



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE PUEBLA**



FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

LICENCIATURA EN QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

ÁREA DE ANÁLISIS CLÍNICOS

LABORATORIO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO CLÍNICAS

TESIS DE LICENCIATURA:

**Efecto coadyuvante de las hormonas tiroideas sobre la
inducción de metalotioneínas por adrenalina en corazón
de ratas de la cepa Wistar**

**TESIS PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
Licenciatura en Químico Farmacobiólogo**

PRESENTA:

pQFB. Laura Lidia Hernández Munguía

DIRECTOR DE TESIS:

DC Eduardo Miguel Brambila Colombres

PUEBLA, PUE., JULIO DE 2015

ÍNDICE

| | |
|---|------|
| LISTA DE ABREVIATURAS..... | III |
| ÍNDICE DE FIGURAS..... | V |
| ÍNDICE DE TABLAS..... | VII |
| RESUMEN..... | VIII |
| 1. MARCO TEÓRICO..... | 1 |
| 1.1. RESPUESTA SISTÉMICA AL TRAUMA..... | 1 |
| 1.2. RESPUESTA NEUROENDÓCRINA AL TRAUMA..... | 2 |
| 1.3. HORMONAS TIROIDEAS..... | 3 |
| 1.3.1. Estructura de las hormonas tiroideas..... | 3 |
| 1.3.2. Síntesis, almacenamiento y liberación de las hormonas tiroideas..... | 4 |
| 1.3.3. Regulación de la liberación y síntesis de las hormonas tiroideas..... | 6 |
| 1.3.4. Mecanismo de acción de las hormonas tiroideas..... | 6 |
| 1.3.5. Acciones de las hormonas tiroideas..... | 7 |
| 1.3.6. Mecanismos celulares y moleculares del efecto de la hormona tiroidea sobre el corazón..... | 7 |
| 1.4. CATECOLAMINAS..... | 9 |
| 1.4.1. Estructura de las catecolaminas..... | 9 |
| 1.4.2. Biosíntesis y secreción de catecolaminas..... | 10 |
| 1.4.3. Regulación de la biosíntesis de catecolaminas..... | 10 |
| 1.4.4. Funciones y mecanismo de acción de las catecolaminas..... | 11 |
| 1.5. RESPUESTA INFLAMATORIA..... | 13 |
| 1.6. METALOTIONEÍNAS..... | 14 |
| 1.6.1. Estructura y contenido metálico..... | 15 |
| 1.6.2. Clasificación..... | 16 |
| 1.6.3. Localización..... | 17 |
| 1.6.4. Funciones..... | 17 |
| 1.6.5. Inducción..... | 19 |
| 2. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA..... | 23 |
| 3. JUSTIFICACIÓN..... | 24 |
| 4. OBJETIVOS..... | 25 |
| 4.1. Objetivo general..... | 25 |
| 4.2. Objetivos específicos..... | 25 |
| 5. HIPÓTESIS..... | 26 |
| 5.1. Hipótesis nula..... | 26 |
| 5.2. Hipótesis alternativa..... | 26 |
| 6. DIAGRAMA DE TRABAJO..... | 27 |
| 7. MATERIAL Y MÉTODOS..... | 30 |

| | | |
|-------|---|----|
| 7.1. | Animales de experimentación..... | 30 |
| 7.2. | Inducción de Metalotioneínas en corazón mediante una cirugía abdominal..... | 31 |
| 7.3. | Producción de un modelo hipotiroideo..... | 31 |
| 7.4. | Producción de un modelo hipertiroideo..... | 31 |
| 7.5. | Inhibición de la acción de adrenalina..... | 32 |
| 7.6. | Cuantificación de metalotioneínas por el método de saturación con 109Cd..... | 32 |
| 7.7. | Cuantificación de T4 y T3 total..... | 32 |
| 7.8. | Análisis de datos | 34 |
| 8. | RESULTADOS..... | 35 |
| 8.1. | Inducción de la síntesis de metalotioneínas en corazón mediante una cirugía abdominal..... | 35 |
| 8.2. | Producción de un modelo hipotiroideo..... | 37 |
| 8.3. | Producción de un modelo hipertiroideo..... | 41 |
| 8.4. | Confirmación del modelo..... | 45 |
| 8.5. | Comparación de las concentraciones de metalotioneínas de los modelos tiroideos en condiciones basales..... | 47 |
| 8.6. | Efecto de las hormonas tiroideas en la inducción de metalotioneínas en corazón mediante una cirugía abdominal experimental..... | 48 |
| 9. | DISCUSIÓN DE RESULTADOS..... | 52 |
| 10. | CONCLUSIONES..... | 61 |
| 11. | PERSPECTIVAS..... | 62 |
| 12. | BIBLIOGRAFÍA..... | 63 |
| 13. | APENDICES..... | 73 |
| 13.1. | ANEXO A. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES..... | 73 |
| 13.2. | ANEXO B. PROCEDIMIENTOS..... | 74 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| Abreviación | Significado |
|---------------------|---|
| ¹⁰⁹ Cd | Cadmio radioactivo |
| A | Adrenalina |
| AC | Adenilciclasa |
| Ag | Plata |
| AMPc | Adenosina monofosfato cíclico |
| ARNm | ARN mensajero |
| ATPasa | Adenosina trifosfato |
| Au | Oro |
| Bi | Bismuto |
| CA | Catecolaminas |
| Cd | Cadmio |
| COMT | Catecol-O-metil transferasa |
| CPM | Cadenas pesadas de miosina |
| Cu | Cobre |
| D | Dopamina |
| D1 | Desyodasa tipo I |
| D2 | Desyodasa tipo II |
| D3 | Desyodasa tipo III |
| DIT | Diyodotirosina |
| DOPA | Dihidroxifenilalanina |
| DOPA descarboxilasa | Descarboxilasa de L-Aminoácidos aromaticos |
| DβH | Dopamina-β-Hidroxilasa |
| EGF | Factor de crecimiento epidermico |
| EIA | Inmunoensayo |
| GPCR | Receptores acoplados a proteínas G |
| Hg | Mercurio |
| HPA | Eje hipotalámico-pituitario-adrenal |
| HT | Hormonas tiroideas |
| IGF-1 | Factor de crecimiento similar a insulina 1 |
| IL-1 | Interleucina-1 |
| IL-6 | Interleucina-6 |
| INF α | Interferon alfa |
| INF γ | Interferon gamma |
| Kv | Canal de potasio activado por voltaje |
| LIQC | Laboratorio de Investigaciones Químico Clínicas |
| LPS | Lipopolisacárido |
| MAO | Monoamino-oxidasa |
| MIT | Monoyodotirosina |
| mMT-1 | Metalotioenina de mamifero 1 |

| | |
|----------------|---|
| mMT-2 | Metalotioenina de mamifero 2 |
| mMT-3 | Metalotioenina de mamifero 3 |
| mMT-4 | Metalotioenina de mamifero 4 |
| mRNA | RNA mensajero |
| MT | Metalotioneína |
| MTs | Metalotioneínas |
| NA | Noradrenalina |
| NCX | Canal de sodio |
| Pb | Plomo |
| PLB | Fosfolambano |
| PNMT | Feniletanolamina-N-Metil-Tranferasa |
| RA- α 1 | Receptor adrenérgico alfa 1 |
| RA- α 2 | Receptor adrenérgico alfa 2 |
| RA- β | Receptor adrenérgico beta |
| RA- β 1 | Receptor adrenérgico beta 1 |
| RA- β 2 | Receptor adrenérgico beta 2 |
| RA- β 3 | Receptor adrenérgico beta 3 |
| RDA-1 | Receptor dopaminérgico 1 |
| RDA-2 | Receptor dopaminérgico 2 |
| RE | Respuesta de estrés |
| ROS | Especies reactivas de oxígeno |
| RT | Receptores nucleares de hormonas tiroideas |
| RT α | Receptor de hormona tiroidea alfa |
| RT β | Receptor de hormona tiroidea beta |
| SERCA2 | Calcio ATPasa del retículo sarco/endoplásmico |
| SI | Sistema inmune |
| SMA | Sistema simpático-médulo-adrenal |
| SNC | Sistema nervioso central |
| T ₃ | Triyodotironina |
| T ₄ | Tetrayodotironina |
| TBG | Globulina fijadora de tiroxina |
| TG | Tiroglobulina |
| TH | Tirosina-Hidroxilasa |
| TNF α | Factor de necrosis tumoral alfa |
| TPO | Tiropoxidasa |
| TRE | Elementos de respuesta a hormonas tiroideas |
| TRH | Hormona liberadora de tirotropina |
| TSH | Hormona estimulante de tiroides |
| Zn | Zinc |

ÍNDICE DE FIGURAS

| No. Figura | Título | Página |
|------------------|--|--------|
| Figura 1 | Activación del eje hipotalámico-pituitario-adrenal y el eje simpático-medulo-adrenal | 3 |
| Figura 2 | Estructura química y molecular de las principales hormonas tiroideas | 4 |
| Figura 3 | Síntesis, almacenamiento, secreción y transporte de las hormonas tiroideas | 5 |
| Figura 4 | Regulación de la síntesis y secreción de hormonas tiroideas ejercido por el eje hipotálamo-adenohipófisis-glándula tiroidea | 6 |
| Figura 5 | Efectos de T ₃ en el miocito cardiaco por mecanismo de acción genómica y no genómica | 8 |
| Figura 6 | Estructura molecular de las principales catecolaminas | 10 |
| Figura 7 | Regulación de la biosíntesis de adrenalina por la medula suprarrenal | 11 |
| Figura 8 | Mecanismo de acción de la adrenalina por medio de la activación del AMPc como segundo mensajero | 13 |
| Figura 9a | Estructura nativa globular de MT | 15 |
| Figura 9b | Estructura tridimensional de MT | 15 |
| Figura 10 | Esquema de la regulación del gen-MT hepático en respuesta a la inflamación e infección | 20 |
| Figura 11 | Curva de calibración para T ₃ total (A) y T ₄ total (B) sérica, realizada por el método de EIA de tipo competitivo | 34 |
| Figura 12 | Inducción de metalotioneína en corazón mediante una cirugía abdominal | 36 |
| Figura 13 | Producción de un modelo hipotiroideo (T ₄ total sérica). Tres semanas de tratamiento. | 38 |
| Figura 14 | Producción de un modelo hipotiroideo (T ₃ total sérica). Tres semanas de tratamiento. | 38 |
| Figura 15 | Producción de un modelo hipotiroideo (T ₄ total sérica). Seis semanas de tratamiento. | 39 |
| Figura 16 | Producción de un modelo hipotiroideo (T ₃ total sérica). Seis semanas de tratamiento | 39 |
| Figura 17 | Comparación de los dos periodos de administración para la producción de un modelo hipotiroideo. (T ₄ total sérica) | 40 |
| Figura 18 | Comparación de los dos periodos de administración para la producción de un modelo hipotiroideo. (T ₃ total sérica) | 40 |
| Figura 19 | Producción de un modelo hipertiroideo (T ₄ total sérica). Tres semanas de tratamiento. | 42 |
| Figura 20 | Producción de un modelo hipertiroideo (T ₃ total sérica). Tres semanas de tratamiento. | 42 |
| Figura 21 | Producción de un modelo hipertiroideo (T ₄ total sérica). Seis semanas de tratamiento. | 43 |
| Figura 22 | Producción de un modelo hipertiroideo (T ₃ total sérica). Seis semanas de tratamiento. | 43 |

| | | |
|------------------|---|----|
| Figura 23 | Comparación de los dos periodos de administración para la producción de un modelo hipertiroideo. (T ₄ total sérica) | 44 |
| Figura 24 | Comparación de los dos periodos de administración para la producción de un modelo hipertiroideo. (T ₃ total sérica) | 44 |
| Figura 25 | Comportamiento de la concentración sérica de T ₄ total después de una cirugía abdominal | 46 |
| Figura 26 | Comportamiento de la concentración sérica de T ₃ total después de una cirugía abdominal. | 46 |
| Figura 27 | Niveles basales de metalotioneínas cardiacas en corazón en los diferentes estados tiroideos. | 47 |
| Figura 28 | Inducción de MT en corazón a causa de un proceso inflamatorio inducido por una cirugía abdominal. | 48 |
| Figura 29 | Comportamiento de los niveles de MT cardiacas en un modelo hipotiroideo. | 49 |
| Figura 30 | Comportamiento de los niveles de MT cardiacas en un modelo hipertiroideo. | 50 |
| Figura 31 | Comportamiento de los niveles de MT cardiacas en un modelo hipertiroideo con un bloqueador de los receptores β-adrenérgicos. | 51 |
| Figura 32 | Propuesta de una representación esquemática de la vía de inducción de metalotioneínas cardiacas durante un proceso inflamatorio no infeccioso | 61 |

ÍNDICE DE TABLAS

| No. Tabla | Título | Página |
|----------------|--|--------|
| Tabla 1 | Respuesta sistémica al trauma | 1 |
| Tabla 2 | Cambios hormonales producidos durante una cirugía o factor estresante | 2 |
| Tabla 3 | Isoformas de los receptores de las hormonas tiroideas | 7 |
| Tabla 4 | Regulación de los genes que codifican proteínas cardiacas mediadas por la acción de las hormonas tiroideas | 9 |
| Tabla 5 | Etapas de la biosíntesis de catecolaminas | 10 |
| Tabla 6 | Características de los receptores adrenérgicos | 12 |
| Tabla 7 | Clasificación de las metalotioneínas en las diferentes familias de acuerdo a su rango taxonómico | 16 |
| Tabla 8 | Factores y condiciones que inducen la síntesis de metalotioneínas | 19 |
| Tabla 9 | Grupos de experimentación | 30 |

RESUMEN

En las etapas posteriores a un proceso quirúrgico, se desencadena una serie de reacciones fisiológicas conocidas como “Respuesta de estrés” (RE), que incluye cambios a nivel neuroendocrino, inflamatorio y metabólico. En este proceso se desarrolla una respuesta inmune-inflamatoria en el sitio de la lesión conocida como “Reacción de fase aguda” donde se produce una reprogramación en la expresión de genes y cambios en el metabolismo. Conjuntamente se presenta la activación del eje hipotalámico-pituitario-adrenal y el sistema simpático-médulo-adrenal, lo cual conduce a una desregulación hormonal a fin de liberar hormonas catabólicas y disminuir la secreción de las hormonas anabólicas. Dos hormonas cuya expresión se ve modificada por la RE y que están íntimamente relacionadas son catecolaminas y hormonas tiroideas, ya que estas últimas aumentan el número y afinidad de los receptores β -adrenérgicos en el corazón cuyo resultado final es el incremento de la sensibilidad de este órgano a las acciones de las catecolaminas, específicamente adrenalina. Tanto la respuesta neuroendocrina, así como la respuesta inmune-inflamatoria están involucradas en las vías para la síntesis de metalotioneína, la cual es considerada una proteína de fase aguda (PFA) ya que su expresión aumenta durante un proceso inflamatorio coincidiendo con el incremento de los inductores de la síntesis de PFA.

Este trabajo se enfocó en estudiar el efecto de las hormonas tiroideas como coadyuvantes de las catecolaminas en la producción de metalotioneínas en corazón después de un proceso inflamatorio no infeccioso inducido por una cirugía experimental. Los primeros resultados mostraron que existe una inducción de la síntesis de MT en corazón con un incremento máximo a las 9 horas y un segundo incremento a las 16 horas posteriores a la cirugía. Una segunda etapa del trabajo mostró una disminución de metalotioneínas cardíacas del 38% en modelos de hipotiroidismo comparados con un grupo en estado eutiroideo con cirugía, además de no presentarse diferencias con el grupo eutiroideo sin cirugía. Por su parte, los niveles de metalotioneína en un grupo hipertiroideo con cirugía no mostró diferencias comparado con el grupo eutiroideo con cirugía, sin embargo, existió una disminución del 36% en los niveles de metalotioneínas cuando se administró un bloqueador de los receptores β -adrenérgicos al grupo hipertiroideo con cirugía en comparación con el grupo eutiroideo igualmente con cirugía. Los resultados obtenidos demuestran la participación del corazón como órgano productor de metalotioneínas en un proceso inflamatorio. Por otra parte, los resultados del modelo hipotiroidico evidenciaron el papel de las hormonas tiroideas en la síntesis de metalotioneínas cardíacas y los datos obtenidos con los grupos hipertiroideos con y sin el bloqueador β -adrenérgico mostraron la participación de adrenalina conjuntamente con las hormonas tiroideas en la inducción de metalotioneínas en corazón.

1. MARCO TEÓRICO

1.1. RESPUESTA SISTÉMICA AL TRAUMA

Una de las grandes aportaciones de la cirugía del siglo XX, ha sido, sin duda, el entendimiento de la respuesta sistémica al trauma. Esta investigación comenzó a finales del siglo XVIII con los estudios de John Hunter, quien sugirió que la respuesta biológica a la lesión tiene una índole benéfica, postulando así que durante el trauma existe un proceso de especial importancia que no pertenece al daño, sino al intento de curar. En 1932 Cuthberson elaboró las bases de la respuesta metabólica a una agresión, involucrando los conceptos de “ebb” y “flow” para describir la disminución inicial y el incremento en el metabolismo posterior a la lesión. ^{1,2,3,4,5,6,7,8,9,10}

El efecto de trauma sobre el organismo es entre otros factores un estrés metabólico, mismo que desencadena una respuesta inicial, por medio de la cual se pretende conservar energía en los órganos vitales, modular el sistema inmunológico y retrasar el anabolismo, con el fin de limitar el daño en el tejido, destruir organismos infecciosos y activar la reparación de procesos. Entre los principales cambios se encuentran, los cambios neuroendocrinos, inflamatorios y metabólicos (tabla 1), modulados por el eje hipotalámico-pituitario-adrenal (HPA) y el sistema simpático-médulo-adrenal (SMA); que en conjunto se conocen como “Respuesta de estrés” (RE). Generalmente la magnitud de la RE es proporcional a la severidad del daño. ^{3,4,10,11}

| Tabla 1.- Respuesta sistémica al trauma. ^{11,12,13,14} |
|--|
| • Activación del sistema nervioso simpático |
| • Respuesta endocrina al trauma |
| ○ Secreción de hormonas pituitarias |
| ○ Resistencia a la insulina |
| • Cambios inmunológicos y hemáticos |
| ○ Producción de citocinas |
| ○ Reacción de fase aguda |
| ○ Leucocitosis con neutrofilia |
| ○ Proliferación linfocítica. |

1.2. RESPUESTA NUROENDOCRINA AL TRAUMA

Después de un trauma, el eje HPA y el sistema SMA (figura 1) son activados por impulsos nerviosos aferentes desde el área de la lesión o trauma, resultando en la desregulación de la secreción hormonal, liberando hormonas catabólicas y disminuyendo la secreción de hormonas anabólicas. En términos generales, la estimulación del hipotálamo incrementa la secreción de catecolaminas desde la medula adrenal, produciendo los efectos cardiovasculares que incluyen taquicardia, hipertensión y modificación funcional de ciertos órganos como hígado, páncreas y riñón. Dentro de las hormonas anabólicas disminuidas se encuentran las hormonas tiroideas, cuya concentración sérica es inversamente proporcional a la actividad simpática, mostrando una reducción en la producción de estas hormonas después de una cirugía y retornando a sus niveles normales en horas o días. Los cambios hormonales tienen como objetivo incrementar el catabolismo, lo cual moviliza sustratos para proveer fuentes de energía y un mecanismo para retener sales y agua a fin de mantener el volumen sanguíneo y la homeostasis cardiovascular (tabla 2).^{3,7,6,9,10,11,12,13,14, 15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25.}

^{11, 12, 13, 14, 16.}

| | Pituitaria | Adrenal | Pancreática | Otras |
|------------------------------------|---|--|--------------------|---|
| Incremento de la secreción | Hormona del crecimiento (GH) Hormona adrenocorticotrófica (ACTH) Prolactina Arginina-Vasopresina (AVP) | Catecolaminas Cortisol Aldosterona | Glucagón | Renina |
| Sin cambios en la secreción | Hormona estimulante de tiroides (TSH) Hormona luteinizante (LH) Hormona foliculo estimulante (FSH) | | | |
| Disminución de la secreción | | | Insulina | Testosterona Estrógeno Triyodotironina (T3) |

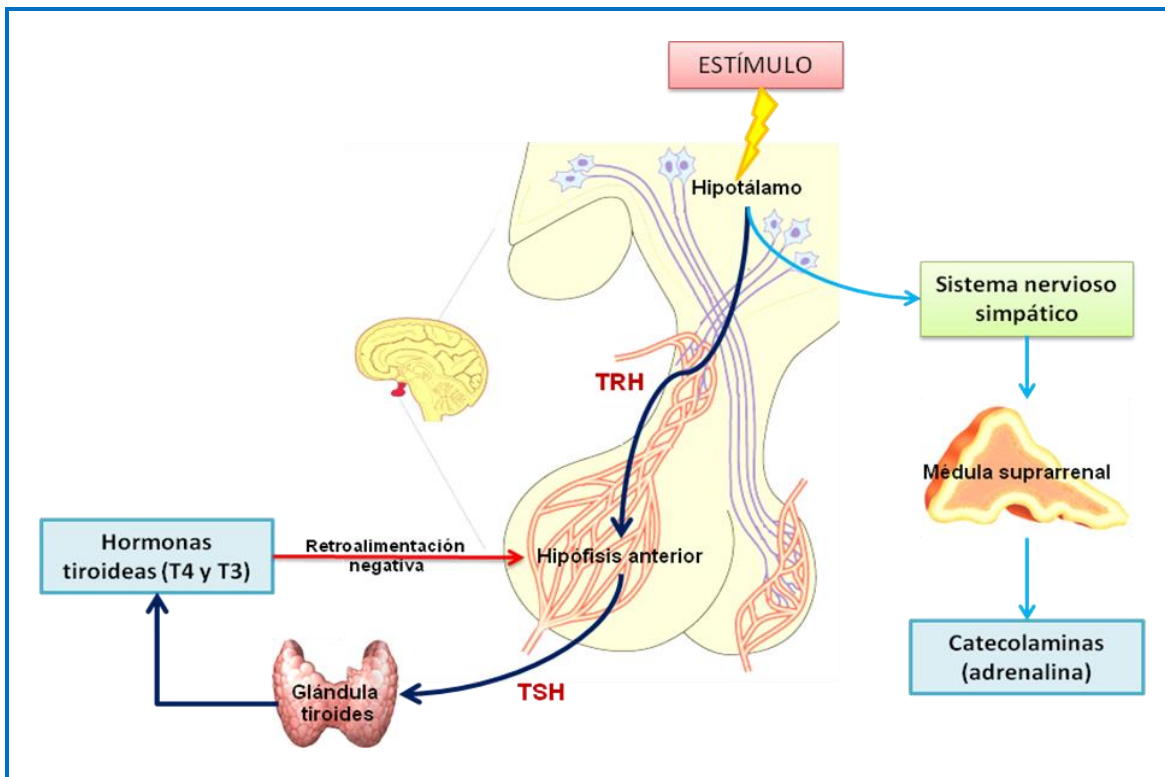


Figura 1.- Activación del eje hipotalámico-pituitario-adrenal y el eje simpático-medulo-adrenal.

