. Schuh and G. Fiskum (2008). "Postnatal developmental regulation of Bcl-2 family proteins in brain mitochondria." J Neurosci Res **86**(6): 1267-1276.

Streetman, D. D. and U. Khanderia (2003). "Diagnosis and treatment of Graves disease." Ann Pharmacother **37**(7-8): 1100-1109.

Su, Y. C., H. W. Chiu, J. C. Hung and J. R. Hong (2014). "Beta-nodavirus B2 protein induces hydrogen peroxide production, leading to Drp1-recruited mitochondrial fragmentation and cell death via mitochondrial targeting." Apoptosis **19**(10): 1457-1470.

Sweatt, J. D. (2001). "The neuronal MAP kinase cascade: a biochemical signal integration system subserving synaptic plasticity and memory." J Neurochem **76**(1): 1-10.

Takeuchi, A., B. Kim and S. Matsuoka (2015). "The destiny of Ca²⁺ released by mitochondria." J Physiol Sci **65**(1): 11-24.

Tang, Y. P., E. Shimizu, G. R. Dube, C. Rampon, G. A. Kerchner, M. Zhuo, G. Liu and J. Z. Tsien (1999). "Genetic enhancement of learning and memory in mice." Nature **401**(6748): 63-69.

Urao, N. and M. Ushio-Fukai (2013). "Redox regulation of stem/progenitor cells and bone marrow niche." Free Radic Biol Med **54**: 26-39.

Valcarce, C., J. Vitorica, J. Satrustegui and J. M. Cuezva (1990). "Rapid postnatal developmental changes in the passive proton permeability of the inner membrane in rat liver mitochondria." J Biochem **108**(4): 642-645.

Vasudevan, N., M. Morgan, D. Pfaff and S. Ogawa (2013). "Distinct behavioral phenotypes in male mice lacking the thyroid hormone receptor alpha1 or beta isoforms." Horm Behav **63**(5): 742-751.

Vianna, M. R., M. Alonso, H. Viola, J. Quevedo, F. de Paris, M. Furman, M. L. de Stein, J. H. Medina and I. Izquierdo (2000). "Role of hippocampal signaling pathways in long-term memory formation of a nonassociative learning task in the rat." Learn Mem **7**(5): 333-340.

Villeneuve, L. M., K. L. Stauch and H. S. Fox (2014). "Proteomic analysis of the mitochondria from embryonic and postnatal rat brains reveals response to developmental changes in energy demands." J Proteomics **109**: 228-239.

Watanabe, T., M. Saotome, M. Nobuhara, A. Sakamoto, T. Urushida, H. Katoh, H. Satoh, M. Funaki and H. Hayashi (2014). "Roles of mitochondrial fragmentation and reactive oxygen species in mitochondrial dysfunction and myocardial insulin resistance." Exp Cell Res **323**(2): 314-325.

Waterham, H. R., J. Koster, C. W. van Roermund, P. A. Mooyer, R. J. Wanders and J. V. Leonard (2007). "A lethal defect of mitochondrial and peroxisomal fission." N Engl J Med **356**(17): 1736-1741.

Welker, W. I. (1959). "Escape, exploratory, and food-seeking responses of rats in a novel situation." J Comp Physiol Psychol **52**(1): 106-111.

Xia, Z., M. Dickens, J. Raingeaud, R. J. Davis and M. E. Greenberg (1995). "Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis." Science **270**(5240): 1326-1331.

Xing, W., K. E. Govoni, L. R. Donahue, C. Kesavan, J. Wergedal, C. Long, J. H. Bassett, A. Gogakos, A. Wojcicka, G. R. Williams and S. Mohan (2012). "Genetic evidence that thyroid hormone is indispensable for prepubertal insulin-like growth factor-I expression and bone acquisition in mice." J Bone Miner Res **27**(5): 1067-1079.

Yang, J. L., L. Weissman, V. A. Bohr and M. P. Mattson (2008). "Mitochondrial DNA damage and repair in neurodegenerative disorders." DNA Repair (Amst) **7**(7): 1110-1120.

Zhang-James, Y., F. A. Middleton, T. Sagvolden and S. V. Faraone (2012). "Differential expression of SLC9A9 and interacting molecules in the hippocampus of rat models for attention deficit/hyperactivity disorder." Dev Neurosci **34**(2-3): 218-227.

Zhu, D. F., Z. X. Wang, D. R. Zhang, Z. L. Pan, S. He, X. P. Hu, X. C. Chen and J. N. Zhou (2006). "fMRI revealed neural substrate for reversible working memory dysfunction in subclinical hypothyroidism." Brain **129**(Pt 11): 2923-2930.

Zhuravliova, E., T. Barbakadze, N. Jojua, E. Zaalishvili, L. Shanshiashvili, N. Natsvlishvili, I. Kalandadze, N. Narmania, I. Chogovadze and D. Mikeladze (2012). "Synaptic and non-synaptic mitochondria in hippocampus of adult rats differ in their sensitivity to hypothyroidism." Cell Mol Neurobiol **32**(8): 1311-1321.

Zuchner, S., I. V. Mersiyanova, M. Muglia, N. Bissar-Tadmouri, J. Rochelle, E. L. Dadali, M. Zappia, E. Nelis, A. Patitucci, J. Senderek, Y. Parman, O. Evgrafov, P. D. Jonghe, Y. Takahashi, S. Tsuji, M. A. Pericak-Vance, A. Quattrone, E. Battaloglu, A. V. Polyakov, V. Timmerman, J. M. Schroder and J. M. Vance (2004). "Mutations in the mitochondrial GTPase mitofusin 2 cause Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A." Nat Genet **36**(5): 449-451.