1.3. HORMONAS TIROIDEAS

La glándula tiroides es un órgano situado en la región anterior del cuello, por encima de la tráquea y por debajo del cartílago cricoides. La unidad básica es el folículo tiroideo cuya pared contiene dos tipos de células: 1) células foliculares, las cuales producen coloide, formado principalmente de tiroglobulina (TG) y hormonas tiroideas (HT) y 2) células parafoliculares o células C, las cuales sintetizan calcitonina.^{26,27,28}

1.3.1. Estructura de las hormonas tiroideas

La estructura química de las HT deriva de la tirosina, la cual se encuentra formada de dos anillos fenólicos unidos por un enlace éter, con una sustitución parcial o completa con átomos de yodo en los carbonos 3, 5, 3' y 5'. (Figura 2)^{28,29}

| Nombre común | Símbolo | Sustituyentes | | | | Nombre sistemático |
|-------------------------|---------------------|----------------|-----------------|----------------|-----------------|--------------------------------|
| | | R ₃ | R _{3'} | R ₅ | R _{5'} | |
| Tiroxina | T ₄ | I | I | I | I | 3'3'5'5'-Tetra-yodo-L-tironina |
| Triyodotironina | T ₃ | I | I | I | H | 3'3'5'-Tri-yodo-L |
| Triyodotironina reversa | rT ₃ | I | I | H | I | 3'3'5'-Tri-yodo-L |
| 3' 5-Tironina | 3'5-T ₂ | I | H | I | H | 3'5-Di-yodo-L-tironina |
| 3' 3'-Tironina | 3'3'-T ₂ | I | I | H | H | 3'3'-Di-yodo-L-tironina |

Figura 2.- Estructura química y molecular de las principales hormonas tiroideas. En el cuadro inferior se muestra la nomenclatura empleada en relación a los sustituyentes presentes en las posiciones 3,5, 3', 5' de los anillos interno y externo respectivamente.³⁰

1.3.2. Síntesis, almacenamiento y liberación de las hormonas tiroideas

Los componentes básicos para la síntesis de HT son la tirosina y el yoduro, ambos deben ser tomados de la sangre por las células foliculares. La mayoría de los pasos para la síntesis de HT se llevan a cabo en las moléculas de tiroglobulina (TG) dentro del coloide.

La glándula tiroides captura yodo de la sangre y posteriormente es transferido hacia el coloide mediante la bomba de yoduros. Dentro de la célula folicular el yodo es oxidado a yoduro “activo” por la enzima de membrana tiroperoxidasa (TPO), ubicada en la membrana luminal. Dentro del coloide, la TPO unida a la membrana une rápidamente el yoduro a la tirosina dentro de la molécula de tiroglobulina. La unión de un yoduro a la tirosina da lugar a la monoyodotirosina (MIT), mientras que la unión de dos yoduros forma la diyodotirosina (DIT). Posteriormente ocurre un proceso de acoplamiento entre las moléculas de tirosina formadas para originar las HT, el acoplamiento de una MIT y un DIT da lugar a la triyodotironina o T₃ y el acoplamiento de dos DIT forma la tetrayodotironina o T₄. Estos productos permanecen unidos a la TG hasta que se separan y son secretadas. En el proceso de secreción las células foliculares fagocitan una porción del coloide que contiene el complejo TG-HT, los lisosomas

atacan la vesícula fagocitada cuyas enzimas digieren la molécula de TG y separan las HT biológicamente activas, T₃ y T₄, así como las yodotirosinas inactivas MIT y DIT, estas últimas, no tienen valor endocrino.

Por su parte, T₃ y T₄, son altamente lipofílicas por lo que pasan libremente a través de la membrana exterior de las células foliculares para llegar a la sangre donde se unen rápidamente con varias proteínas plasmáticas, principalmente, a la globulina fijadora de tiroxina (TBG) la cual se une selectivamente a las HT. Menos del 0.1% de T₄ y menos de 1% de T₃ permanecen en forma libre para poder unirse a los receptores de las células blanco y así ejercer sus efectos (figura 3).^{28, 29, 31,32, 33,34}

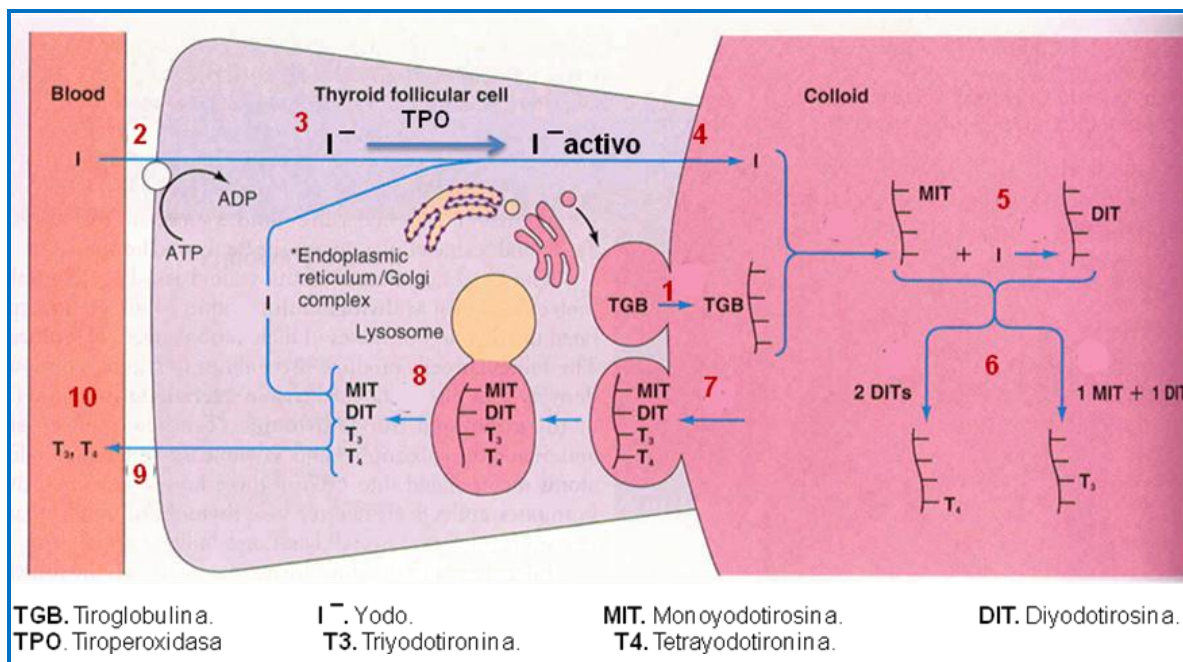


Figura 3.- Síntesis, almacenamiento, secreción y transporte de las hormonas tiroideas. 1) La tiroglobulina es transportada hacia el colide. 2) El yodo es llevado por transporte activo desde la sangre hacia el colide. 3) El yodo es oxidado a yoduro activo por la tiroperoxidasa. 4) El yoduro activo entra al colide. 5) TPO une el yodo a la tirosina para dar lugar a MIT y DIT. 6) Acoplamiento de MIT+DIT para originar T₃ y DIT+DIT forma T₄. 7) Fagocitosis de una parte del colide. 8) Los lisosomas atacan la vesícula degradando TG y liberando T₃, T₄, MIT y DIT. 9) T₃ y T₄ pasan libremente por la membrana al ser altamente lipofílicas. 10) En circulación T₃ y T₄ se unen a la globulina fijadora de tiroxina.

Tomado de Sherwood.L Fisiología humana. De las células a los sistemas. Capitulo 19: Glandulas endocrinas periféricas. 7a. Edicion. Editorial Cengage Learning. 2011

1.3.3. Regulación de la liberación y síntesis de las hormonas tiroideas

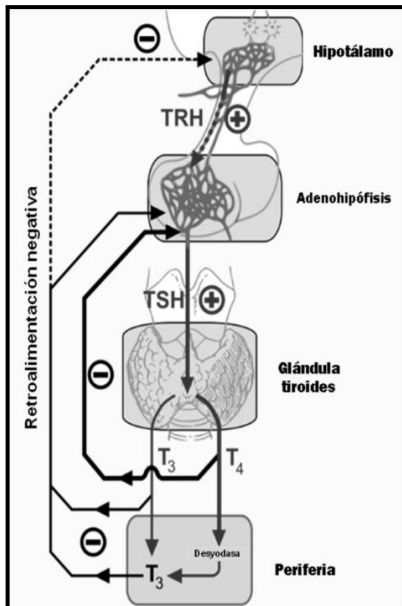


Figura 4.- Regulación de la síntesis y secreción de hormonas tiroideas ejercido por el eje hipotálamo-adenohipófisis-glándula tiroidea.

La regulación de la secreción de estas hormonas sigue la vía del eje hipotálamo-hipófisis-tiroides, e inicia con un mecanismo de retroalimentación negativa de la concentración de las HT sobre el hipotálamo, que secreta hormona liberadora de tirotrina (TRH) que al unirse a sus receptores en la adenohipófisis estimula la liberación de hormona estimulante de tiroides (TSH), la cual actúa directamente en las células foliculares de la tiroides, incrementando la liberación y producción de HT, manteniendo así regulada concentración sérica de T₃ y T₄ (Figura 4) ^{26, 28, 29, 32, 33, 35}

1.3.4. Mecanismo de acción de las hormonas tiroideas

Las HT presentan dos tipos de mecanismos de acción, genómico y no genómico: ^{26, 29, 30, 35, 36, 37}

- Genómico: incrementan o inhibe la expresión de determinados genes, muchos de ellos involucrados en las vías metabólicas, proceso de proliferación celular y apoptosis. Para poder ejercer sus acciones, T₃ (al ser la hormona biológicamente activa) debe unirse a los receptores nucleares de hormonas tiroideas (RT) que actúan como factores de transcripción específicos ya que se unen a elementos de respuesta a hormonas tiroideas (TRE), hasta la fecha se han descrito 4 isoformas de los receptores de las hormona tiroideas, los cuales se muestran en la tabla 3. ^{29, 35, 38, 39, 40, 41}
- Mecanismo no genómico: las HT también tiene efectos rápidos en el citosol y la membrana plasmática, son acciones extranucleares e independientes de los receptores. Entre ellas se encuentran regulación del transporte de Na⁺, K⁺,

Ca⁺² y glucosa, tráfico de proteínas intracelulares y regulación de algunas proteínas quinasas. Estos efectos aun no son dilucidados completamente, pero predominan en el sistema cardiovascular. ^{29, 35, 38, 39, 40, 41}

Tabla 3.- Isoformas de los receptores de las hormonas tiroideas. ²⁶

| Receptor | Localización | Función |
|---------------|---|--|
| TR α 1 | Cerebro, musculo, hueso, corazón y tejido adiposo | Une las hormonas tiroideas |
| TR α 2 | Ubicua | Puede bloquear la acción de otras isoformas |
| TR β 1 | Cerebro, cerebelo, hígado, corazón, tejido adiposo y riñón | Une hormonas tiroideas. |
| TR β 2 | Adenohipófisis e hipotálamo, cerebro en desarrollo y oído interno | Une hormonas tiroideas, control del eje tiroideo |

1.3.5. Acciones de las hormonas tiroideas

La acción principal de las HT (específicamente T₃) es la activación de un gran número de genes, este trabajo lo desempeña en casi todas las células del organismo debido a que inducen la síntesis de una gran variedad de enzimas, proteínas estructurales, transportadoras y otras sustancias. El resultado neto es un aumento generalizado de la actividad funcional del organismo. Debido a que cada órgano posee diferente expresión de receptores y sus isoformas, y que existen diferencias en la actividad de las desyodasas, cabe asumir que existen diferencias en las respuestas de los diferentes órganos. ⁴²

1.3.6. Mecanismos celulares y moleculares del efecto de la hormona tiroidea sobre el corazón

T₃ tiene acciones relevantes sobre el corazón y la circulación, generando múltiples cambios que incluyen alteraciones hemodinámicas y efectos mediados sobre el miocito cardíaco a través de la expresión génica. La T₃ libre sérica entra en las células mediante un proceso de difusión facilitada y pasa directamente al núcleo sin unirse a otra proteína dentro de la célula (Figura 5). La mayoría de las observaciones indican que los miocitos cardíacos no pueden metabolizar T₄ ni T₃ y, por lo tanto, todos los efectos nucleares y los cambios de expresión génica se

deben a los cambios en las concentraciones sanguíneas de T_3 . Una vez que alcanza el miocito, interacciona con RT, la unión de estos receptores con T_3 , en combinación con otros coactivadores, conduce a una activación transcripcional óptima. Los miocitos cardíacos expresan las isoformas alfa y beta del receptor de hormona tiroidea ($RT\alpha$ y $RT\beta$). Se ha propuesto, aunque sin pruebas directas que lo confirmen, que $RT\alpha$ 1 es la principal isoforma fijadora de T_3 en el corazón y que la isoforma específica podría determinar, a su vez, la expresión génica en el miocito. Las proteínas cardíacas cuya transcripción es regulada por la HT se enumeran en la Tabla 4. Entre ellas receptores de la superficie celular, lo cual proporciona un mecanismo molecular para explicar muchos de los efectos de las HT en el corazón. ^{38, 39, 40, 43,44}

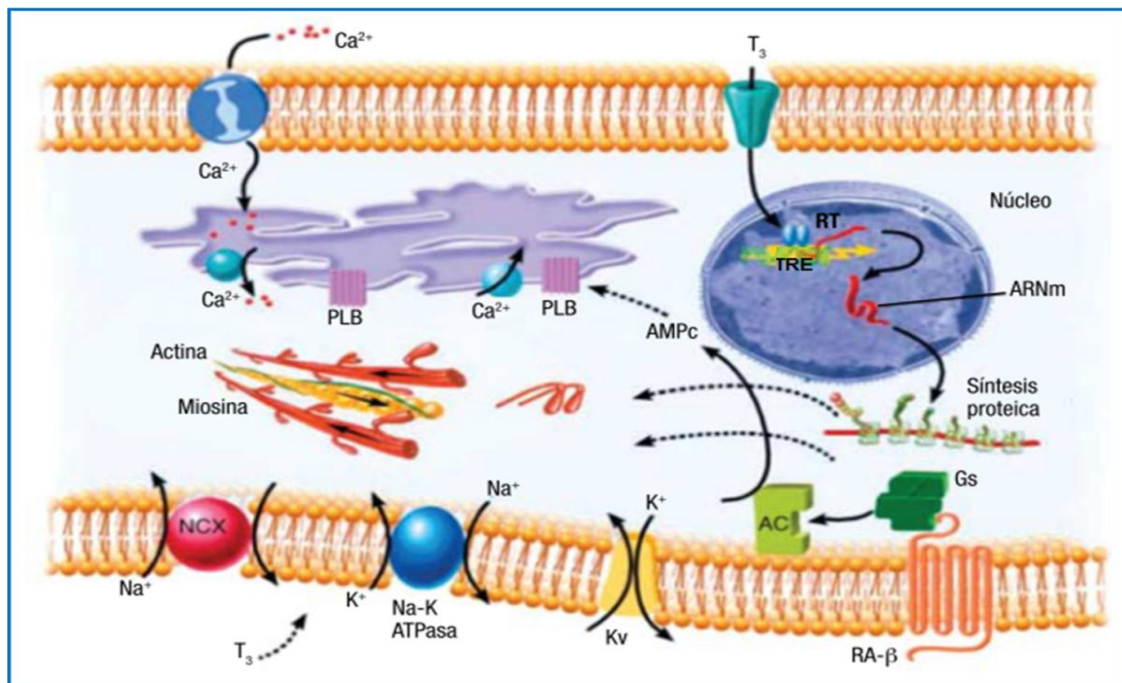


Figura 5.- Efectos de T_3 en el miocito cardíaco por mecanismo de acción genómica y no genómica. Los mecanismos de acción genómica involucra la unión de T_3 a sus RT regulando la transcripción de genes cardíacos específicos. Los mecanismos de acción no genómico incluyen la modulación directa de canales iónicos de membrana indicados con flechas discontinuas. T_3 : Triyodotironina; TR: Receptor de hormonas tiroideas; TRE: Elementos de respuesta de hormonas tiroideas; AC: adenilciclasa; AMPc: adenosina monofosfato cíclico; ARNm: ARN mensajero; ATPasa: adenosina trifosfato; Kv: canal de potasio activado por voltaje; NCX: canal de sodio; PLB: fosfolambano; RA- β : receptor adrenérgico beta. *Tomado de Mantilla D, Echin ML, Perel C. Hipertiroidismo y el sistema cardiovascular. Bases fisiológicas y su manifestación clínica. Insuficiencia cardíaca. 2010; 5 (4): 157-177*

Tabla 4.- Regulación de los genes que codifican proteínas cardiacas mediadas por la acción de las hormonas tiroideas.³⁸

| REGULACIÓN POSITIVA | REGULACIÓN NEGATIVA |
|---|--|
| Cadenas pesadas de miosina alfa | Cadenas pesadas de miosina beta |
| Ca ⁺² ATPasa del retículo sarcoplásmico | Fosfolamban |
| Na ⁺ , K ⁺ ATPasa | Intercambiador de Na ⁺ /Ca ⁺² |
| Canales de potasio activados por voltaje | Receptor de hormonas tiroideas alfa 1 |
| Péptido natriurético auricular y cerebral | Adenilciclase tipos V, VI |
| Enzima málica | Proteínas Gi con afinidad por el nucleótido guanina. |
| Receptor β-adrenérgico | |
| Proteínas Gs con afinidad por el nucleótido guanina | |
| Transportador de nucleótidos de adenina 1 | |

Hay una estrecha relación entre la actividad de las hormonas tiroideas y las catecolaminas. En términos generales las hormonas tiroideas incrementan la cantidad de los receptores β-adrenérgicos en el corazón cuyo resultado final es el incremento de la intensidad de las acciones de las catecolaminas en corazón.^{10, 14, 38, 39}

1.4. CATECOLAMINAS

Existen dos glándulas suprarrenales situadas en el espacio retroperitoneal, sobre el polo superior de cada riñón. Cada glándula está compuesta de dos órganos endocrinos, uno rodeando al otro: a) Corteza adrenal (capa externa): que secreta glucocorticoides, mineralocorticoides y andrógenos y b) Médula adrenal (porción interior): Secreta catecolaminas (CA).^{31, 45, 46}

1.4.1. Estructura de las catecolaminas

El termino catecolamina designa a todos aquellos compuestos cuya estructura molecular central es un grupo catecol (ortodihidroxibenceno) unido a una cadena lateral con un grupo amino (figura 6), La catecolaminas de importancia biológica son: 1) Adrenalina (A): Almacenada y sintetizada en la medula adrenal constituyendo mas del 80% del contenido y liberada a la circulación, 2) Noradrenalina (NA) y 3) Dopamina (D).^{25, 31, 45, 47, 48, 49}

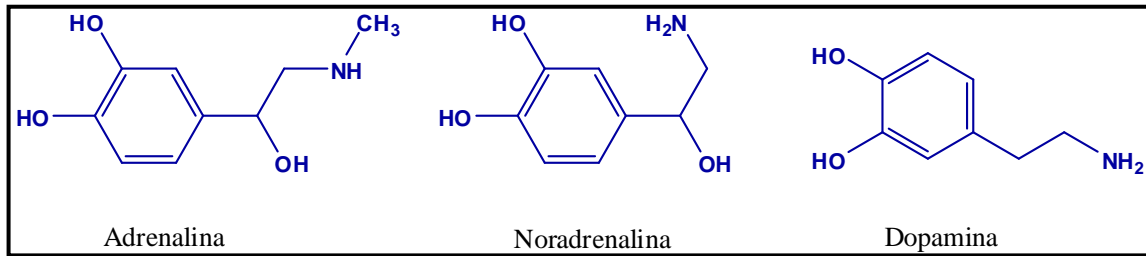


Figura 6.- Estructura molecular de las principales catecolaminas.

1.4.2. Biosíntesis y secreción de catecolaminas

Las CA, son sintetizadas a partir de un aminoácido precursor, L-tirosina la cual entra a las células cromafines a través de un transporte activo, una vez ahí, se llevan a cabo 4 reacciones químicas catalizadas por diferentes enzimas, las cuales se enlistan en la tabla 5, indicando la enzima y cofactores involucrados.^{31, 45, 46, 47, 50, 51, 52} La secreción de CA se produce mediante un proceso de exocitosis, cuyo estímulo de iniciación es un neurotransmisor (acetilcolina) liberado de las terminales nerviosas simpáticas preganglionares.^{31, 47, 52}

Tabla 5.- Etapas de la biosíntesis de catecolaminas.³¹

| Etapa | 1 | 2 | 3 | 4 |
|------------------|---|--|---|--|
| Reacción | Hidroxilación | Descarboxilación | Hidroxilación | Metilación |
| Enzima | Tirosina-Hidroxilasa (TH) | Descarboxilasa de L-Aminoácidos aromaticos (DOPA descarboxilasa) | Dopamina-β-Hidroxilasa (DβH) | Feniletanolamina-N-Metil-Tranferasa (PNMT) |
| Cofactor | O ₂ , Fe ⁺² , tetrahidropteridina | Piridoxal fosfato | O ₂ , Cu ⁺² , ascorbato | S-adenosil metionina |
| Molécula inicial | Tirosina | Dihidroxifenilalanina (DOPA) | Dopamina | Noradrenalina |
| Producto | Dihidroxifenilalanina (DOPA) | Dopamina | Noradrenalina | Adrenalina |
| Localización | Citosol | Citosol | Gránulos cromafines | Citosol |

1.4.3. Regulación de la biosíntesis de catecolaminas

La regulación de la biosíntesis de catecolaminas en la médula adrenal (figura 7), se puede llevar a cabo en diferentes partes de la ruta sintética. El punto de control más importante es a nivel de la tirosina-hidroxilasa (TH), la cual convierte tirosina en dihidroxifenilalanina, de esta manera, cuando existe aumento

de catecoles intracelulares, se presenta una hiporegulacion de la actividad de esta enzima, además, ciertas sustancias como los glucocorticoides y diferentes proteína-quinasas, regulan la transcripción de las enzimas involucradas en la ruta sintética de las CA. ^{46, 47, 52}

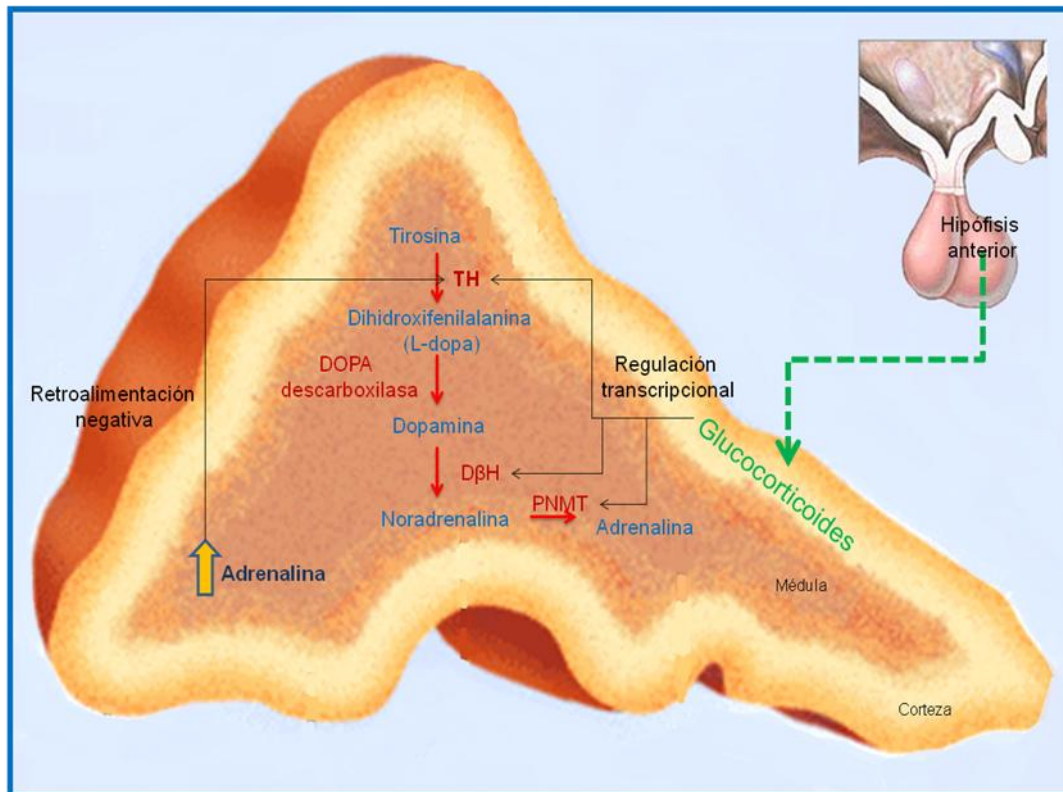


Figura 7.- Regulación de la biosíntesis de adrenalina por la médula suprarrenal.

1.4.4. Funciones y mecanismo de acción de las catecolaminas

Las acciones sistémicas de las CA son mediadas por su unión a receptores de membrana que se conocen con el nombre de receptores adrenérgicos. Este tipo de receptores forman parte de la familia de los receptores acoplados a proteínas G (GPCR) y ocasionan efectos diferentes dependiendo de los subtipos de proteínas G a las que están asociados y al mecanismo de transducción de señal vinculado, por lo cual, los efectos fisiológicos de las CA dependen del receptor específico al cual se unen (tabla 6). ^{31, 49, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59}

Existen 3 tipos de receptores adrenérgicos: α -adrenérgicos, β -adrenérgicos y dopaminérgicos, cada uno de ellos presentando diferentes subtipos (α_1 , α_2 , β_1 , β_2 , β_3 , DA_1 y DA_2), los cuales se encuentran ampliamente distribuidos por el organismo, mediando reacciones específicas (tabla 6).^{49, 53, 54, 55, 57, 60, 61}

Tabla 6.- Características de los receptores adrenérgicos.^{57, 60, 61}

| Receptor | Agonista | Proteína G | Efectos bioquímicos | Tejido | Reacciones |
|------------|----------|------------|---|--|--|
| α_1 | A = NA | G_q | Aumento de Fosfolipasa A_2 , C y D | Musculo liso vascular Músculo liso genitourinario Hígado Músculo liso intestinal, Corazón | Contracción Contracción Glucogenólisis, gluconeogénesis Hiperpolarización y relajación Aumento de la frecuencia cardiaca |
| α_2 | A = NA | $G_{i,o}$ | Disminuye adenilato ciclasa y aumenta canales de K^+ | Islotes pancreáticos (Células β) Plaquetas Terminaciones nerviosas Musculo liso vascular | Disminución de la secreción de insulina Agregación Disminución de la liberación de NA Contracción |
| β_1 | A = NA | G_s | Aumenta adenilato ciclasa y canales de Ca^{+2} tipo L | Corazón Células yuxtglomerulares | Aumento de la fuerza y ritmo de contracción y de la velocidad de conducción AV nodal Aumento de la secreción de renina |
| β_2 | A > NA | G_s | Aumenta adenilato ciclasa | Musculo liso (vascular, bronquial, gastrointestinal y genitourinario) Musculo estriado Hígado | Relajación Glucogenólisis y captación de K^+ Glucogenólisis y gluconeogénesis |
| β_3 | A < NA | G_s | Aumenta adenilato ciclasa | Tejido adiposo | Lipólisis. |

El mecanismo de acción de A uniéndose a su receptor sigue la vía de activación del AMPc como segundo mensajero. Cuando A se une a su receptor acoplado a la proteínas G_s , pasa de estado inactivo a activo, separándose la subunidad α y dirigiéndose a la adenilato ciclasa activándola, esta última, induce la conversión de ATP a AMPc, el cual actúa como segundo mensajero activando a la enzima proteína cinasa A, la cual es capaz de fosforilar proteínas celulares importantes en diferentes vías de señalización. La fosforilación provoca que la

proteína cambie de función y forma activándola, dando lugar así, una amplia gama de respuestas celulares (figura 8) ^{47, 49, 52, 56, 57}

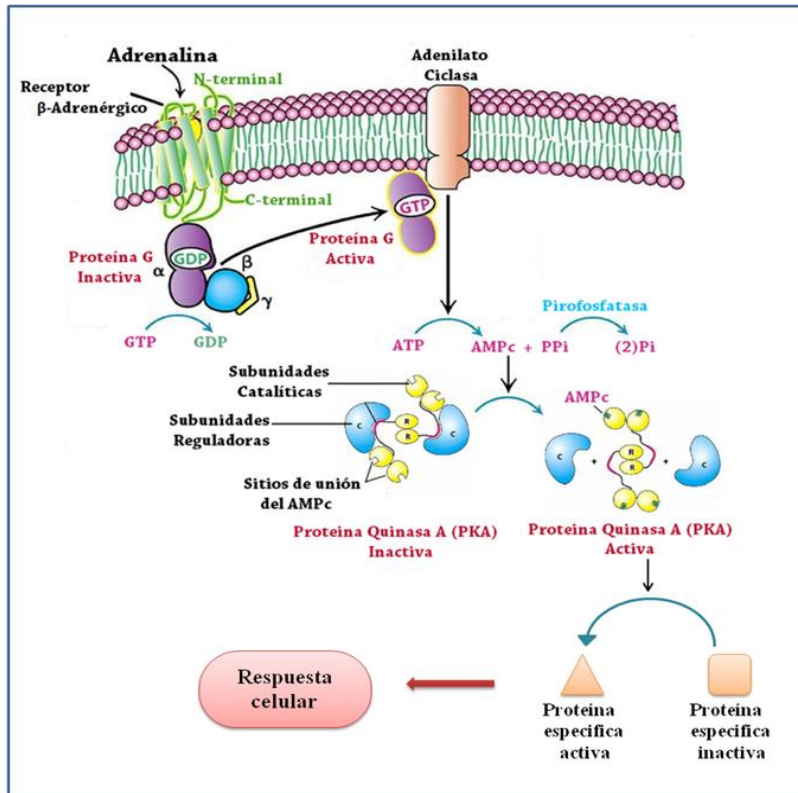


Figura 8.- Mecanismo de acción de la adrenalina por medio de la activación del AMPc como segundo mensajero.

1.5. RESPUESTA INFLAMATORIA

Además de la respuesta neuroendocrina, durante la RE se desarrolla un proceso de inflamación, que es la respuesta del sistema inmunológico de un organismo al daño causado a sus células y tejidos vascularizados por cualquier agresor. Esta respuesta tiene un carácter protector, que implica un enorme gasto de energía metabólica. La inflamación aguda tiene un inicio rápido y de corta duración que comprende reacciones localizadas (caracterizadas por la presencia de tumefacción, enrojecimiento, calor, dolor y pérdida de la función en la zona del daño) y generalizadas; el objetivo de este proceso es restaurar la homeostasis y eliminar la causa de la perturbación. La reacción inflamatoria está acompañada de una respuesta sistémica conocida como respuesta de fase aguda (RFA) en donde

se presenta una reprogramación rápida de la expresión de genes y cambios en el metabolismo en respuesta a la señalización de citocinas inflamatorias. Las citocinas (interleucinas e interferones). Son proteínas de baja masa molecular que actúan como mediadores intracelulares, son producidas por leucocitos activados, fibroblastos y células endoteliales en respuesta a un daño tisular. Intervienen en la respuesta inmunitaria y en la inflamación, participan en procesos de diferenciación y proliferación celular, modulan el metabolismo y están implicadas en numerosos procesos patológicos.

Las principales citocinas liberadas son interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6) y el factor de necrosis tumoral (TNF- α). La respuesta al daño inicia con la liberación de IL-1 y TNF- α desde los macrófagos y monocitos activados en el sitio de lesión, y estas a su vez estimulan la producción y liberación de otras citocinas, particularmente IL-6, responsable de la inducción de cambios sistémicos en la RFA, durante la cual se sintetizan proteínas de fase aguda (PFA) que actúan como mediadores inflamatorios y anti-proteinasas. Entre las PFA se puede mencionar a la proteína-C reactiva, fibrinógeno, y otras anti-proteasas. Actualmente las metalotioneínas (MTs) se encuentran dentro de esta clasificación con base en la similitud entre los inductores de la síntesis de PFA y MTs, puesto que estudios recientes han demostrado un aumento en la expresión de MTs durante un proceso inflamatorio. ^{9, 12, 17, 62, 63}

1.6. METALOTIONEÍNAS

Metalotioneínas es el nombre que se les da a una superfamilia de proteínas descritas y aisladas originalmente de corteza renal equina por Margoshes y Vallee en 1957, quienes las estudiaron como componentes tisulares responsables de la acumulación de cadmio en este órgano. En 1960 Kagi y Vallee las caracterizaron como proteínas pequeñas conformadas por 61-68 aminoácidos, con bajo peso molecular (6-7 kDa), carente de aminoácidos aromáticos e histidinas y con gran contenido de aminoácidos cisteínas e iones metálicos coordinados en dos estructuras en forma de “cluster” metal-tiolato, por lo que se les considero como metaloproteínas. ^{63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73}

1.6.1. Estructura y contenido metálico

Los primeros estudios de la estructura tridimensional de esta proteína en 1990, revelaron que está formada por dos dominios globulares (α y β) y dentro de cada uno de ellos se localiza un “cluster”, el cual unen iones metálicos a la molécula por enlaces de coordinación a través de los grupos sulfhidrilo de las cisteínas, esta conformación permite que la molécula presente giros helicoidales, hacia la derecha en el caso del dominio β y hacia la izquierda en el caso del dominio α . El dominio β localizado cerca del extremo N-terminal presenta un “cluster” con 9 cisteínas que pueden unir 3 iones metálicos divalentes, mientras que el dominio α cercano al extremo C-terminal tiene un “cluster” con 11 aminoácidos cisteína que unen 4 iones metálicos divalentes. Los dominios se encuentran unidos entre sí por un “loop” o asa dándole cierta flexibilidad a la molécula, permitiendo que acepte átomos de diferentes tamaños (figura 9).^{63, 70, 71, 74, 75, 76, 77, 78, 70, 80, 81}

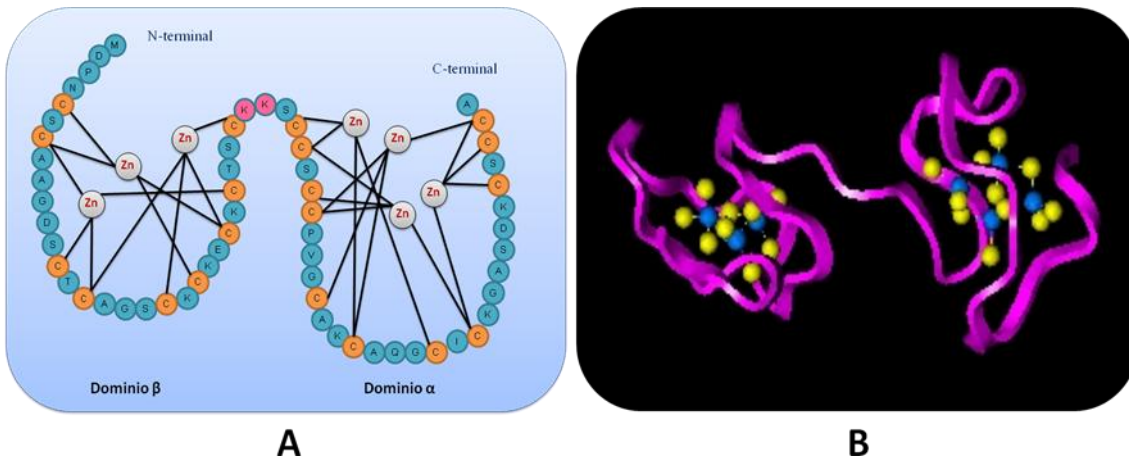


Figura 9.- A) Estructura nativa globular de MT con dos agrupamientos moleculares uniendo siete iones metálicos. B) Estructura tridimensional de MT, presentándose ambos dominios con su respectivo giro helicoidal y el asa flexible que le confiere flexibilidad a la molécula.

El contenido metálico puede variar dependiendo del tejido, situación fisiológica y condiciones ambientales, y su unión a la proteína es reversible, ya que bajo determinadas condiciones, como un descenso en el pH o variaciones del estado redox, se pueden desplazar los metales de la molécula y obtener así la

apoproteína.^{63, 71, 82, 83, 84, 85} La variedad de metales que pueden unirse a metalotioneína (MT) es amplia y su afinidad depende del elemento metálico. La escala de afinidad entre las MT y los metales es la siguiente: Zn (II) < Pb (II) < Cd (II) < Cu (I), Ag (I) y Bi(I) . En condiciones fisiológicas las MTs pueden coordinar zinc y cobre. Sin embargo, cuando existe una alta concentración de otros metales como contaminantes ambientales, tales como cadmio o mercurio, estos pueden desplazar a los anteriores.^{63, 80, 86, 87}

1.6.2. Clasificación

La clasificación de las MTs se basa en la similitud de su secuencia y su relación filogenética, dividiendo a la superfamilia de MTs en familias y esta a su vez en subfamilias, subgrupos e isoformas. Son 15 familias de MT que se distinguen por su número y rango taxonómico según se describe en la tabla 7.^{79, 88, 89, 90}

| Tabla 7.- Clasificación de las metalotioneínas en las diferentes familias de acuerdo a su rango taxonómico.⁸⁸ | |
|---|-------------------------|
| Familia | Rango taxonómico |
| 1 | Vertebrados |
| 2 | Moluscos |
| 3 | Crustáceos |
| 4 | Equinodermos |
| 5 | Dípteros |
| 6 | Nematodos |
| 7 | Ciliados |
| 8, 9, 10, 11, 12, 13 | Hongos |
| 14 | Procariotas |
| 15 | Plantas |

En la familia 1 se encuentran diferentes subfamilias, entre las cuales cuatro pertenecen a las MTs de mamíferos (mMT-1, mMT-2, mMT-3 y mMT-4). En humanos se han aislado los cuatro miembros de la familia, y se pueden clasificar en grupos mayores y menores de acuerdo a los criterios de Broadly:^{15, 67, 70, 71, 77, 85, 90, 91, 92, 93}

- Grupo mayor: MT-1 y MT-2 distribuidas ampliamente expresándose en la mayoría de los tejidos del organismo, principalmente en órganos parenquimatosos
- Grupo menor: MT-3 y MT-4 limitadas a células especializadas

1.6.3. Localización

Las MTs han sido encontradas en todo el reino animal, plantas superiores, microorganismos eucariotes y en algunos procariotes. En mamíferos, se expresan en casi todos los tejidos del organismo, MT-1 y 2 está presente en órganos parenquimatosos como hígado, riñón, intestino, testículos, pulmón, corazón y cerebro, MT-3 se presenta principalmente en sistema nervioso central (SNC) y MT-4 esencialmente en epitelio escamoso estratificado. ^{63, 80, 91}

Su localización subcelular es variada, MT-1 y 2 son proteínas citoplasmáticas, detectando también su presencia en fracciones mitocondriales y lisosomales, y en núcleos celulares. Por su parte MT-3 se ha observado asociada a ribosomas libres al igual que en la región citosólica del retículo endoplásmico, membrana exterior de las mitocondrias y en asociaciones con la membrana plasmática en procesos celulares de astrocitos, así como de neuronas. ^{63, 80, 91, 93}

1.6.4. Funciones

Cuando se trata de nombrar las funciones de las MT se crea un gran debate, esto es debido a que estas proteínas se encuentran presentes en toda la escala evolutiva, y se distribuyen en prácticamente todas las células del organismo, aunado a esto, no existe una función única que comprenda todas las acciones que realiza la MT en el organismo, por lo que puede ejercer más de una función. Estas proteínas son consideradas como moléculas multifuncionales, con base al análisis de secuencias de sus promotores, las que contienen elementos de respuesta a compuestos tan diversos como glucocorticoides, indicadores de estrés oxidativo y elementos de respuesta a metales, se han considerado una variedad de funciones probables. ^{63, 77, 81, 85, 91, 94}

De todas las funciones atribuibles a las MTs de mamíferos, las más estudiadas son su participación en la homeostasis de metales esenciales, detoxificación de metales tóxicos, protección ante el estrés oxidativo, actividades antiinflamatorias, antiapoptóticas, antioxidantes, proliferativas, angiogénicas y se

ha relacionado con una amplia variedad de enfermedades y condiciones patológicas incluyendo Diabetes, Alzheimer y cáncer. Describiendo algunas funciones tenemos: ^{72, 91}

- a) Homeostasis de metales esenciales. A nivel celular, la concentración de metales fisiológicos deben ser controlados finamente, debido a que cuando estos se encuentran en niveles elevados pueden llegar a ser tóxicos, por lo que los organismos cuentan con complejos inorgánicos de metales y de metalochaperonas que almacenan y transportan iones metálicos de forma controlada. Debido a sus características, se propone que las MTs pueden asumir este papel, controlando la absorción, transporte y excreción de iones metálicos contribuyendo así al mantenimiento de la homeostasis de iones metálicos esenciales, sin embargo, aun no se conoce el mecanismo por el cual ocurre el intercambio de estos iones. ^{63, 72, 78, 81, 84, 93, 95, 96}
- b) Detoxificación de metales pesados. La propuesta que involucra a las MTs como detoxificantes o protectoras frente a un exceso de metales pesados (Cd, Pb o Hg), se basa en el aumento de los niveles de MT-1 y 2, ya sea por amplificación génica o inducción de la transcripción, como resultado de un incremento de la concentración de los iones metálicos, así como su capacidad para ligarlos, basado en sus constantes de afinidad, evitando que interaccionen con componentes celulares. ^{63, 77, 78, 72, 84, 92, 93, 96}
- c) Protección ante el estrés oxidativo. En el organismo se generan radicales libres en diferentes situaciones, como estrés, inflamación, irradiación o por administración directa de formadores de radicales libres como H₂O₂; por lo que el organismo posee mecanismos de defensas para hacerles frente. Se propone que las MTs podrían formar parte de estos mecanismos debido a sus características de oxido-reducción conferidas por los grupos sulfidrilos de los aminoácidos cisteína, estos grupos son altamente nucleofílicos por lo que pueden reaccionar con mucha afinidad con radicales electrófilos como las especies reactivas de oxígeno (ROS). ^{63, 72, 78, 81, 84, 87, 90, 93, 95, 96, 97, 98}

1.6.5. Inducción

Las MTs son capaces de sintetizarse ante una gran variedad de estímulos o inductores fisiológicos, fisiopatológicos y toxicológicos (tabla 8), los cuales son capaces de actuar tanto en cultivos celulares, así como *in vivo*. Debido a la amplia diversidad y naturaleza de los inductores de estas proteínas, se ha llegado a concluir que existen mecanismos de respuesta específicos para cada uno, y varios de ellos inducen la síntesis de MT de manera inespecífica a través de la producción de respuestas secundarias en el organismo o como respuesta al estrés, inflamación o sobreproducción de radicales libres (figura 10). ^{63, 80, 91, 93, 99, 100}

| Tabla 8.- Factores y condiciones que inducen la síntesis de metalotioneínas. ^{63, 91, 100} | | |
|---|--|---|
| Factores físicos | Fármacos | Hormonas y factores de crecimiento |
| Tensión elevada de oxígeno | Paracetamol | Glucocorticoides |
| Rayos X | Adriamicina | Progesterona |
| Rayos UC | Bleomicina | Estrógenos |
| Exposición al calor | Cefaloridina | Catecolaminas |
| Agentes alquilantes | Estreptozotocina | Glucagón |
| Bromobenceno | Cisplatino | Insulina |
| Diamida | Menadiona | Angiotensina II |
| Dietilmaleato | Metronidazol | IGF-1 |
| Iodoacetato | Ciclohexamida | EGF |
| Iodometano | Agentes inflamatorios y citocinas | Herbicidas |
| Solventes | LPS | Paraquat |
| Tetracloruro de carbono | Dextrano | Diquat |
| Cloroformo | Turpentina | Otros |
| Etanol | Interleucina-1 | Acido ascórbico |
| Isopropanol | Interleucina-6 | Carragenina |
| Acetamipeno | INF α y γ | Endotoxinas |
| Hidrocarburos | TNF α | Ejercicio |
| Metales | | Ayuno |
| Cd, Zn, Cu, Hg, Au, Ag, Co, Ni y Bi | | |

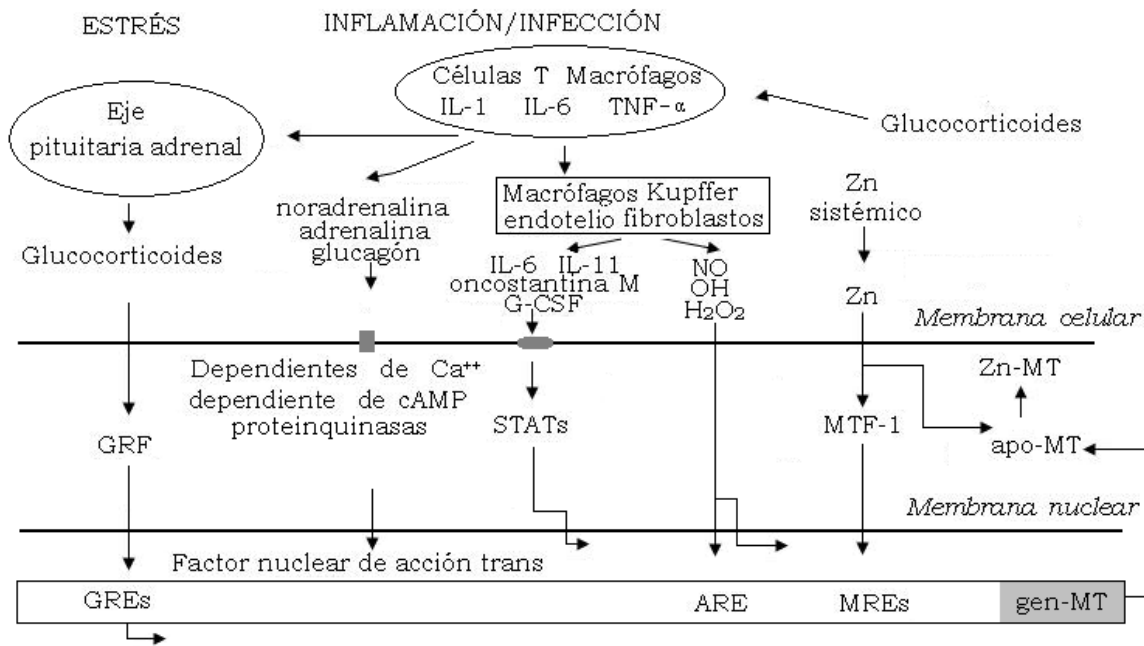


Figura 10.- Esquema de la regulación del gen-MT hepático en respuesta a la inflamación e infección. Tomado de Coyle P, Philcox JC, Carey LC, Rofe AM. *Metallothionein: The multipurpose protein*. *CMLS Cell Mol Life Sci*. 2002; 59:627-647

Sabocinski y colaboradores en 1982 demostraron que el proceso inflamatorio agudo en ausencia de infección induce la síntesis de MTs en hígado, para ello se han empleado diversos modelos experimentales que involucran agentes inflamatorios como lo es el lipopolisacárido bacteriano (LPS), también denominado endotoxina. Su administración produce un incremento de la síntesis de citocinas proinflamatorias (IL-1, IL-6 y TNF- α) a partir de los macrófagos presentes en el inicio de la reacción, proceso parecido al que se produce tras la inflamación, infección o traumatismo. Estas citocinas actúan sobre el endotelio incrementando la permeabilidad y la presencia de proteínas de adhesión. A su vez pueden activar a otras células convirtiéndolas en productoras de citocinas y de factores quimiotácticos. Como consecuencia, se produce infiltración del tejido por células inmunes activadas que sintetizan una segunda onda de citocinas que pueden alcanzar la circulación. Estos mediadores contribuyen a incrementar la respuesta local y conducen a la generación de una respuesta sistémica.^{63, 93} Esta fase se caracteriza por un incremento de la temperatura corporal, leucocitosis, y activación

del eje hipotalámico-pituitario-adrenal (HPA), encontrando un incremento significativo en la síntesis de MT-1 y MT-2 hepáticas, sin embargo, este efecto inductor no se limita únicamente a este tejido. Bremner y Searle en 1987 y 1990, respectivamente, demostraron que tras un proceso inflamatorio se observa un incremento de MT en suero y en otros órganos, por ejemplo, riñón, páncreas, pulmón, ovarios, intestino, bazo, cerebro y corazón, por lo que se les ha considerado como proteínas de respuesta de fase aguda. Podíamos definir a la respuesta de fase aguda como la reacción del organismo frente a una variación de la homeostasis debida a infección, daño tisular, crecimiento neoplásico, desórdenes inmunológicos o estrés; su objetivo es restaurar la homeostasis.^{63,91, 93,}
101

Otro modelo que ha sido empleado para estudiar la inducción de MT durante un proceso inflamatorio en ausencia de infección, es la cirugía experimental, la cual consiste en realizar una incisión abdominal al animal de estudio y posteriormente suturar después de haber expuesto los órganos durante un minuto. En estos estudios se ha observado una inducción en la síntesis de MTs hepáticas en las primeras 24 horas alcanzando un pico máximo durante las 12 primeras horas posteriores a la cirugía, por lo que se propone a la liberación de mediadores inflamatorios, como citocinas u hormonas incrementadas por la activación del eje HPA provocada por el proceso quirúrgico, como inductores directos de estas proteínas^{15, 62, 91}

Los primeros indicios de la inducción de MT por la liberación de mediadores inflamatorios se obtuvieron con los estudios de Brandyn y Helving en 1984, quienes observaron una inducción en la síntesis de MT hepática tras la administración intraperitoneal de adrenalina y noradrenalina, además, este mismo efecto se observó en cultivos de hepatocitos con los trabajos realizados por Cousins y Coppen en 1987. Hernández y colaboradores en el 2000, reforzaron los hallazgos ya descritos al concluir que los mejores inductores de la síntesis de MT hepática eran aquellos inductores fisiológicos originados por el estrés y la inflamación, proponiendo la razón teórica de las propiedades antioxidantes de ésta proteína. En

sus estudios, observaron que la inmovilización de ratones ocasionaba que los niveles de mRNA MT-1 y MT-total (1+2) incrementaran, sin embargo, tras la administración de RU486 (bloqueador del receptor de glucocorticoides), disminuyó considerablemente esta síntesis. También realizó la extirpación quirúrgica de las glándulas adrenales (adrenalectomía; ADX) y una ADX simulada (sin la extirpación de las glándulas adrenales), posteriormente se sometió a los ratones al mismo estrés de inmovilización. Al medir los niveles de mRNA MT-1, encontró un incremento similar en ambos grupos. Sin embargo, al cuantificar la MT-total, describe una mayor síntesis de esta proteína en aquel grupo experimental que solo tenía la ADX simulada, con respecto al grupo que tenía la ADX. Finalmente se ha propuesto a los glucocorticoides como inductores de la síntesis de MT hepática.

63,91

Un estudio realizado en el año 2007 en el Laboratorio de Investigaciones Químico Clínicas (LIQC), cuyo objetivo fue evaluar el comportamiento de la concentración sérica de diferentes hormonas (entre ellas catecolaminas) tras un proceso quirúrgico abdominal en rata, y su relación con el incremento de MT hepática; mostró que los niveles séricos de adrenalina aumentan en las etapas posteriores a la cirugía abdominal, atribuyéndole con ello un papel esencial en el incremento de la concentración de MT en respuesta al proceso inflamatorio inducido por la cirugía, sin embargo este efecto no puede ser relacionado con noradrenalina, debido a que su concentración sérica disminuyó tras el proceso quirúrgico. ^{15, 102, 103}

2. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA

Durante el proceso inflamatorio no infeccioso producido durante una cirugía, se induce la síntesis de MT, como consecuencia de la liberación de mediadores inflamatorios como citocinas y hormonas, el hígado ha sido el órgano más estudiado, sin embargo, poco se sabe acerca del efecto de un proceso quirúrgico sobre los niveles de MT en otros órganos. Estudios recientes realizados en el Laboratorio de Investigaciones Químico Clínicas, han descrito que en las etapas posteriores a un proceso quirúrgico abdominal en ratas se produce un aumento de MT en corazón, sin embargo, aún se desconoce el mecanismo por el cual se producen estos incrementos.

Estudios previos han mostrado que las MT en hígado son inducidas por las catecolaminas incrementadas durante un proceso quirúrgico, y debido a que el corazón es sensible a la acción de las catecolaminas en presencia de hormonas tiroideas a causa de un aumento en el número de los receptores β -adrenérgicos en este órgano, se plantea la siguiente pregunta:

¿Las hormonas tiroideas coadyuvan en la producción de metalotioneínas de corazón durante una cirugía abdominal en rata?

3. JUSTIFICACIÓN

Las MT son proteínas cuya síntesis es inducida por metales, hormonas, citocinas y agentes citotóxicos. Estudios previos han demostrado que el estrés producido por una lesión tisular, induce la síntesis de MT en respuesta al proceso inflamatorio. Un modelo que ha sido empleado para el estudio de la síntesis de MT es la cirugía abdominal en animales de laboratorio. Los incrementos de MT hepática han sugerido que estas proteínas forman parte de la respuesta de estrés durante los procesos inflamatorios, y su objetivo principal es ayudar a restaurar la homeostasis alterada. El órgano más empleado para el estudio de la síntesis de MT durante la inflamación ha sido el hígado, debido a su papel en la síntesis de ésta y otras proteínas, sin embargo, otros órganos puedan participar en la respuesta a los procesos inflamatorios.

Recientemente, en el Laboratorio de Investigaciones Químico Clínicas, se ha descrito que en las etapas posteriores a un proceso quirúrgico abdominal, las MT en corazón muestran un aumento significativo, sin embargo, aún no se tiene información acerca del mecanismo involucrado en el incremento de estas proteínas en este órgano. Estudios previos desarrollados por Brandy y Helving en 1984, demostraron el papel de las catecolaminas en la inducción de la síntesis de MT hepática, y aunado a esto se ha descrito que las hormonas tiroideas son capaces de incrementar los receptores de esta hormona, por lo que es importante determinar si las catecolaminas pueden actuar como inductores de las MT en corazón y las hormonas tiroideas potenciar esta inducción.

4. OBJETIVOS

4.1. GENERAL

Determinar el efecto de las hormonas tiroideas como coadyuvantes de las catecolaminas en la producción de las metalotioneínas en corazón después de un proceso quirúrgico experimental en ratas

4.2. ESPECÍFICOS

1. Determinar el incremento máximo de síntesis de metalotioneínas en corazón durante un proceso inflamatorio.
2. Establecer un modelo hipo y hiper-tiroideo en ratas por administración de fármacos.
3. Determinar el comportamiento de los niveles de T_3 y T_4 total después de realizar una cirugía experimental.
4. Evaluar la síntesis de metalotioneínas en corazón en animales hipo-, eu- e hiper-tiroideas mediada por un proceso inflamatorio inducido por una cirugía abdominal.
5. Corroborar el papel coadyuvante de las hormonas tiroideas en los animales hiper-tiroideos, mediante la inhibición de la acción de adrenalina.

5. HIPÓTESIS

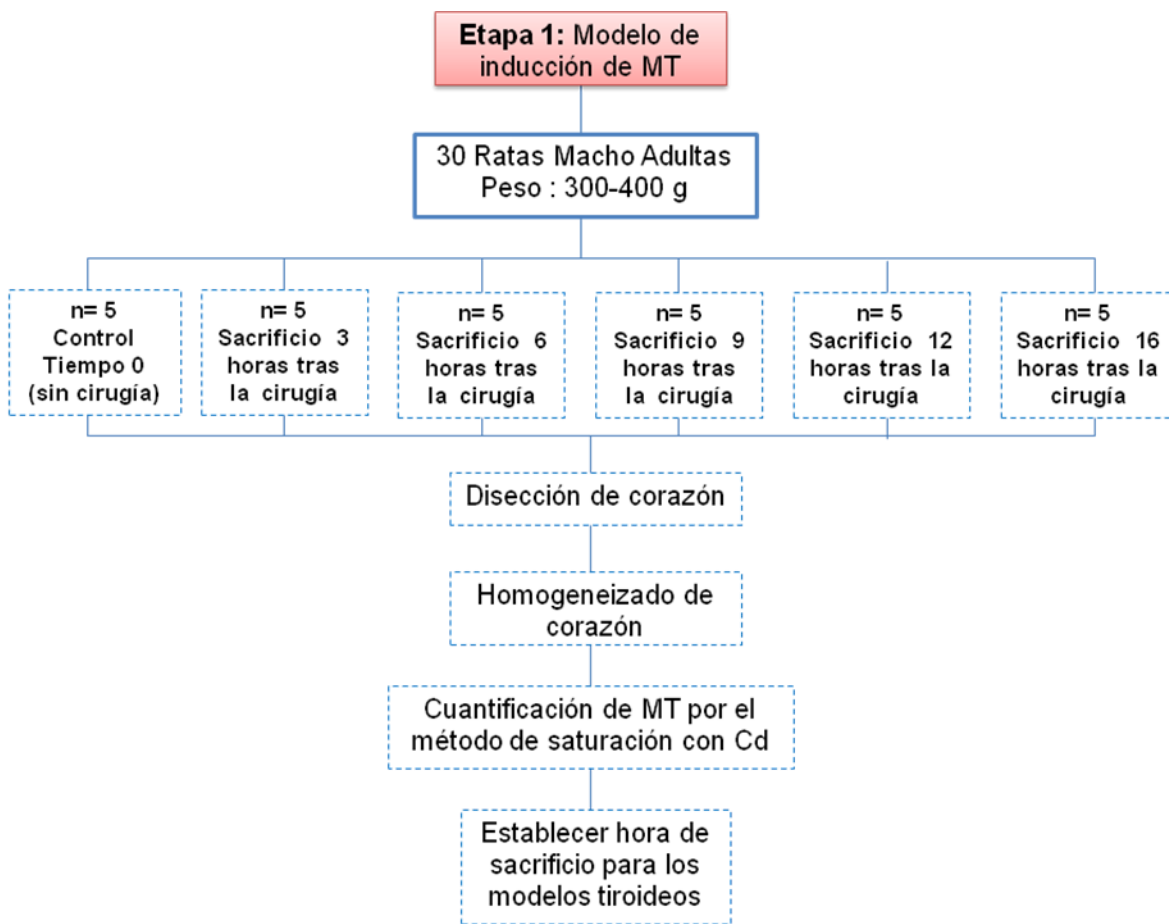
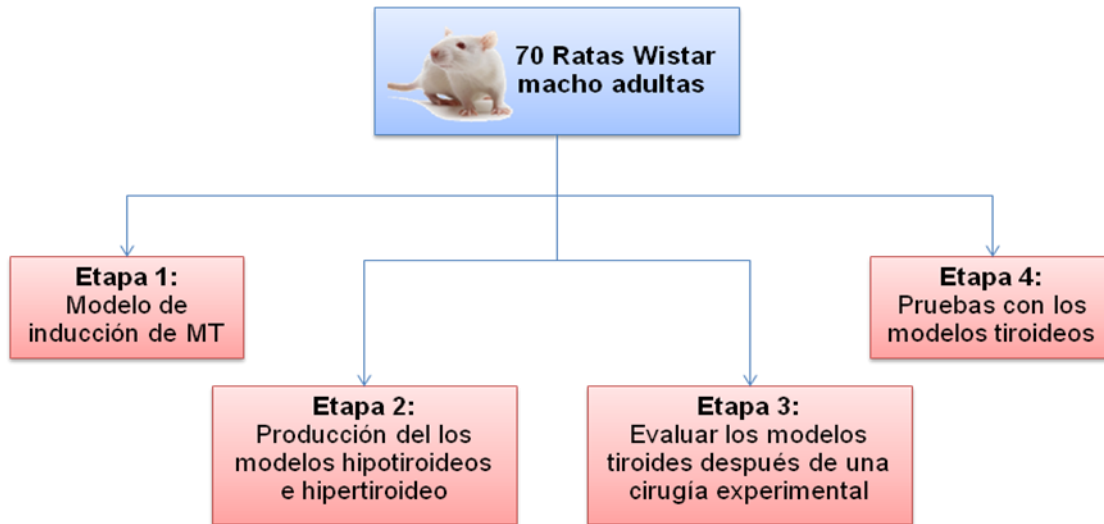
5.1. HIPÓTESIS NULA (H_0):

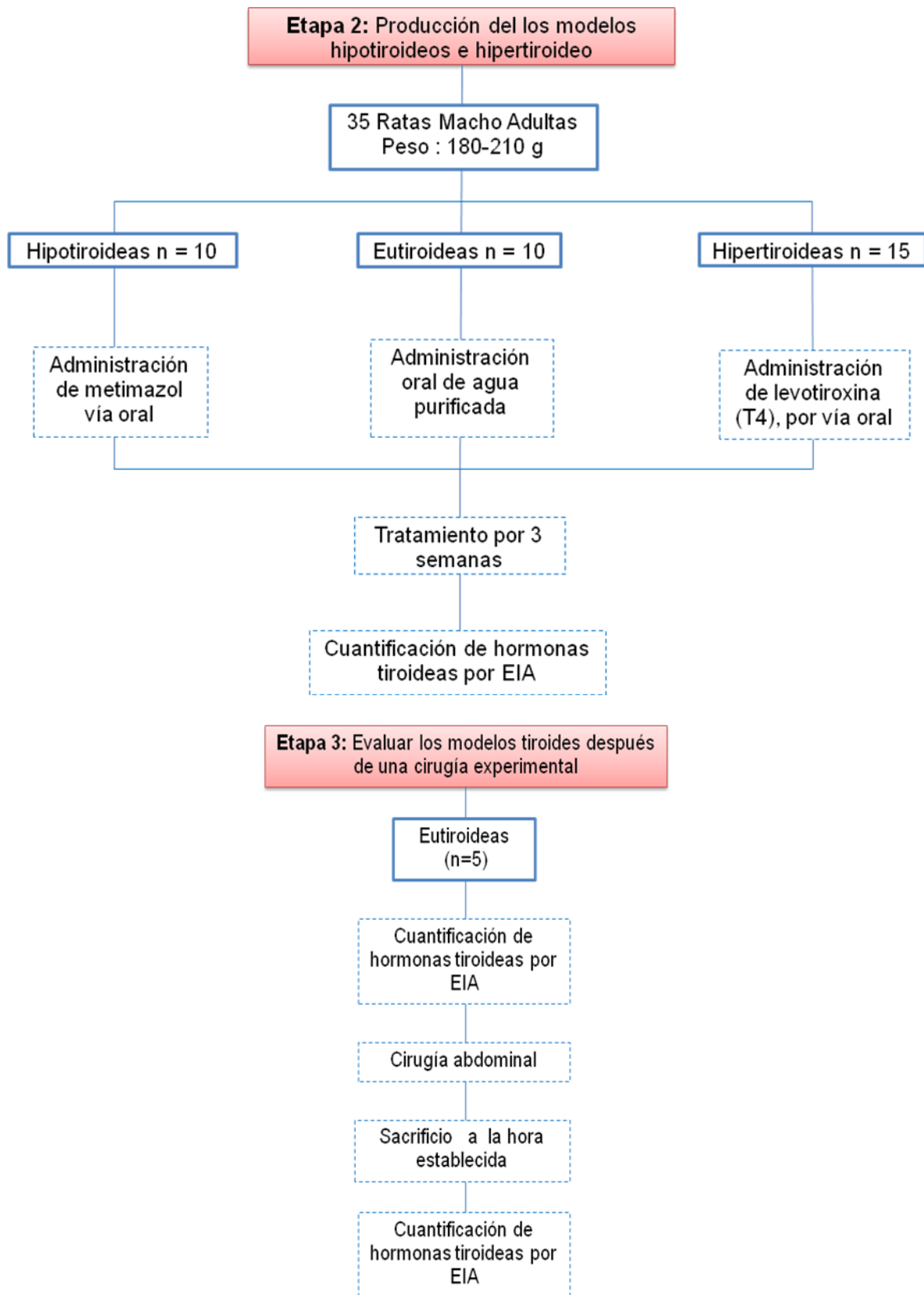
Las hormonas tiroideas no tienen un efecto coadyuvante de las catecolaminas en la producción de metalotioneínas en corazón de rata inducidas por cirugía abdominal.

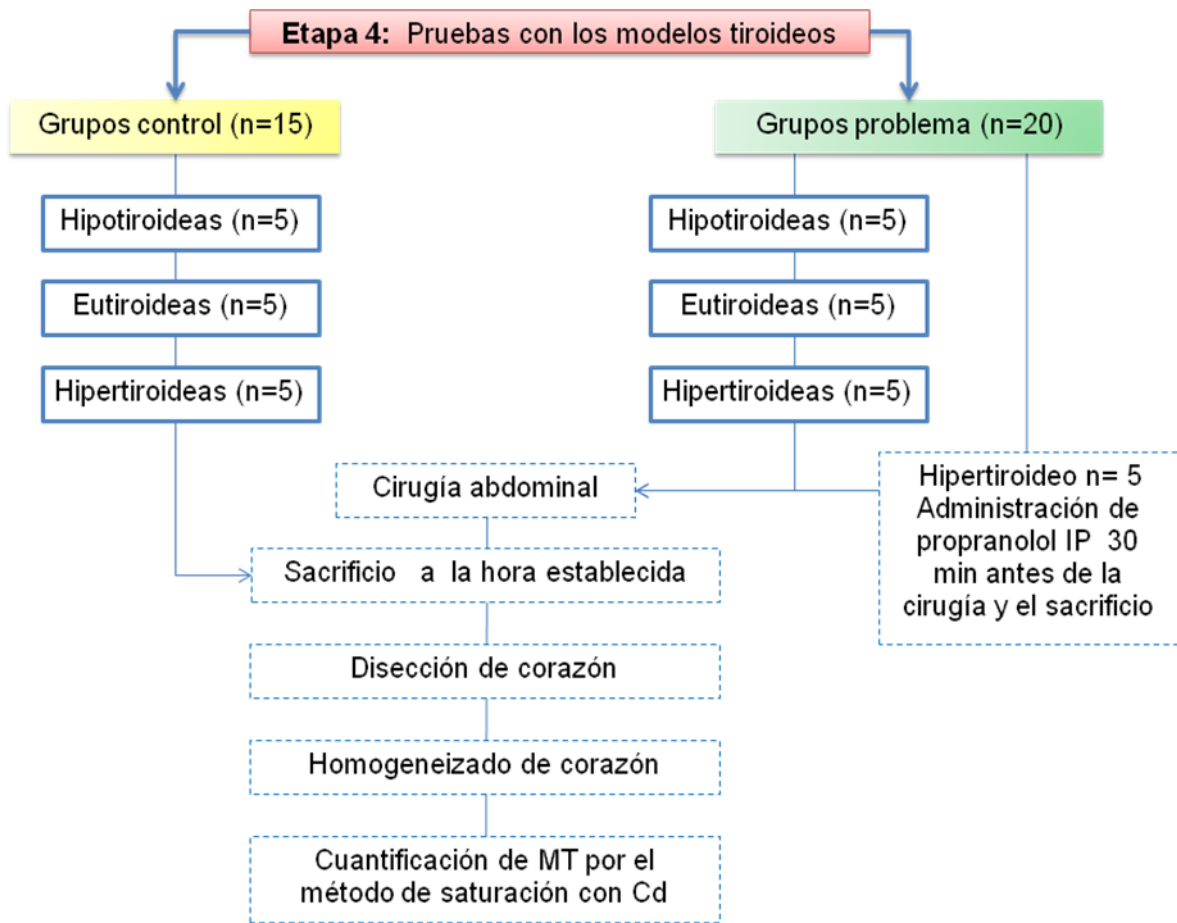
5.2. HIPÓTESIS ALTERNATIVA (H_1):

Las hormonas tiroideas tienen un efecto coadyuvante de las catecolaminas en la producción de metalotioneínas en corazón de rata inducidas por cirugía abdominal.

6. DIAGRAMA DE TRABAJO







7. MATERIAL Y METODOS

7.1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Para este trabajo se emplearon 60 ratas macho de la cepa Wistar con un peso entre 180-200 y 300-400 g, obtenidas del Bioterio “Claude Bernard” de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Los animales fueron alojados en cajas de policarbonato con serrín y mantenidos bajo condiciones controladas de temperatura (25 °C), humedad y ciclos de luz-oscuridad de 12 horas. Durante todo el estudio las ratas tuvieron libre acceso a alimento y agua. Todos los procedimientos empleados en los animales siguieron las normas de acuerdo a la “Guía para el Cuidado y uso de Animales de Laboratorio” de México y aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales y a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Los animales fueron divididos aleatoriamente en grupos de 5 individuos, y del mismo modo asignados a los grupos de experimentación, los cuales se describen en la tabla 9:

Tabla 9.- Grupos de experimentación. C/C: con cirugía; S/C: sin cirugía; MT: metalotioneínas; HT: hormonas tiroideas; a.C: antes de la cirugía; d.C: después de la cirugía.

| GRUPO | N | MEDICIÓN | PESO |
|---|---|-----------------|-----------|
| Eutiroideo C/C (0 horas) CONTROL | 5 | MT d.C | 300-400 g |
| Eutiroideo C/C (3 horas) | 5 | MT d.C | |
| Eutiroideo C/C (6 horas) | 5 | MT d.C | |
| Eutiroideo C/C (9 horas) | 5 | MT d.C | |
| Eutiroideo C/C (12 horas) | 5 | MT d.C | |
| Eutiroideo C/C (16 horas) | 5 | MT d.C | |
| Hipotiroideo S/C CONTROL | 5 | HT a.C y MT d.C | 180-210 g |
| Hipotiroideo C/C (9 horas) | 5 | HT a.C y MT d.C | |
| Eutiroideo S/C CONTROL | 5 | HT a.C y MT d.C | |
| Eutiroideo C/C (9 horas) | 5 | HT a.C y MT d.C | |
| Hipertiroideo S/C CONTROL | 5 | HT a.C y MT d.C | |
| Hipertiroideo C/C (9 horas) | 5 | HT a.C y MT d.C | |
| Hipertiroideo + propranolol C/C (9 horas) | 5 | HT a.C y MT d.C | |
| Eutiroideo C/C | 5 | HT a.C y d.C | 300-400 g |

7.2. INDUCCIÓN DE METALOTIONEÍNAS EN CORAZÓN MEDIANTE UNA CIRUGÍA ABDOMINAL

Todos los animales fueron sometidos a un periodo de ayuno previo a la cirugía de 8 h. El anestésico utilizado fue Xilacina/Ketamina a una dosis de 0.2 ml/100 g de peso. Los animales completamente anestesiados fueron sometidos a una cirugía abdominal de 3 cm, abriendo piel y posteriormente músculo, para dejar expuestos los órganos internos durante un minuto. Transcurrido este periodo, se prosiguió a suturar ambas capas con hilo Catgut 4-0. Después de la cirugía, se continuo con el sacrificio de cada animal a la hora establecida mediante una perfusión sistémica con solución salina al 0.95% para eliminar la sangre del corazón y otros órganos. Una vez realizada la perfusión, el corazón fue extraído, se colocó en un recipiente rotulado y se almacenó a -70 °C hasta la realización de los análisis correspondientes. Los grupos que así lo requerían fueron sometidos, previa perfusión, a una punción cardiaca para la obtención de sangre total, la cual se colocó en tubos de ensaye perfectamente limpios y rotulados. Una vez que la sangre coaguló, se obtuvo el suero por centrifugación a 3500 rpm durante 5 minutos, el suero se almaceno a -20°C hasta la realización del análisis pertinente.

7.3. PRODUCCIÓN DE UN MODELO HIPOTIROIDEO

Administración de metimazol (Tapazol 5 mg/tableta. Laboratorio Siegried Rhein) vía oral a una dosis de 4.5 mg/rata/día durante 3 semanas. El fármaco fue disuelto en agua purificada. ¹⁰⁴

7.4. PRODUCCIÓN DE UN MODELO HIPERTIROIDEO

Administración por vía oral de levotiroxina sódica (Eutirox 125 µg/tableta. Laboratorio Merck) a una dosis de 75 µg/rata/día durante 3 semanas. La hormona fue disuelta en agua purificada. ¹⁰⁵

7.5. INHIBICIÓN DE LA ACCIÓN DE ADRENALINA

Administración por vía intraperitoneal de propanolol a una dosis de 10mg/kg, 30 minutos antes de la cirugía y sacrificio. El fármaco se disolvió en agua destilada. ¹⁰⁶

7.6. CUANTIFICACIÓN DE METALOTIONEÍNAS POR EL MÉTODO DE SATURACIÓN CON ¹⁰⁹CADMIO

La determinación de la concentración de MT cardiaca se realizó de acuerdo al método de saturación con ¹⁰⁹Cd descrito por Eaton y Toal, 1982. ¹⁰⁷

Procedimiento:

1. Mezclar 0.5 g de tejido (corazón) con 500 µL de regulador Tris-HCl 30 mM, pH 8.6, y homogeneizar.
2. Centrifugar durante 15 minutos a 12 000 rpm para la obtención de la fracción sobrenadante.
3. A 100 µL del sobrenadante obtenido se adiciona 100 µL de solución con ¹⁰⁹Cd.
4. Incubar por 10 minutos a temperatura ambiente.
5. Adicionar una solución de hemoglobina al 2% para eliminar el ¹⁰⁹Cd no unido a MT.
6. Los complejos hemoglobina-Cd se precipitan por calor a 95 °C, repetir este último paso una vez más.
7. La hemoglobina se precipita mediante centrifugación durante 5 minutos a 12 000 rpm.
8. La cantidad de ¹⁰⁹Cd fijado por la MT presente en el sobrenadante se mide mediante un detector de centelleo (Perkin Elmer Wisard 1470 Automatic Gamma Counter).

7.7. CUANTIFICACIÓN DE T₄ Y T₃ TOTAL

La cuantificación sérica de las hormonas T₄ y T₃ totales en los animales de experimentación, se realizó mediante un inmunoensayo (EIA) de tipo competitivo, empleando un kit comercial de DIAGNÓSTICA INTERNACIONAL S.A. de C.V. y un lector de placas de microelisa Stat Fax Mod. Plus.

- **T₄ total.**

FUNDAMENTO: En el T₄ EIA, una cierta cantidad de anticuerpo del anti-T₄ cubre las cavidades de los micro pozos. Una cantidad moderada del suero de rata, y una cantidad constante de T₄ conjugada con la peroxidasa de rábano se agrega a las cavidades de los micro-pozos. Durante la incubación, T₄ y el conjugado T₄ compiten por los sitios de unión limitados en el anticuerpo de anti-T₄. Después de la incubación, los pozos se lavan para quitar lo que no se une al conjugado T₄. Una solución de TMB se agrega y es incubada para producir el desarrollo de color azul. El color revelado es detenido con la adición de solución de paro, y la absorbancia es medida espectrofotométricamente a 450nm. La intensidad del color formada es proporcional a la cantidad presente de la enzima y se relaciona inversamente a la cantidad sin etiquetar de T₄ en la muestra.

- **T₃ total**

FUNDAMENTO: En el T₃ EIA, un segundo anticuerpo (IgG anti-ratón de cabra) está revestido sobre los pozos de microtitulación. Una cantidad medida de suero de rata, una cierta cantidad de anticuerpo anti-T₃ monoclonal de ratón, y una cantidad constante de T₃ conjugado con peroxidasa de rábano son agregados a los depósitos de microtitulación. Durante la incubación, el anticuerpo anti-T₃ de ratón es enlazado al segundo anticuerpo sobre los pozos. T₃ y T₃ conjugado compiten para los sitios de enlazamiento limitado sobre el anticuerpo anti-T₃. Después de una incubación los pozos son lavados para remover conjugado T₃ no enlazado. Una solución de TMB es agregada e incubada provocando el desarrollo del color azul. El desarrollo del color es frenado con la adición de solución de paro y la absorbancia es medida espectrofotométricamente a 450nm. La intensidad del color formado es proporcional a la cantidad de enzima presente y está inversamente relacionada con la cantidad de T₃ sin etiquetar en la muestra.

En la figura 11, se muestra la curva de calibración obtenida en el laboratorio, donde se puede observar la linealidad y la correlación negativa de la prueba con la concentración sérica de las hormonas tiroideas empleadas (T₃ y T₄ total). El coeficiente de correlación entre la curva de calibración establecida por el

fabricante y la obtenida en el laboratorio para T₃ total y T₄ total fue de 0.97 y 0.99 respectivamente, con lo cual se demuestra que ambas curvas se comportan de forma similar. Por lo tanto, las curvas de calibración obtenida en el laboratorio aseguran la obtención resultados precisos.

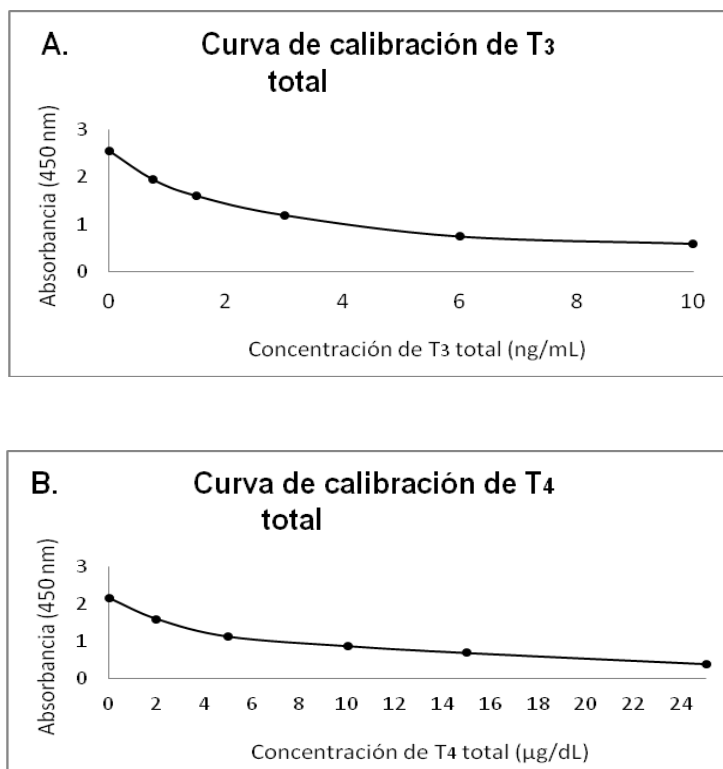


Figura 11.- Curva de calibración para T₃ total (A) y T₄ total (B) sérica, realizada por el método de EIA de tipo competitivo.

7.8. ANÁLISIS DE DATOS

Los resultados obtenidos en los grupos problema se compararon con los obtenidos en los grupos testigo en cada variable de respuesta mediante la prueba “t” de student, se consideraron diferencias estadísticamente significativas a un nivel de $p < 0.05$. El proceso estadístico realizado entre los diferentes grupos fue mediante ANOVA de una vía, y contraste con una F de Scheffe 5%.

8. RESULTADOS

8.1. INDUCCIÓN DE LA SÍNTESIS DE METALOTIONEÍNAS EN CORAZÓN MEDIANTE UNA CIRUGÍA ABDOMINAL

Con la finalidad de determinar si una cirugía abdominal en animales de experimentación produce una inducción de metalotioneínas en corazón, y observar el comportamiento de la misma, se estableció un protocolo en el que se sometió a los animales a un proceso quirúrgico abdominal experimental. Se trabajó con un grupo control sin cirugía abdominal (hora 0), y 5 grupos problema a los que se les realizó una cirugía abdominal bajo protocolos establecidos y con sacrificio a las 3, 6, 9, 12 y 16 horas posteriores a la cirugía. Con los resultados obtenidos, pudimos observar el incremento máximo en la concentración de MT, correspondiente a la inducción por catecolaminas, y sobre esta base, se estableció la hora de sacrificio a las 9h post-cirugía, para poder evaluar el papel coadyuvante de T₃ sobre la inducción de MT mediada por adrenalina.

Los resultados representados en la figura 12, evidencian que el proceso quirúrgico abdominal en los animales de experimentación, produce un incremento de los niveles de metalotioneínas cardiaca, siendo estadísticamente significativo a las 9 h post-cirugía, con aumento del 49% respecto al control. Por otra parte, se observa una disminución de los niveles de MT a las 12 horas, sin embargo, los valores permanecen arriba del grupo de 0 horas; y finalmente se puede apreciar un nuevo incremento significativo a las 16 horas del 63% con respecto al control.

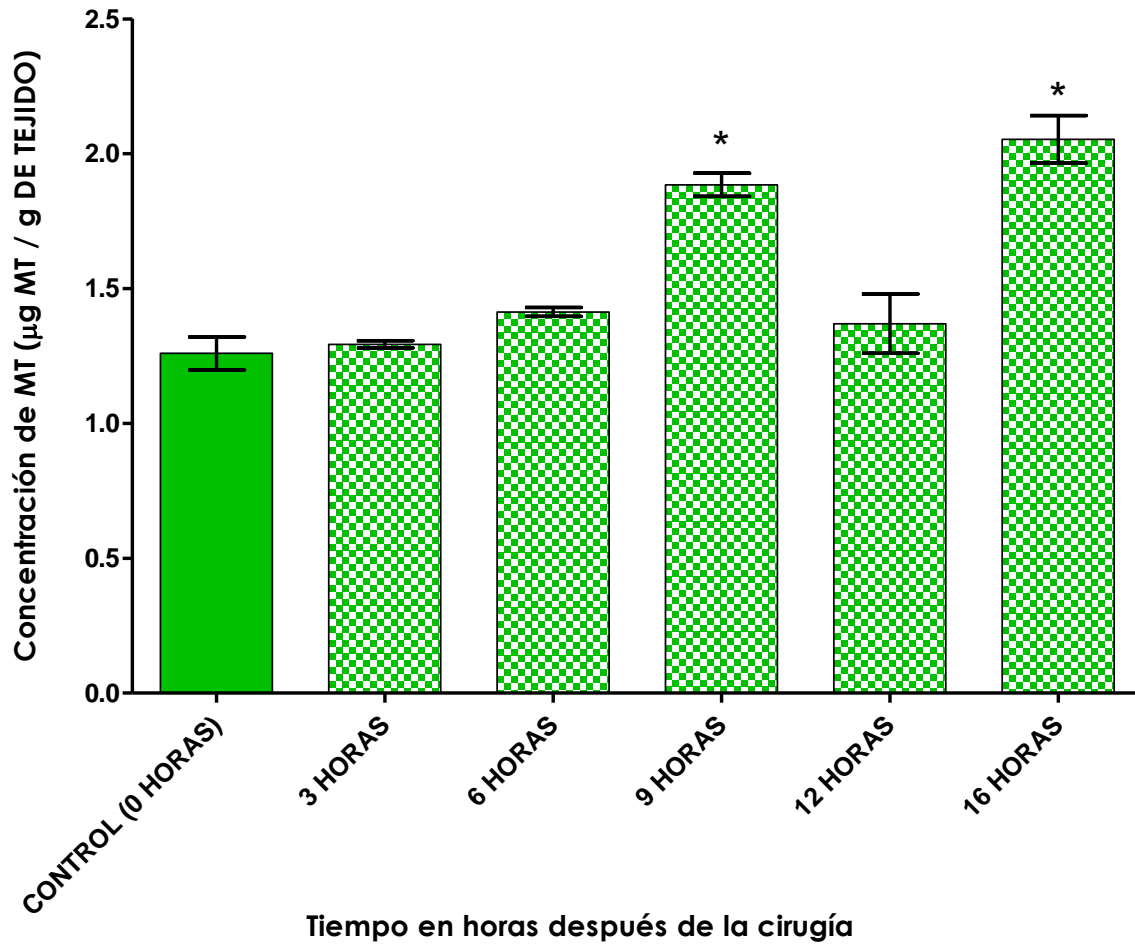


Figura 12.- Inducción de metalotioneína en corazón mediante una cirugía abdominal. Cuantificación de la concentración de MT total en corazón, se realizó mediante el método de saturación con ^{109}Cd . Las barras representan la media \pm EEM de 5 experimentos independientes. El asterisco (*) indican la diferencia significativa con respecto al grupo control (0 horas), $p \leq 0.05$, prueba t de Student.

8.2. PRODUCCIÓN DEL MODELO HIPOTIROIDEO

Para producir el estado hipotiroideo en los animales de experimentación, estos fueron tratados durante 2 periodos, de 3 semanas y 6 semanas, con la administración de 4.5 mg/rata/día de metimazol vía oral. Posteriormente al periodo de administración, se obtuvo una muestra de sangre total mediante punción cardiaca y se prosiguió a cuantificar la concentración de hormonas tiroideas sérica (T_3 y T_4 totales).

Los resultados mostraron que los niveles séricos de las hormonas tiroideas séricas T_3 como de T_4 totales (representadas en las figuras 13 a la 16), presentaron una disminución estadísticamente significativa en ambos periodos de tratamiento, comparados con los animales control administrados únicamente con el vehículo (agua purificada). La administración de Metimazol durante 3 semanas mostró una disminución de T_4 total sérica del 44 % y un 41% de T_3 . Por su parte, el tratamiento administrado por 6 semanas disminuyó un 53% los niveles de T_4 y un 54% de T_3 . El análisis estadístico no evidenció diferencias significativas entre las 3 y 6 semanas (figura 17 y 18), por lo que se considero que se había logrado obtener el modelo hipotiroideo desde la tercera semana de administración y se trabajo bajo este protocolo para realizar la etapa número 3 del proyecto.

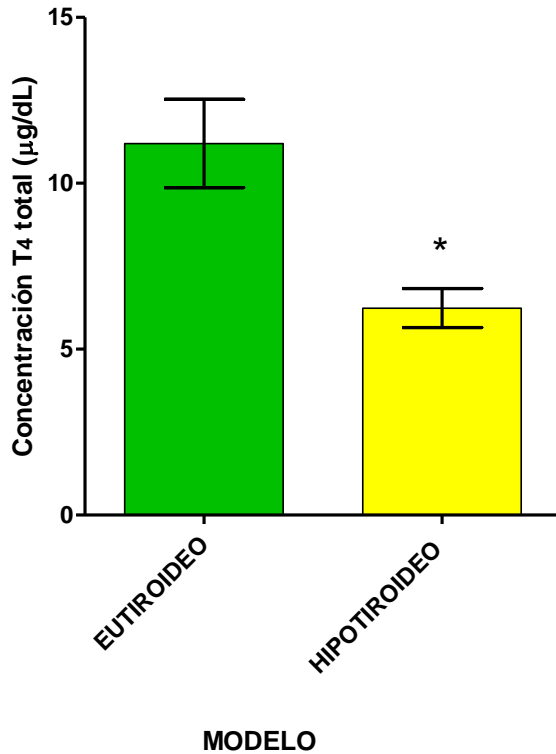


Figura 13.- Producción de un modelo hipotiroideo (T₄ total sérica). Tres semanas de tratamiento. Cuantificación de la concentración de T₄ total sérica mediante un EIA competitivo en animales de experimentación tras la administración de 4.5 mg/rata/día de metimazol vía oral durante 3 semanas (barra amarilla). Las barras representan la media \pm EEM de 5 experimentos independientes. El asterisco (*) indica diferencia significativa con respecto al grupo eutiroideo (barra verde), $p \leq 0.05$, prueba t de Student.

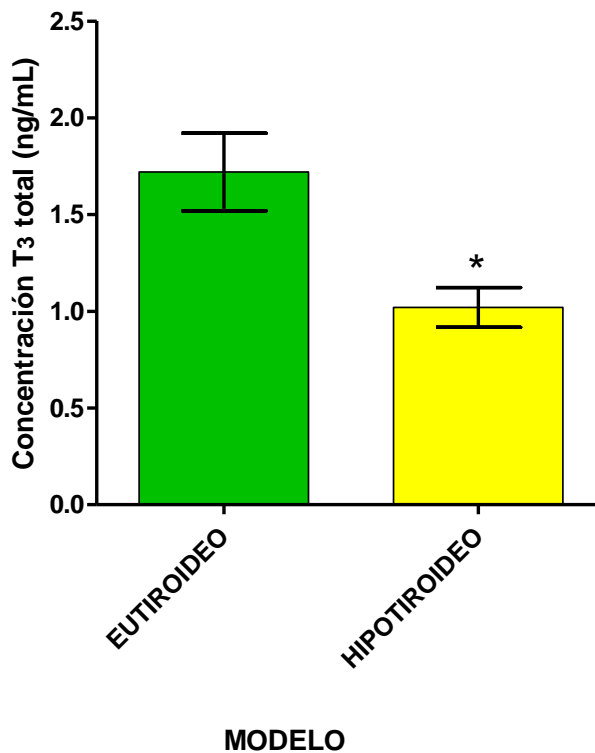


Figura 14.- Producción de un modelo hipotiroideo (T₃ total sérica). Tres semanas de tratamiento. Cuantificación de la concentración de T₃ total sérica mediante un EIA competitivo en animales de experimentación tras la administración de 4.5 mg/rata/día de metimazol vía oral durante 3 semanas (barra amarilla). Las barras representan la media \pm EEM de 5 experimentos independientes. El asterisco (*) indica diferencia significativa con respecto al grupo eutiroideo (barra verde), $p \leq 0.05$, prueba t de Student.

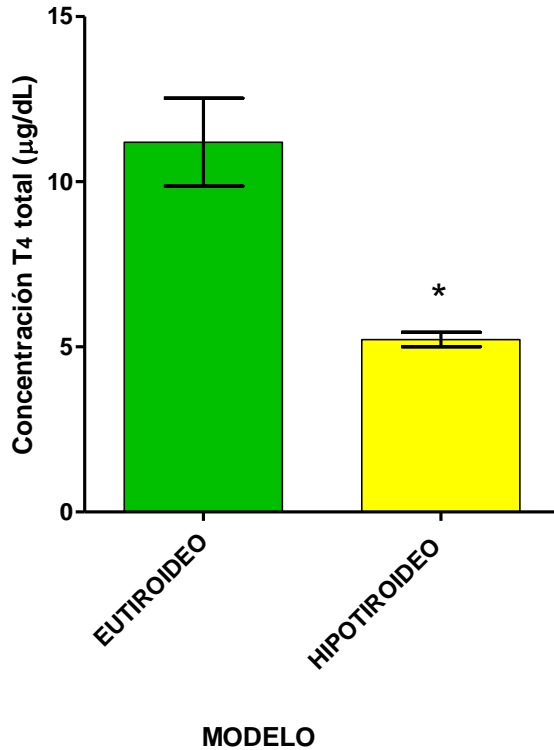


Figura 15.- Producción de un modelo hipotiroideo (T₄ total sérica). Seis semanas de tratamiento. Cuantificación de la concentración de T₄ total sérica mediante un EIA competitivo en animales de experimentación tras la administración de 4.5 mg/rata/día de metimazol vía oral durante 6 semanas (barra amarilla). Las barras representan la media ± EEM de 5 experimentos independientes. El asterisco (*) indica diferencia significativa con respecto al grupo eutiroideo (barra verde), $p \leq 0.05$, prueba t de Student.

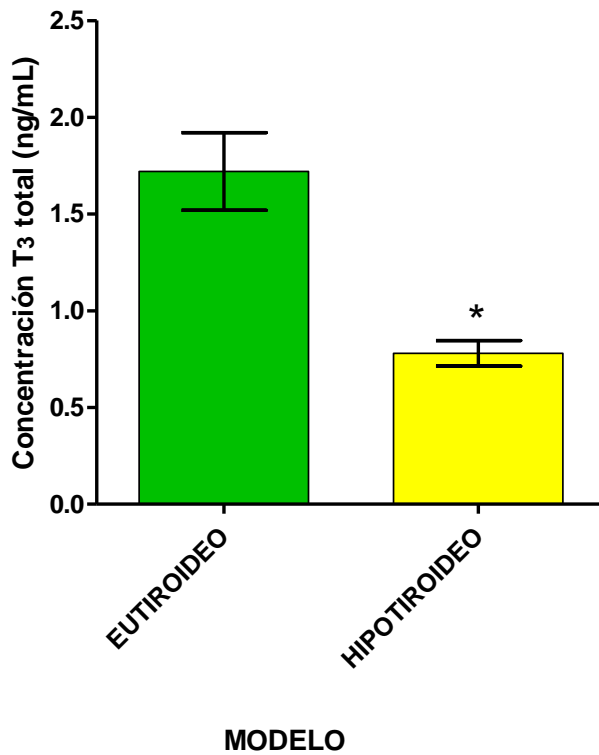


Figura 16.- Producción de un modelo hipotiroideo (T₃ total sérica). Seis semanas de tratamiento. Cuantificación de la concentración de T₃ total sérica mediante un EIA competitivo en animales de experimentación tras la administración de 4.5 mg/rata/día de metimazol vía oral durante 6 semanas (barra amarilla). Las barras representan la media ± EEM de 5 experimentos independientes. El asterisco (*) indica diferencia significativa con respecto al grupo eutiroideo (barra verde), $p \leq 0.05$, prueba t de Student.

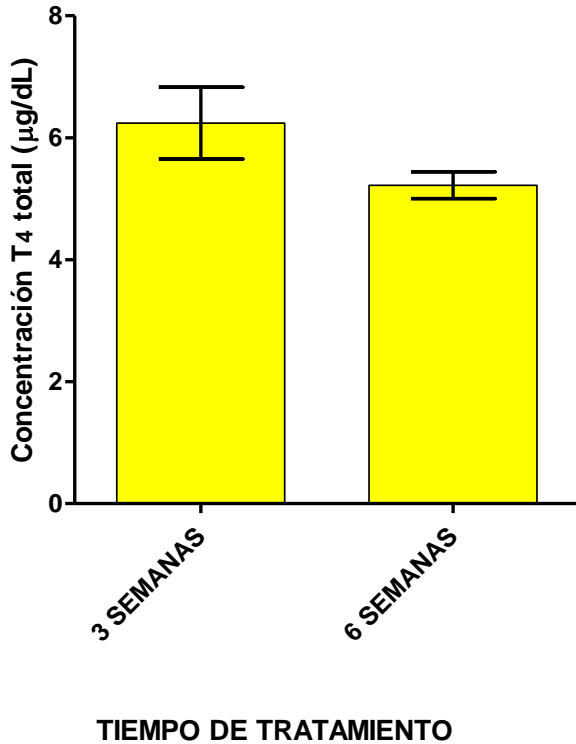


Figura 17.- Comparación de los dos periodos de administración para la producción de un modelo hipotiroideo. (T₄ total sérica) Cuantificación de la concentración de T₄ total sérica mediante un EIA competitivo en animales de experimentación tras la administración de 4.5 mg/rata/día de metimazol vía oral durante 3 y 6 semanas. Las barras representan la media \pm EEM de 5 experimentos independientes, prueba t de Student, $p \leq 0.05$.

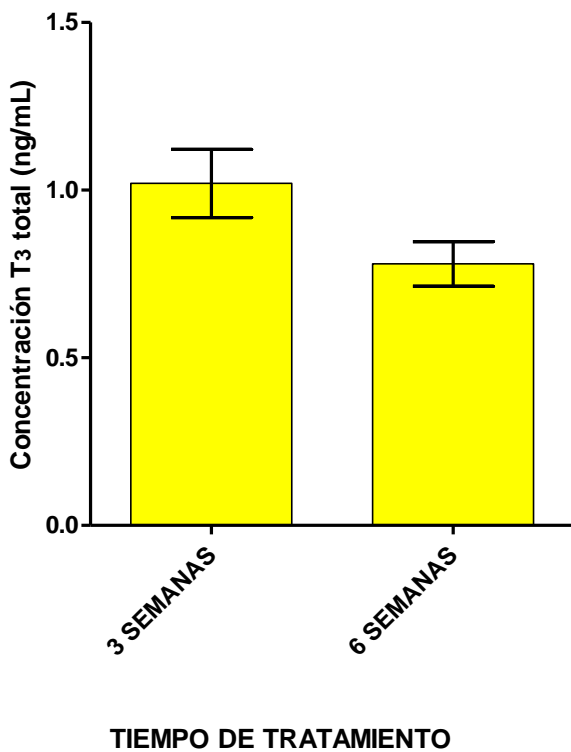


Figura 18.- Comparación de los dos periodos de administración para la producción de un modelo hipotiroideo. (T₃ total sérica) Cuantificación de la concentración de T₃ total sérica mediante un EIA competitivo en animales de experimentación tras la administración de 4.5 mg/rata/día de metimazol vía oral durante 3 y 6 semanas. Las barras representan la media \pm EEM de 5 experimentos independientes, prueba t de Student, $p \leq 0.05$.

8.3. PRODUCCIÓN DEL MODELO HIPERTIROIDEO

Para producir el estado hipertiroideo en los animales de experimentación, estos fueron tratados con 75 µg/rata/día de levotiroxina vía oral durante 2 periodos, 3 y 6 semanas, tras lo cual se obtuvo una muestra de sangre total mediante punción cardiaca y se prosiguió a cuantificar la concentración de hormonas tiroideas sérica (T_3 y T_4 totales).

Los resultados mostraron que con 3 semanas de tratamiento los niveles séricos tanto de T_3 como de T_4 totales séricas (representadas en las figuras 19 y 20), presentaron un aumento estadísticamente significativo comparados con los animales control tratados con el vehículo (agua purificada) con un incremento de T_4 del 80% y un 97% para T_3 , sin embargo, después de 6 semanas de administración, los niveles de hormonas tiroideas no mostraron aumentos, T_4 disminuyó un 17% en comparación de su grupo control (figura 21), sin embargo las diferencias no fueron estadísticamente significativas comportándose como un estado eutiroideo (figura 21). Por su parte T_3 disminuyó su nivel en un 31 %, esta disminución fue significativa y se encuentra por debajo del estado eutiroideo (Figura 22). Además al comparar ambos periodos de administración se encontraron diferencias de una reducción de T_3 y T_4 totales a las 6 semanas de tratamiento (figuras 23 y 24), por lo que se decidió tratar únicamente a los animales por 3 semanas ya en que este periodos se puede producir el estado hipertiroideo.

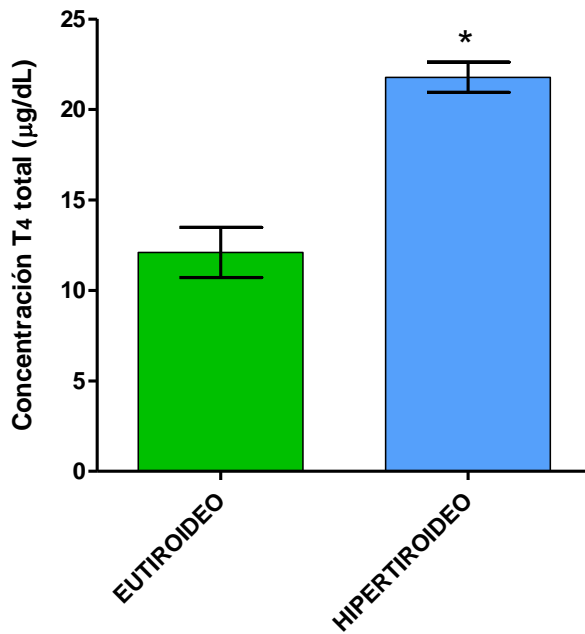


Figura 19.- Producción de un modelo hipertiroideo (T₄ total sérica). Tres semanas de tratamiento. Cuantificación de la concentración de T₄ total sérica mediante un EIA competitivo en animales de experimentación tras la administración de 75 µg/rata/día de levotiroxina vía oral durante 3 semanas (barra azul). Las barras representan la media ± EEM de 5 experimentos independientes. El asterisco (*) indica diferencia significativa con respecto al grupo eutiroideo (barra verde), $p \leq 0.05$, prueba t de Student.

MODELO

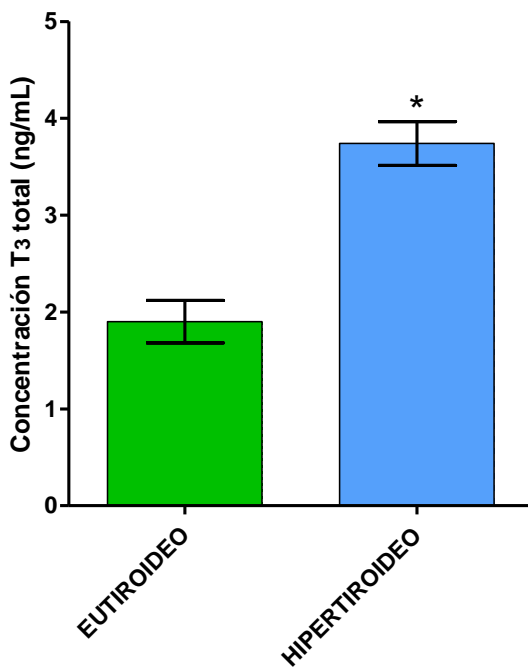


Figura 20.- Producción de un modelo hipertiroideo (T₃ total sérica). Tres semanas de tratamiento. Cuantificación de la concentración de T₃ total sérica mediante un EIA competitivo en animales de experimentación tras la administración de 75 µg/rata/día de levotiroxina vía oral de durante 3 semanas (barra azul). Las barras representan la media ± EEM de 5 experimentos independientes. El asterisco (*) indica diferencia significativa con respecto al grupo eutiroideo (barra verde), $p \leq 0.05$, prueba t de Student.

MODELO

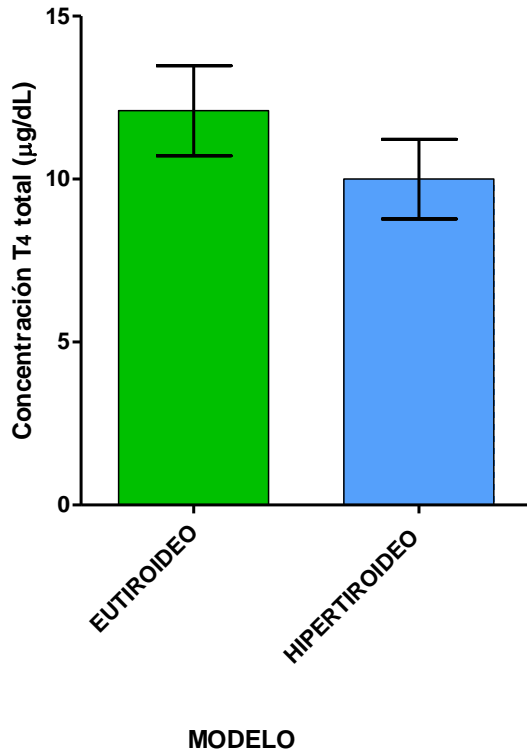


Figura 21.- Producción de un modelo hipertiroideo (T₄ total sérica). Seis semanas de tratamiento. Cuantificación de la concentración de T₄ total sérica mediante un EIA competitivo en animales de experimentación tras la administración de 75 µg/rata/día de levotiroxina vía oral durante 6 semanas (barra azul). Las barras representan la media ± EEM de 5 experimentos independientes, prueba t de Student, $p \leq 0.05$.

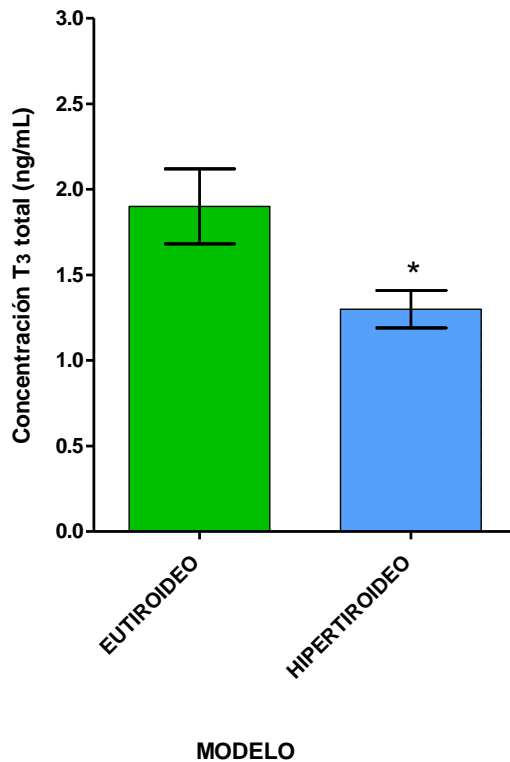


Figura 22.- Producción de un modelo hipertiroideo (T₃ total sérica). Seis semanas de tratamiento. Cuantificación de la concentración de T₃ total sérica mediante un EIA competitivo en animales de experimentación tras la administración de 75 µg/rata/día de levotiroxina vía oral durante 6 semanas (barra azul). Las barras representan la media ± EEM de 5 experimentos independientes. El asterisco (*) indica diferencia significativa con respecto al grupo hipo y eutiroideo (barra amarilla y verde respectivamente), $p \leq 0.05$, prueba t de Student.

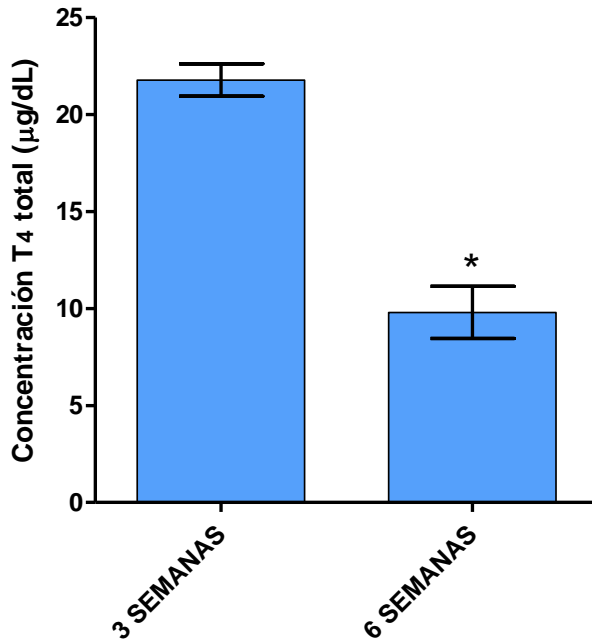


Figura 23.- Comparación de los dos periodos de administración para la producción de un modelo hipertiroideo. (T₄ total sérica) Cuantificación de la concentración de T₄ total sérica mediante un EIA competitivo en animales de experimentación tras la administración de 75 µg/rata/día de levotiroxina vía oral durante 3 y 6 semanas. Las barras representan la media ± EEM de 5 experimentos independientes. El asterisco (*) indica diferencia significativa entre ambos grupos, $p \leq 0.05$, prueba t de Student.

TIEMPO DE TRATAMIENTO

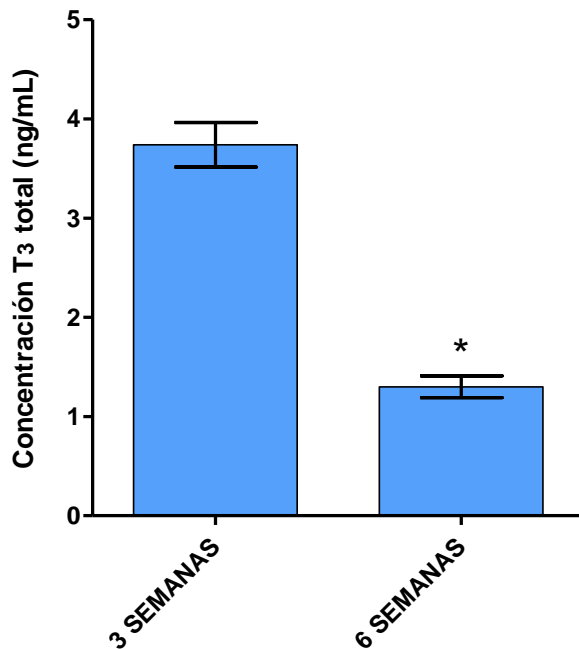


Figura 24.- Comparación de los dos periodos de administración para la producción de un modelo hipertiroideo. (T₃ total sérica) Cuantificación de la concentración de T₃ total sérica mediante un EIA competitivo en animales de experimentación tras la administración de 75 µg/rata/día de levotiroxina vía oral durante 3 y 6 semanas. Las barras representan la media ± EEM de 5 experimentos independientes.. El asterisco (*) indica diferencia significativa entre ambos grupos, $p \leq 0.05$, prueba t de Student.

TIEMPO DE TRATAMIENTO

8.4. CONFIRMACIÓN DEL MODELO

Para corroborar que los niveles de hormonas tiroideas permanecieran constantes y no se modificaron de manera significativa, posterior a la cirugía abdominal, y que esto pudiera cambiar nuestros modelos, se estudió un grupo de animales eutiroideos, a los cuales se les tomó una muestra de sangre total mediante una punción cardiaca una semana antes de realizar la cirugía abdominal según el protocolo ya establecido. Se realizó la cirugía abdominal, bajo las condiciones previamente establecidas y con el sacrificio a las 9 horas posteriores a la misma, se tomó otra muestra de sangre total mediante punción cardiaca y se cuantificaron los niveles de hormonas tiroideas séricas (T_3 y T_4 totales).

Los resultados mostraron diferencia estadísticamente significativa de los niveles de T_4 total después de realizada la cirugía abdominal con una disminución de la hormonas en un 65% (figura 25), sin embargo, los niveles de T_3 no mostraron diferencias estadísticamente significativas comparados con los valores normales antes de realizar la cirugía abdominal (figura 26).

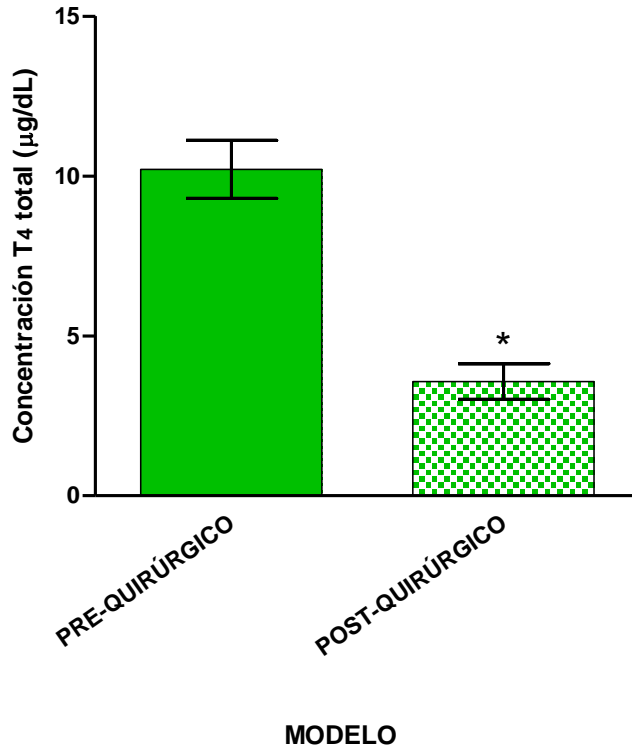


Figura 25.- Comportamiento de la concentración sérica de T₄ total después de una cirugía abdominal.

Cuantificación de la concentración de T₄ total sérica mediante un EIA competitivo en animales de experimentación antes y después de realizar una cirugía abdominal. Las barras representan la media \pm EEM de 5 experimentos independientes. El asterisco (*) indica diferencia significativa con respecto a la determinación antes de la cirugía, $p \leq 0.05$, prueba t de Student para datos pareados.

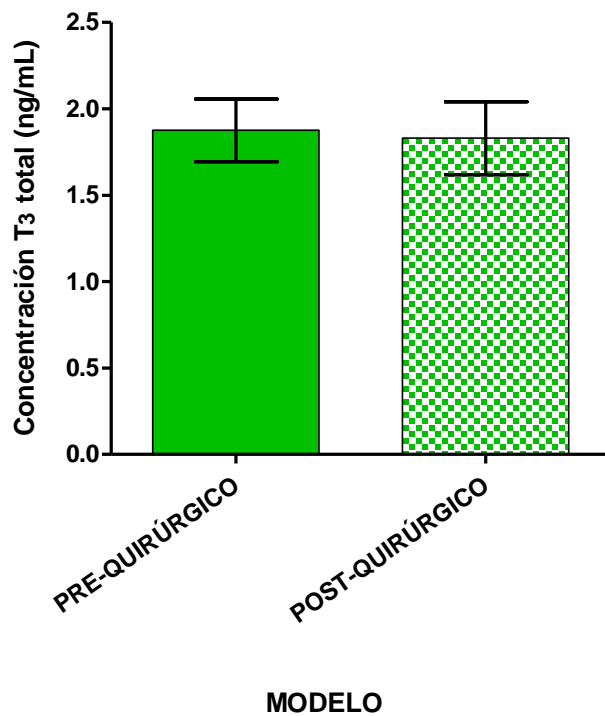


Figura 26.- Comportamiento de la concentración sérica de T₃ total después de una cirugía abdominal.

Cuantificación de la concentración de T₃ total sérica mediante un EIA competitivo en animales de experimentación antes y después de realizar una cirugía abdominal. Las barras representan la media \pm EEM de 5 experimentos independientes. Prueba t de Student para datos pareados, $p \leq 0.05$.

8.5. COMPARACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES DE METALOTIONEÍNAS DE LOS MODELOS TIROIDEOS EN CONDICIONES BASALES

Se trabajó con 3 modelos tiroideos (hipotiroideos, eutiroideos e hipertiroideos) por lo cual fue importante observar el comportamiento de los niveles de MTs en corazón en su estado basal, para ello, se midió la concentración de MT en los modelos tiroideos sin cirugía abdominal, observando que los niveles de MT en los 3 estados tiroideos (hipo, eu e hipertiroideo) se comportan de forma similar al no encontrar diferencias estadísticamente significativas entre ellos, tal como se representa en la figura 27.

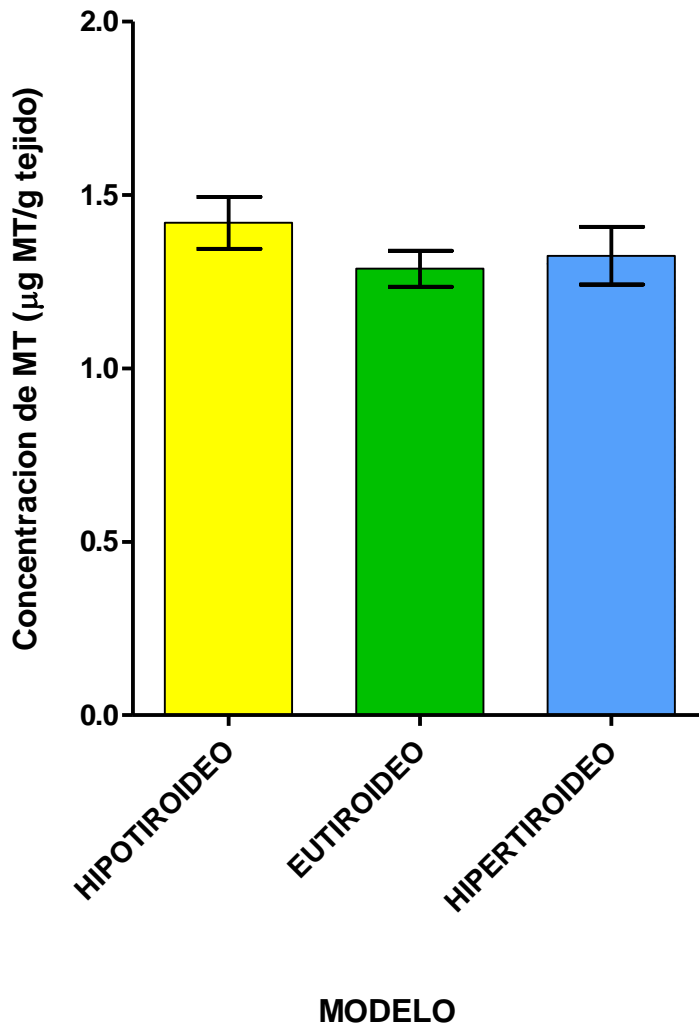


Figura 27.- Niveles basales de metalotioneínas cardiacas en corazón en los diferentes estados tiroideos. Cuantificación de la concentración de MT total en corazón, se realizó mediante el método de saturación con ^{109}Cd . Las barras representan la media \pm EEM de 5 experimentos independientes. ANOVA de una vía, y contraste con una F de Scheffé 5%.

8.6. EFECTO DE LAS HORMONAS TIROIDEAS EN LA INDUCCIÓN DE METALOTIONEÍNAS EN CORAZÓN MEDIANTE UNA CIRUGÍA ABDOMINAL EXPERIMENTAL

Con la finalidad de observar el efecto de las hormonas tiroideas en relación a la inducción de MT en corazón, se practicó una cirugía abdominal experimental en grupos de animales que presentaban diferentes estados tiroideos (hipotiroideos, eutiroideos e hipertiroideos), y posteriormente se procedió a cuantificar las metalotioneínas en este órgano.

Inicialmente, se buscó observar el comportamiento de los niveles de MT en un grupo eutiroideo después de practicar un proceso quirúrgico abdominal en los animales de experimentación. En la figura 28 se muestran los resultados de este protocolo, observando un incremento del 49% respecto al grupo control (grupo eutiroideo sin cirugía). Poniendo de evidencia que el proceso previamente descrito, induce la síntesis de MT en corazón de animales con una concentración normal de hormonas tiroideas.

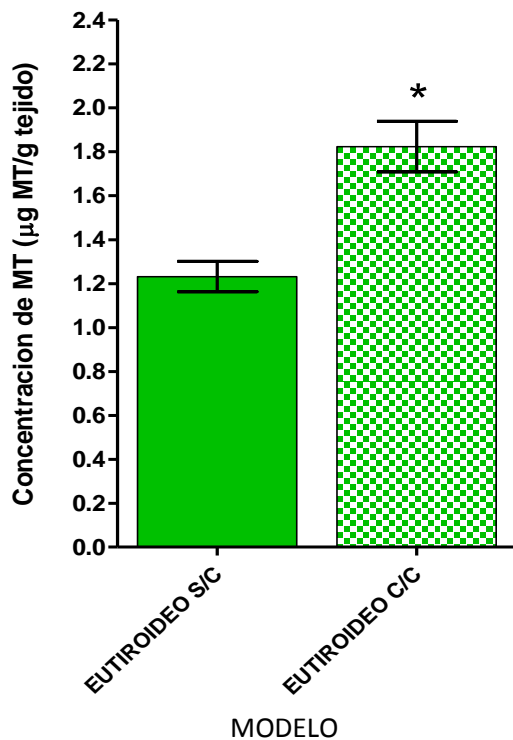


Figura 28.- Inducción de MT en corazón a causa de un proceso inflamatorio inducido por una cirugía abdominal. Cuantificación de la concentración de MT total en corazón, se realizó mediante el método de saturación con ^{109}Cd . Las barras representan la media \pm EEM de 5 experimentos independientes. El asterisco (*) indican la diferencia significativa con respecto al grupo control Eutiroideo S/C (S/C: sin cirugía), $p \leq 0.05$, prueba t de Student.

En la figura 29, se observa evidencia estadísticamente significativa que demuestra una disminución del 38% en los niveles de MT cardiaca cuando se realizó el mismo procedimiento quirúrgico en el grupo hipotiroideo en comparación con el grupo eutiroideo con cirugía, sin embargo, no existió diferencia con respecto al grupo eutiroideo sin cirugía, con lo cual se pone en evidencia el papel de T3 en la síntesis de MT a nivel cardiaco.

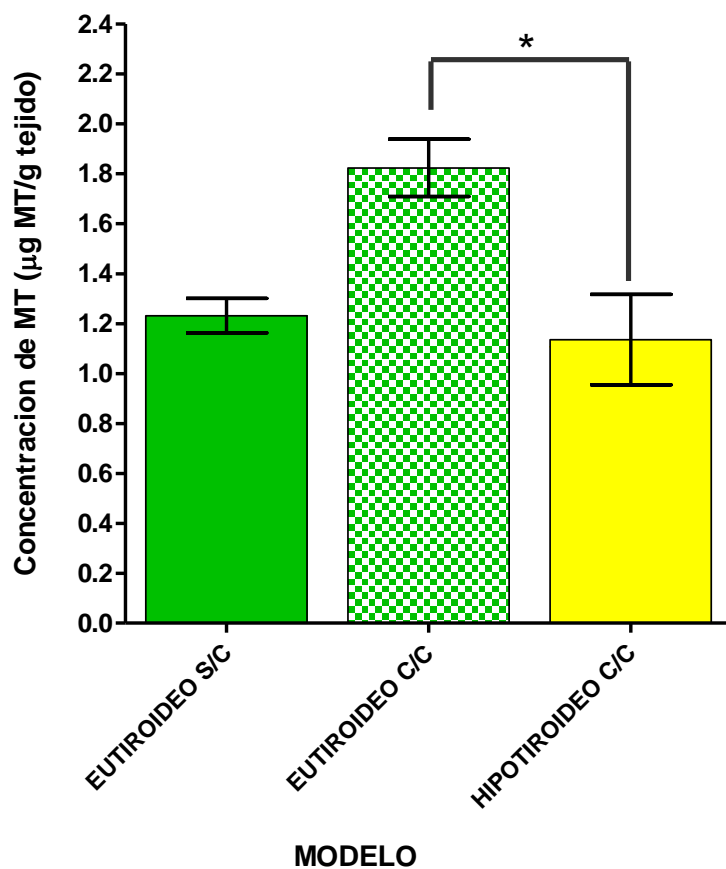


Figura 29.- Comportamiento de los niveles de MT cardiacas en un modelo hipotiroideo. Cuantificación de la concentración de MT total en corazón, se realizó mediante el método de saturación con ^{109}Cd . Las barras representan la media \pm EEM de 5 experimentos independientes. El asterisco (*) indican la diferencia significativa. ANOVA de una vía, y contraste con una F de Scheffe 5%. (S/C: sin cirugía, C/C: Con cirugía)

La concentración de MT en corazón en el grupo hipertiroideo con cirugía se comportó de forma similar al grupo eutiroides con el proceso inflamatorio, y comparado con el grupo eutiroides sin cirugía, se presentó un aumento del 54% siendo estadísticamente significativo (figura 30), dejando ver la participación coadyuvante de T3 en la inducción de la síntesis de esta proteína.

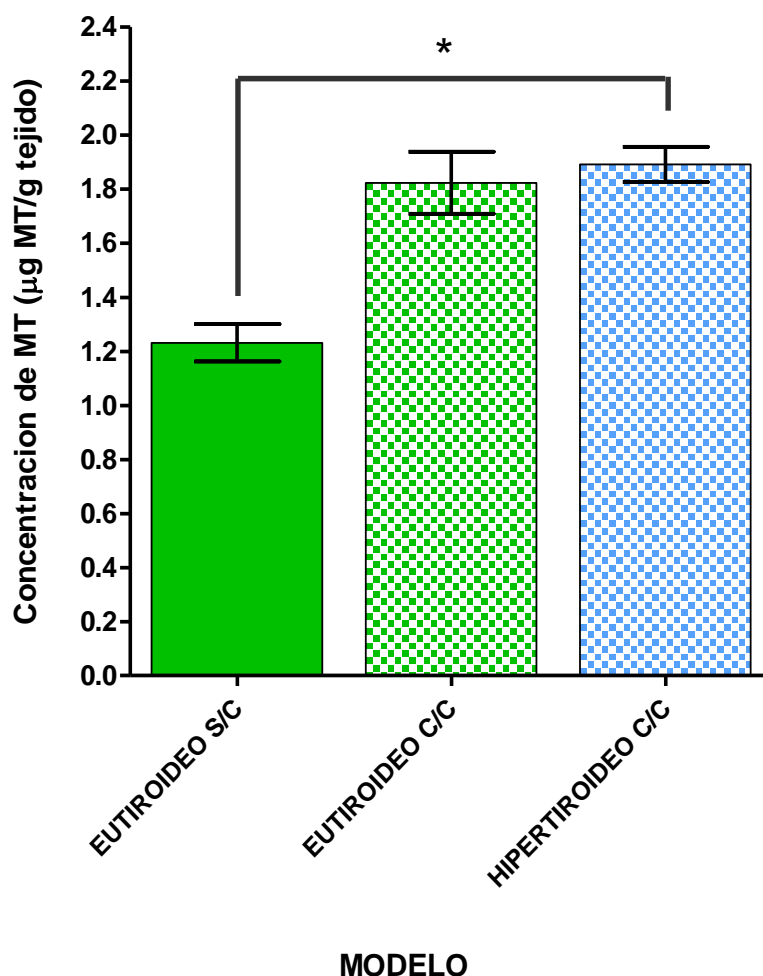


Figura 30.- Comportamiento de los niveles de MT cardiacas en un modelo hipertiroideo. Cuantificación de la concentración de MT total en corazón, se realizó mediante el método de saturación con ^{109}Cd . Las barras representan la media \pm EEM de 5 experimentos independientes. El asterisco (*) indican la diferencia significativa. ANOVA de una vía, y contraste con una F de Scheffé 5%. (S/C: sin cirugía, C/C: Con cirugía)

Aunado a esto, al comparar el grupo eutiroides e hipertiroideo, ambos con cirugía, con el grupo hipertiroideo con cirugía pero en presencia de un inhibidor de los receptores β -adrenérgicos, se encontró una disminución significativa de los niveles de MT del 36% respecto al grupo eutiroides y del 39% en relación al hipertiroideo (figura 31). Al contrastarlo con el grupo eutiroides sin cirugía no se presentaron diferencias significativas, indicando de esta forma, una participación importante de adrenalina en la inducción de la síntesis de MT cardíaca.

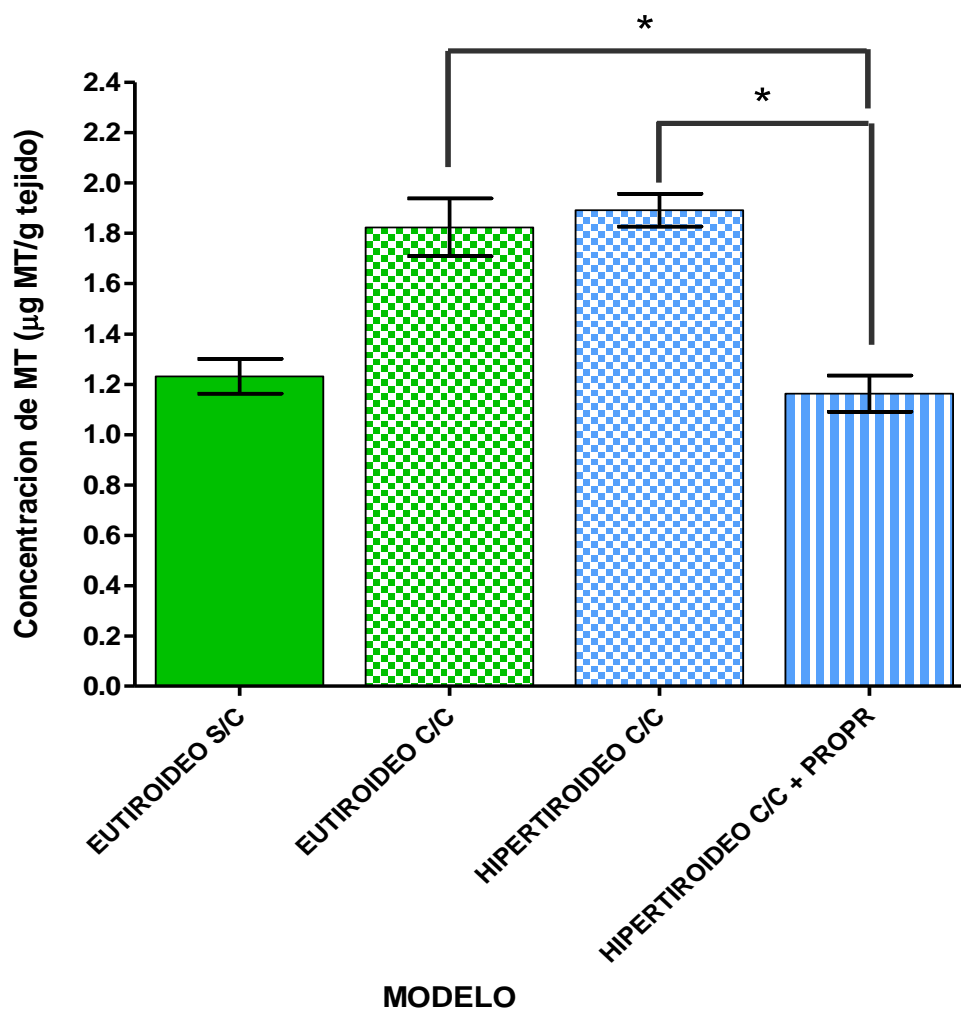


Figura 31.- Comportamiento de los niveles de MT cardíacas en un modelo hipertiroideo con un bloqueador de los receptores β -adrenérgicos. Cuantificación de la concentración de MT total en corazón, se realizó mediante el método de saturación con ^{109}Cd . Las barras representan la media \pm EEM de 5 experimentos independientes. El asterisco (*) indican la diferencia significativa. ANOVA de una vía, y contraste con una F de Scheffé 5%. (S/C: sin cirugía, C/C: Con cirugía)

9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En mamíferos se ha reportado que tras el proceso quirúrgico se desencadena una serie de cambios metabólicos, inflamatorios y neuroendocrinos a fin de restaurar la homeostasis alterada, en conjunto, este proceso es conocido como “Respuesta de estrés” (RE).^{5, 20, 22, 25, 117,118} Esta serie de cambios es en forma directa o indirecta responsable de la inducción de MT, ejemplo de ello es la liberación de citocinas inflamatorias o la activación del eje HPA y el sistema SMA activados mediante impulsos aferentes desde el área de lesión o trauma, lo cual da como resultado la liberación de hormonas inductoras de MT como glucocorticoides y catecolaminas;^{11, 12,15, 22, 24, 118} estas últimas llevan a cabo su actividad gracias a la unión con sus receptores adrenérgicos distribuidos en diversos órganos,^{46, 53, 56} como el corazón, donde se ha demostrado que su expresión se ve modificada por la presencia o ausencia de hormonas tiroideas.^{38, 119, 120}

Sobre esta base, se propuso desarrollar modelos tiroideos que presentaran una disminución (hipotiroideo) y un aumento (hipertiroideo) de hormonas tiroideas, para estudiar el efecto de las mismas como coadyuvantes de adrenalina en la síntesis de MT en corazón inducida por un proceso quirúrgico experimental en ratas. Para ellos se recurrió a la administración de fármacos que disminuyen o aumentan la concentración de hormonas tiroideas séricas.

Para producir un modelo hipotiroideo se administro metimazol, cuyo mecanismo de acción consiste en inhibir la TPO reduciendo así la yodación de TG, además impide el acoplamiento de los residuos MIT y DIT que darían lugar a la formación de T_3 y T_4 ; de esta forma se logra disminuir la secreción de estas hormonas.^{28, 29, 104} La bibliografía sugiere administrar metimazol en agua de beber durante 6 semanas,^{104, 105, 121} sin embargo, la vía de administración no asegura una ingesta homogénea del fármaco por parte de los animales, ya que se alojan más de uno por jaula y la cantidad de agua que bebe cada individuo puede variar; razón por la cual se decidió administrar el fármaco por vía oral que es una forma directa de administración y así se asegura la cantidad de fármaco que se

suministra. La administración de metimazol por vía oral fue de 4.5 mg/rata/día, la cual se ajustó de la propuesta en el agua de beber y tomando en cuenta la cantidad promedio que bebe una rata al día. Tras este esquema de administración, observamos una disminución marcada tanto de T_3 como de T_4 total, por la administración durante 3 y 6 semanas, sin encontrar diferencias estadísticamente significativas entre los 2 periodos de administración, esto se debe a que el antitiroideo se une a la TPO inactivándola, iniciando así la inhibición de la síntesis de la hormona, provocando el agotamiento de las reservas de tiroglobulina yodada a medida que la proteína se hidroliza y las hormonas se liberan. Por lo que únicamente cuando la hormona preformada dentro del coloide tiroideo se agota, las concentraciones de las hormonas circulantes comienzan a declinar, y una vez que esto sucede los niveles de T_3 y T_4 totales permanecerán disminuidas por tiempo que se administre el fármaco. ¹²²

Para lograr un estado hipertiroideo en los animales, la bibliografía reporta la administración vía subcutánea de 75 μg /rata/día de levotiroxina por un periodo de 6 semanas. ^{105, 121} Basado en que nuestro modelo implica un proceso inflamatorio para inducir la síntesis de MT en corazón, se decidió evitar la administración subcutánea, ya que al realizarse a diario puede conducir a una inflamación localizada en el sitio de administración y esto pudiera ser una variante a nuestro modelo, por lo cual la administración del fármaco se realizó vía oral y la dosis recomendada se conservó. El mecanismo de acción de este fármaco es bastante simple, ya que se trata de una hormona sintética (T_4) que al entrar a circulación es convertida a la hormona metabólicamente activa T_3 en los tejidos periféricos mediante un mecanismo de desyodación, que constituye la vía más importante de metabolización de las yodotironinas (T_4 y T_3) y está catalizada por unas enzimas denominadas desyodasas, de las que se conocen tres tipos: D1, D2, D3. Las diferentes yodotironinas son producidas a partir de la T_4 por la remoción secuencial y estereo-específica de los átomos de yodo que ellas contienen. La desyodación del anillo externo (ORD: outer-ring deiodination) de la T_4 genera T_3 , y por esta razón se conoce como la vía de activación. La vía ORD

está catalizada por la D1 (localizada principalmente en hígado, riñón y tiroides) y la D2, principal fuente de T₃ plasmática, (localizada en hipófisis, cerebro, células endoteliales, placenta, grasa parda, tiroides, músculo esquelético, piel y osteoblastos,^{105, 122} de esta forma, el organismo cuenta con dos fuentes de T₄ y T₃, una endógena por la producción normal de la misma y otra exógena por la administración de levotiroxina sintética y su consiguiente desyodación, las hormonas comenzaran a acumularse alcanzando un estado hipertiroideo, lo cual comprobamos con la administración por 3 semanas del tratamiento, donde se aprecia un aumento estadísticamente significativo de las concentraciones de T₃ como de T₄ total, comparado con los animales control eutiroideos tratados con el vehículo; sin embargo, cuando el periodo de administración se prolonga, los niveles de las hormonas disminuyen, en el caso de T₄ baja hasta un estado eutiroideo, y T₃ hasta alcanzar niveles menores a los normales sin llegar al estado hipotiroideo, como se observo con la administración durante 6 semanas. Este efecto se explica con el antecedente de que el organismo comienza a minimizar la producción de la hormona endógena al detectar altas concentraciones de T₃ circulante con un mecanismo de retroalimentación negativa. Este comienza cuando T₃ se une a los receptores TRβ₂ localizados en la hipófisis y en el hipotálamo, donde mediante un mecanismo de acción genómico, reprime la expresión y secreción de TSH por la hipófisis anterior y, más débilmente, la de TRH por el hipotálamo, y por consiguiente sobre la producción de hormonas tiroideas por parte de la glándula tiroides.^{28, 26, 31, 36, 42, 46} Concluyendo que 3 semanas es el periodo optimo de administración de levotiroxina a la dosis y vía de administración antes mencionadas, para ensayos posteriores.

Estudios previos refieren que después de un proceso quirúrgico, existe una disminución de las hormonas tiroideas por un efecto de retroalimentación negativa por parte del cortisol secretado durante la cirugía;^{9,10,11.14.16,19} nuestros datos mostraron una disminución de la concentración de T₄ total sérica, sin embargo, no así de T₃ total sérica, la cual permaneció en los niveles basales. No existen evidencias precisas que indique el curso exacto de los cambios de

concentración de las hormonas tiroideas a lo largo del proceso post-quirúrgico, únicamente, se hace mención de una disminución de las hormonas tiroideas durante la cirugía, y el retorno a sus niveles pre-operatorios determinado tiempo después ^{10, 11, 12, 22} ; sin embargo, se han reportado dos datos interesantes en estudios realizados en pacientes con diferentes cirugías; uno de ellos indica que TSH retorna a sus niveles basales 2 horas después de la intervención ²² y el segundo estudio demostró mantener los niveles de TSH en cifras normales sin evidencia clínica de enfermedad tiroidea¹⁰. Nuestro estudio se realizó en un modelo animal cuyo metabolismo es diferente al de un humano,^{126,127,128} razón por la cual se podría pensar en una diferencia en cuanto a los niveles hormonas post-quirúrgicos. Además, cabe pensar que, T4 al funcionar como reservorio de T3, puede ser desyodada para la conversión a T3 ante una disminución de la concentración de esta última, razón por la cual observamos este comportamiento en la concentraciones de las hormonas tiroideas después del proceso quirúrgico.

Las investigaciones en torno a la inducción de MT se han desarrollado en hígado, debido a que es el sitio anatómico que presenta una mayor producción de esta proteína y cuyas funciones se ha estudiado ampliamente, ^{62, 73, 108} entre ellas encontramos, la regulación de metales esenciales, detoxificación de metales pesados y regulaciones de la transcripción celular, por mencionar algunas; ^{72, 77, 81, 84, 85, 94,} interesantemente, y debido a su amplia gama de funciones, se ha dirigido la atención al estudio de tejidos como riñón, pulmón, páncreas, intestino, bazo, ovarios, cerebro y corazón; que también presentan una síntesis de esta proteína y en donde pueden tener un importante papel. ^{63, 80, 91} Recientemente en el laboratorio de Investigaciones Químico Clínicas (LIQC), se describió que en las etapas posteriores a un proceso quirúrgico abdominal en animales de experimentación, se observa un incremento significativo de las concentraciones de MTs en corazón.

En nuestro trabajo, elaboramos un protocolo para observar el comportamiento de MTs cardiacas en diferentes periodos tras realizar la cirugía abdominal y poder observar en qué momento se presenta el incremento máximo

en su síntesis en grupos de animales con un estado eutiroideo. Los resultados presentados evidenciaron un incremento paulatino de esta proteína en las etapas posteriores al proceso quirúrgico, cuyo comportamiento puede ser modulado por distintos factores, entre ellos hormonas y metales ^{80, 91, 108, 109}. Al parecer el primer aumento significativo de MTs cardíacas a las 9 horas pos-cirugía, puede ser debido a la intervención de citocinas y ciertas hormonas entre las que destaca adrenalina. La evidencia de la inducción de esta hormona en la síntesis de MTs se presentó por primera vez con los estudios de Brady en 1984, quien tras administrar adrenalina logro encontrar un aumento significativo de MTs hepáticas, y cuya observación se vio verificada al realizar una extirpación quirúrgica de la glándulas adrenales y observar una disminución de la proteína. ¹²⁴ Aunado a esto, en una investigación realizada en 2007 en el LIQC se encontró una correlación del incremento hepático de MT y adrenalina sérica después del proceso quirúrgico, donde se observa un incremento de esta hormona a partir de las 6 horas pos-cirugía y cuyo papel inductor de MT se conoce en otros tejidos, tal es el caso de la grasa parda, en donde se ha observado una inducción de la síntesis de MT en respuesta a la exposición al frío ; ^{102, 106} mientras que el segundo incremento se puede explicar por la inducción metálica puesto existe un aumento de zinc a nivel cardíaco en etapas posteriores a la cirugía ^{62, 109}. Con base en los resultados obtenidos, se estableció el periodo de 9 horas pos-cirugía para evaluar la inducción de MT a causa la sobreproducción de catecolaminas ^{3, 14,15,16,18, 22 ,25}, principalmente adrenalina, la cual ha demostrado ser inductor en la síntesis de MTs, al unirse a receptores anclados en la membrana y vía segundos mensajeros activan los factores nucleares transactivos que interactúan con elementos de control todavía no identificados ¹²³.

Cuando se realizo el procedimiento quirúrgico en el grupo de animales hipotiroideo, se produjo una disminución significativa de los niveles de MTs cardíacas, llegando inclusive a niveles basales, demostrando que, aunque esté presente adrenalina (inducida por la cirugía abdominal) hace falta la presencia de las hormonas tiroideas para llevar a cabo la inducción de la proteína. La

explicación a este fenómeno se basa en la estrecha relación que se presenta entre adrenalina y las hormonas tiroideas, específicamente T₃, ya que esta última regula la expresión de los receptores β -adrenérgicos en el corazón a los cuales se une adrenalina para llevar a cabo sus funciones.^{38, 39, 119, 120.}

T₃ es la hormona biológicamente activa y relevante en el miocito cardíaco, el cual no puede metabolizar T₄ ni T₃, por lo tanto, todos los efectos nucleares y los cambios en la expresión génica, se deben a los cambios en las concentraciones sanguíneas de T₃ libre, la cual entra a las células mediante un proceso de difusión facilitada, pasando directamente a núcleo sin unirse a ninguna otra proteína, una vez ahí, interacciona con moléculas fuertemente asociadas a la cromatina, conocidas como receptores nucleares de las hormonas tiroideas (RT), específicamente la isoforma RT alfa es la isoforma fijadora de T₃ en corazón, estos receptores son factores de transcripción nuclear dependientes del ligando que regula la velocidad de transcripción de genes blanco por medio de una unión de secuencias específicas de ácido desoxirribonucleico (ADN). La unión de estos receptores con T₃, en combinación con otros coactivadores, conduce a una activación transcripcional óptima.^{38, 39, 119, 120}

Cuando realizamos el mismo procedimiento quirúrgico en los animales hipertiroideos, observamos un ligero aumento de MTs con respecto al grupo eutiroideo con cirugía abdominal, sin embargo éste no fue significativo. Sin embargo, se puede observar la coexistencia de hormonas tiroideas y adrenalina para llevar a cabo la inducción de MTs en corazón, debido a que T₃ conduce a una activación transcripcional los receptores β -adrenérgicos, los cuales están acoplados a una proteína G_s. Al unirse adrenalina al receptor, se activa la proteína G al catalizar el intercambio de GDP unido G α inactiva de la proteína, por GTP y simultáneamente se disocia la subunidad G $\beta\gamma$ de la subunidad G α , esta última, interacciona con la enzima adenilato ciclasa, estimulando su actividad para aumentar la concentración intracelular de AMPc a partir de ATP. AMPc actúa como segundo mensajero activando a la enzima proteína cinasa A, y esta a su vez activa factores nucleares de acción trans localizados en el gen estructural de

metalotioneínas y que interactúan con elementos de control aun no descritos, y cuya finalidad es la producción de esta proteína (figura 32).

Un único complejo hormona-receptor es capaz de estimular el intercambio de GDP a GTP y la subsecuente disociación de muchas proteínas Gs, y por lo tanto su activación. Lo que proporciona una respuesta amplificada. Por lo tanto, se ha sugerido que un estado hipertiroideo se asemeja a un estado hiperadrenergico, sin embargo, no existe evidencia que sugiera que un exceso de hormonas tiroideas aumente la sensibilidad del corazón a una estimulación adrenérgica.³⁹ Esto se debe, a que la capacidad de desactivar vías de señalización es tan crítica como su capacidad de activarse. Por lo que la subunidad $G\alpha$ se inactiva gracias a su actividad GTPasa intrínseca que hidroliza el GTP unido, a GDP y P_i , esta hidrólisis es lenta y puede tener lugar en segundos o minutos, tras este proceso las subunidades $G\beta\gamma$ y $G\alpha$ se asocian nuevamente. EL complejo hormona-receptor, también debe desactivarse para evitar la activación continua de las proteínas G, esto se lleva a cabo mediante 2 mecanismos, el primero consiste en la disociación de la hormona del receptor, el cual regresa a su estado inicial inactivo, el segundo mecanismo involucra la desactivación del complejo hormona-receptor mediante la fosforilación de residuos serina y treonina del extremo carboxilo terminal, una β -arresistina se une al receptor fosforilado y disminuye su capacidad para activar las proteínas G, este ultimo mecanismo, contribuye a la desensibilización del receptor sometido a una exposición prolongada a adrenalina.

Una vez demostrada la necesidad de las hormonas tiroideas para la síntesis de metalotioneínas, y con el fin de reafirmar el efecto coadyuvante de estas hormonas con adrenalina; se trabajó con un grupo de animales hipertiroideos, los cuales recibieron la administración de propranolol antes de realizar el proceso quirúrgico y el sacrificio. El mecanismo de acción de este fármaco consiste en bloquear los receptores β -adrenérgicos impidiendo que adrenalina se una a ellos, evitando así sus acciones fisiológicas¹²⁵. Con este protocolo eliminamos el efecto inductor de adrenalina sobre la síntesis de MT cardiaca, mas no del efecto potenciador de la expresión de los receptores por

parte de las hormonas tiroideas. Los resultados obtenidos mostraron que se presentó una disminución marcada de los niveles de MT hasta el punto de llegar a los niveles basales, es decir, en ausencia de una cirugía abdominal. Tras un proceso inflamatorio, se liberan diferentes sustancias, las cuales en hígado han sido ampliamente estudiados como inductores de la síntesis de MTs ya sea de forma directa o indirecta sobre el promotor del gen-MT, cuyos mecanismo de inducción han sido descritos ampliamente, principalmente citocinas, ciertas hormonas liberadas por la activación de del eje HPA, inclusive especies reactivas de oxígeno formadas durante la respuesta inflamatorio.^{91, 93, 99, 100} Sin embargo, estos datos muestran que para inducir la síntesis de MT en corazón se requiere de la acción de adrenalina coadyuvada por T₃, además, indicando que adrenalina es una hormona que constituye uno de los inductores principales de MT en corazón, puesto que, cuando se bloqueó su acción no se presento un incrementó en la síntesis de la proteína en este órgano.

Se ha descrito ampliamente el papel que puede llegar a tener MT en diferentes órganos. Se conoce que MT es una proteína que puede conferir cardioprotección;^{57, 98, 110, 111} a fin de entender el mecanismo molecular de dicho efecto, en 2009 Xue y colaboradores, desarrollaron una línea células cardiacas que sobre expresa MT-2A y evaluaron su propiedad antioxidante, observando una reducción marcada de las especies reactivas de oxígeno cuando fueron expuestas a peróxido de hidrogeno y sometidas a condiciones de hipoxia/reoxigenación, con lo que demostraron que la sobreproducción de esta proteína incrementa la protección oxidativa; y dado que durante un proceso inflamatorio se producen especies reactivas de oxigeno (ROS), secundarias a la inflamación, se puede pensar que un aumento de MT cardiacas hace frente a las ROS evitando que produzcan un daño en este órgano.^{57, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116}

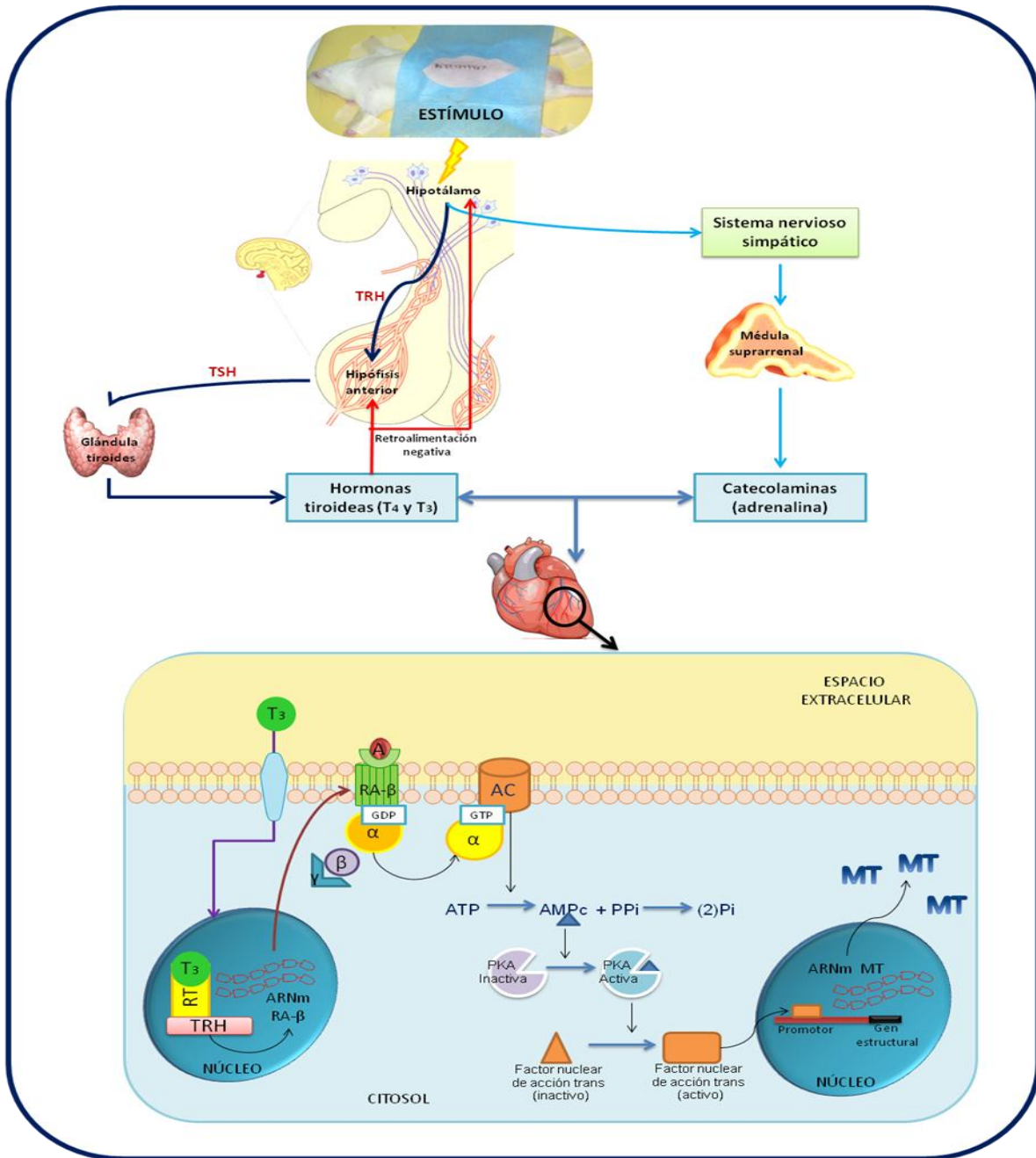


Figura 32. Propuesta de una representación esquemática de la vía de inducción de metalotioneínas cardíacas durante un proceso inflamatorio no infeccioso.

TRH: Hormona liberadora de tirotropina; TSH: Hormona estimulante de tiroides; T₃: Triyodotironina; T₄: Tetrayodotironina; RT: Receptores nucleares de hormonas tiroideas; TRE: Elementos de respuesta a hormonas tiroideas; ARNm: ARN mensajero; RA-β: Receptor adrenérgico beta; A: Adrenalina; GDP: Guanosina difosfato; GTP: Guanosina trifosfato; α,β,γ: Subunidades de la proteína G; AC: Adenilciclasa; ATP: Adenosina trifosfato; AMPc: Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico; PPI: Pirofosfato inorgánico; Pi: Ortofosfato inorgánico; PKA: Proteína cinasa A; MT: Metalotioneína.

10. CONCLUSIONES

- Una cirugía abdominal aumenta la síntesis de MT en corazón desde las 9 horas, debido principalmente al incremento en la secreción de adrenalina, como se demostró en un estudio previo realizado en el LIQC; con un segundo incremento a las 16 horas presumiblemente provocado por un aumento de Zn.
- La administración de 4.5 mg/rata/día de metimazol durante 3 semanas, produce un estado hipotiroideo en animales de experimentación.
- La administración de 75 µg/rata/día de levotiroxina durante 3 semanas, produce un estado hipertiroideo en animales de experimentación
- Un proceso inflamatorio inducido por una cirugía experimental en animales con un estado hipotiroideo no provocó la síntesis de MT en corazón, indicando un papel importante de las hormonas tiroideas en la síntesis de MT cardíacas. Esta observación se refuerza con la inducción de MT en el grupo hipertiroideo alcanzando niveles similares a un estado eutiroideo.
- El bloqueo de los receptores β -adrenérgicos mostró una disminución de los niveles de MT en corazón cuando se realizó una cirugía experimental en animales con un estado hipertiroideo, sugiriendo que adrenalina es un inductor importante de la síntesis de MT en este órgano.
- La hormona tiroidea T3, si tienen un efecto coadyuvante de las catecolaminas en la inducción de metalotioneínas en corazón de rata inducidas por una cirugía abdominal, más no así, un efecto potenciador.

11. PERSPECTIVAS

- Caracterizar los modelos tiroideos, para conocer el curso del cambio de concentración de las hormonas tiroideas en la “Respuesta al estrés” producida en las etapas posteriores a una cirugía experimental en rata.
- Evaluar la expresión de los receptores β -adrenérgicos en corazón en respuesta a los cambios en la concentración de las hormonas tiroideas séricas, a fin de conocer la magnitud de la influencia de estas hormonas sobre adrenalina y por lo tanto sobre la concentración de metalotioneínas en este órgano.
- Estudiar otros posibles inductores de metalotioneínas en corazón, los cuales se vean modificados por los cambios producidos en la “Respuesta al estrés”
- Cuantificar la concentración de Zn a las 16 horas post-cirugía para correlacionar el incremento en la concentración de metalotioneínas en corazón con el aumento de este metal.

12. BIBLIOGRAFÍA

- 1 Guarner V. Apuntes para una historia de la respuesta metabólica a la cirugía. Acta médica grupo Ángeles. 2009; 7 (2): 118-123
- 2 Flohé S, Flohé BS, schade UF, Waydhas C. Immune response of severely injured patients-influence of surgery intervention and therapeutic impact. Langenbecks Arch Surg. 2007; 392:639-648
- 3 Rodríguez ND, Rodrpiguez AM, Alfonso ALE, Castellanos PE, Reyes MLM, Quintana RM. Respuesta metabólica al trauma. Revista cubana de medicina militar. 2012; 41 (1): 96-104
- 4 Alfonso ALE, Nodas SCL, Reyes MML, Rodríguez AM. Metabolismo e inmunología en los traumatismos. Rev Cubana Med Milit. 1999; 28 (1): 55-66
- 5 Hasenboehler E, Williams A, Leinhase I, Morgan JS, Smith RW, Moore EE, Stahel FP. Metabolic changes after polytrauma: an imperative for early nutritional support. World Journal of Emergency Surgery 2006, 1:29
- 6 Acedo DPMV. Estudio de la respuesta al estrés quirurgico bajo dos tecnicas anestésicas en la cirugía oncológica colo-rectal. (trabajo para obtener el grado de Doctor) 2002. Universidad Computense de Madrid
- 7 González de Rivera y Revuelta JL. Estrés, homeostasis y enfermedad. Psicología Medica. 1994:1-7
- 8 Valero ZMA, León SM. DP Cuthbertson. Post-shock metabolic response.Nutr Hosp. 2001; 16 (5): 175-182
- 9 Choileain NN, Redmond PH. Cell response to surgery. Arch Surg. 2006; 141: 1132-1140
- 10 Ramírez MS, Gutiérrez VIR, Domínguez MA, Barba FC. Respuesta metabólica al trauma. MEDICRIT. 2008; 5 (4): 130-133
- 11 Burton D, Nicholson G, Hall G. Endocrine and metabolic response to surgery. Continuin education in anesthesia. 2004; 4 (5):144-147
- 12 Weissman C. The metabolic response to stress: an overview and update. Anesthesiology. 1990; 73:308-327
- 13 Cuacuas CV, Escobar MM, Torres MJL, Hernández AE. Trauma de alta energía y su respuesta inflamatoria sistémica. Medigraphic. 2008; 4 (1): 39-50
- 14 Gutierrez T, Hornigold R, Pearce a. The systemic responte to surgery. Elsevier Surgery. 2010; 29 (2): 93-96

- 15 Brambila E, Aburto V. Metabolismo del Zinc y las Metalotioneínas en los procesos quirúrgicos. *Mensaje bioquímico* 2012; 36: 39-50
- 16 Ben-Menachem E, James CD. Hormonal and metabolic response to trauma. *Anesthesia and intensive care medicine*. 2011; 12 (9): 409-411
- 17 Acedo DPMV. Estudio de la respuesta al estrés quirúrgico bajo dos técnicas anestésicas en la cirugía oncológica colo-rectal. (trabajo para obtener el grado de Doctor) 2002. Universidad Complutense de Madrid
- 18 Möstl E, Palme R. Hormones as indicators of stress. *Domestic animal endocrinology*. 2002; 23: 67-74
- 19 Axelrod J, Reisine T. Stress hormones: their interaction and regulation. *Science*. 1984; 224: 452-459
- 20 Everly G. *Physiology of stress*. Jones and Bartlett Publishers. Chapter 2: 34-48
- 21 Mitra A. Diabetes and stress: A review. *Ethno-Med*. 2008; 2 (2): 131-135
- 22 Desborough JP. The stress response to trauma and surgery. *Br. J. Anaesth* 2000; 85:109-117
- 23 Gibson CS, Hartman AD, Schenck MJ. The endocrine response to critical illness: Update and implications for emergency medicine. *Emerg Med Clin N An*. 2005; 23:909-929
- 24 Márquez VC. Diferencias individuales en la respuesta endocrina al estrés: Influencia de los rasgos de la conducta (trabajo para obtener el grado de Doctor en Bioquímica) 2006. Universidad Autónoma de Barcelona
- 25 Romero ML, Butler KL. Endocrinology of stress. *IJCP*. 2007; 20: 89-95
- 26 Perez OGE. Determinación del perfil tiroideo (TSH, T4 libre, T4 total y T3 total) en mujeres embarazadas que cursan el primer trimestre de gestación y mujeres no embarazadas en edad fértil, que acuden al instituto en el periodo de Junio a Diciembre del 2008 (trabajo para obtener el grado de licenciatura en bioquímica) 2009. Universidad Mayor de San Andrés La Paz Bolivia.
- 27 Perinetti HA, Borremans CG, Patología tiroidea. Instituto de patología de la tiroidea. 2000. Universidad nacional de Cuyo. Argentina
- 28 Pineda RM. Establecimiento de un modelo de hipotiroidismo perinatal no farmacológico (trabajo para obtener el grado de Maestro en Ciencias Químico-biológicas) 2009. Instituto Politécnico Nacional. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas México D.F

- 29 Flórez J. Farmacología humana. Capitulo 53: Hormonas tiroideas y fármacos antitiroideos. 5a. Edicion. Editorial ESEVIER. 2008. 1039-1049
- 30 Solís JC, Orozco A, García C, Robles-Osorio L, Valverde C. Bioactividad de las hormonas tiroideas. Importancia clínica de los transportadores de membrana, de las desyodasas y los receptores nucleares. Rev Invest Clin 2011; 63 (3): 287-308
- 31 Sherwood.L Fisiologia humana. De las células a los sistemas. Capitulo 19: Glandulas endocrinas periféricas. 7a. Edicion. Editorial Cengage Learning. 2011. 690-739
- 32 Segura AS, Jiménez QJ, Morreales de Escobar G. Enfermedades frecuentes del tiroides en la infancia. Rev Pediatr Aten Primaria. 2009; 11 (16): 173-204
- 33 Ramos RS. Interacción entre hormonas tiroideas y el sistema IGFs/IGFBPs: Mecanismos moleculares (trabajo para obtener el grado de Doctor en Farmacia). 1999. Universidad Computense de Mdrid.
- 34 García de Francisco S, Taboada TM, Álvarez VP. Disfuncion tiroidea subclínica. MEDIFARM. 2001; 11 (5): 253-264
- 35 Ortiz PL, Esperrella M, Hormonas tiroideas y transtornos afectivos.Revista Colombiana de Psiquiatria. 2004; 32 (1): 98-107
- 36 Montero PA. Modulación de la neurogénesis y de la conducta por hormonas tiroideas en ratas adultas (trabajo para obtener el grado de doctor en bioquimica) 2006. Universidad Autonoma de Madrid
- 37 Bernal J. Síndrome de resistencia a las hormonas tiroideas. Endocrinol Nutr. 2011; 58 (4): 185-196
- 38 Mantilla D, Echin ML, Perel C. Hipertiroidismo y el sistema cardiovascular. Bases fisiologicas y su manifestacion clinica. Insuficiencia cardiaca. 2010; 5 (4): 157-177
- 39 Klein I, Danzi S. Thyroid disease and the heart. Circulation. 2007; 116: 1725-1735
- 40 Fazio S, Palmieri EA, Lambardi G, Biondi B. Effects of thyroid hormone on the cardiovascular system. The endocrine Society. 2004: 31-50
- 41 Jabn AG, Navas P,Hapon MB. Efecto de las hormonas tiroideas sobre la función ovárica. SAEGR. 2010; 17 (2): 11-17
- 42 Velasques BS. Manejo perioperatorio del paciente para cirugia de tiroides. Revista mexicana de anestesiología 2007; 30 (1): S185-S192

- 43 Williams TL, Lefkowitz JR, Watanabe MA, Hathaway RD, Besch RH. Thyroid hormone regulation of β -adrenergic receptors number. *The journal of biological chemistry*. 1977; 252 (8): 2787-2789
- 44 Collins S, Bolanowski AM, Caron GM, Lefkowitz JR. Genetic regulation of β -adrenergic receptors. *Annu Rev Physiol*. 1989; 51: 203-215
- 45 Peaston BT, Weinkove C. Determinacion de catecolaminas y sus metabolitos. *Acta Bioquimica Clin Latinoam*. 2004; 38 (2): 225-24
- 46 Brandan NC, Llanos IC. Hormonas catecolaminicas adrenales. 2010. Universidad Nacional de Nordeste. Argentina
- 47 Kvetnasky R, Sabban EL, Palkovits M. Catecholamines systems ins stress: Structural and molecular genetic approcches. *Physiol. Rev*. 2009; 80: 535-606.
- 48 Steel A, Bihari D. Choice of catecholamine: does it matter? *Current Opinion in Critical Care*. 2000, 6: 347-353
- 49 Mersmann JH. Overview of the effects of beta-adrenergic rceptors agonists on animal growth including mechanims of action. *J Anim Sci*. 1988; 76:160-172
- 50 Kennedy B, Ziegler GM. Cardiac epinephrine synthesis. Regulation by glucocorticoid. *Journal of the american heart association*. 1991. 84(2): 891-895
- 51 Reid GS, Bernier JN, Perry FS. The adrenergic stress response in fish: control of catecholamine storage and release. Elsevier Science Inc. 1998; C (120): 1-27
- 52 Nagatsu T. The catecholamine system in health and disease: Relation to tyrosine 3-monooxygenase and other catecholamine-synthesizing enzymes. *Proc.Jpn. Acad*. 2006; 82 (10): 388-415
- 53 Lefkowitz JR, Rockman AH, Koch JW. Catecholamines, cardiac β -adrenergic receptors, and heart failure. *Ahajournals*. 2000; 101: 1634-1637
- 54 Strosber AS. Structure, function, and regulationof adrenergic receptors. *Protein science*. 1993; 2: 1198-1209
- 55 O'Dowd FB, Lefkowitz JR, Caron GM. Structure of the adrenergic and relation receptors. *Ann Rev Neurosci*. 1989; 12: 67-83
- 56 Tacchi HH. Receptores β -adrenérgicos a insuficiencia. *Rev Insuf cardiaca* 2008; 3 (2): 96-99
- 57 Tota B, Cerra CM, Gattuso A. Catecholamines, cardiac natriuretic peptides and chromogranin: A evolution and physiopathology of a "whip-brake"

- system of the endocrine heart. The journal experimental biology. 2010; 213: 3081-3103
- 58 Eisenhofer G, Kopin IJ, Goldstein D. Catecholamines metabolism: A contemporary view with implications for physiology and medicine. *Pharmacological reviews*. 2004; 56 (3): 331-349
- 59 Kopin IJ. Metabolism of the catecholamines. *Z.klin.Chem*. 1964; 2(4): 115-123
- 60 López-Sendón J, Swedberg K, McMurray J, Tamargo J, Maggioni PA, Dargie H, Tendera M, Waagstein F, Kjekshus J, Lechat P, Torp-Pedersen C. Documento de consenso de los expertos sobre bloqueadores de los receptores β -adrenergicos. *Rev Esp Cardiol*. 2005; 58 (1): 65-90
- 61 Skeberdis AV. Structure and function of β 3-adrenergic receptors. *Medicina Kaunas*. 2004; 40(5): 407-413
- 62 Brambila E, Muñoz Sánchez JL, Albores Arnulfo, Waalkes M. Early effects of surgery on zinc and metallothioneins levels in female rats. *Biological Trace Element Research*. 1999; 70:173-182
- 63 Carrasco Trancoso J. Regulación de las metalotioneínas durante el estrés y la inflamación, y su influencia durante la respuesta inflamatoria (trabajo para obtener el grado de Doctor en Biología) 2000. Universidad Autónoma de Barcelona.
- 64 Kägi JH, Vallee BL. Metallothionein: A cadmium- and zinc-containing protein from equine renal cortex. *Journal of Biological Chemistry*. 1960; 235: 3460-3465 Klassen
- 65 DC, Liu J, Choudhuri S. Metallothionein: An intracellular protein to protect against cadmium toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1999; 39: 267-269
- 66 Kojima Y, Berger C, Vallee LB, Kagi HRJ. Amino-acid sequence of equine renal metallothionein-IB. *Proc Natl Acad Sci*. 1976; 73 (10): 3413-3417
- 67 Hijova E. Metallothioneins and zinc: their functions and interactions. *Bratisl Lek Listy*. 2004; 105: 230-234
- 68 Tsibulova GM. Metaloproteínas y metalómica: Mecanismos de respuesta a metales en diversos organismos modelo, sus interacciones moleculares y su integración en redes metabólicas (trabajo para obtener el grado de Doctora en Biotecnología) 2012. Universidad de Barcelona.
- 69 Margoshes M, Vallee LB. A cadmium protein from quine kidney cortex. *J Amer Chem Soc USA*. 1957; 79: 4813-4814.
- 70 Thirumoorthy N, Shyam Sunder A, Manisenthil Kumar KT, Senthil Kumar M, Ganesh GNK, Chatterjee M. A Review of Metallothionein Isoforms and

- their Role in Pathophysiology. WJSO 2011; 9 (54):1-7.
- 71 Vasak M, Meloni G. Chemistry and biology of mammalian metallothioneins. *J Biol Inorg Chem*. 2011; 16: 1067-1078
- 72 Nordberg M. Nordberg GF. Metallothioneins: Historical Development and overview. *Met Ions Life Sci*. 2009; 5:1-29
- 73 Cherian MG, Kang YJ. Metallothionein and liver cell regeneration. *Society for Experimental Biology and Medicine*. 2006; 138-143
- 74 Brambila E; Gonzalez E. Las metalotioneínas: ¿Cestos de basura o proteínas clave en el metabolismo celular? *Elementos* 1993; 3 (19): 3-9.
- 75 Duncan REK, Ngu TT, Chan J, Salgado TM, Merrifield EM Stillman JM. Peptide Folding, Metal-Binding Mechanisms, and Binding Site Structures in Metallothioneins. *Exp Biol Med* 2006; 231:1488–1499
- 76 Kang JY. Metallothionein redox cycle and function. *Exp Biol Med*. 2006; 231:1459–1467
- 77 Thirumorthy N, Manisenthil Kumar KT, Shyam Sundar A, Panayappan L, Chatterjee M. Metallothionein: An overview. *World J Gastroenterol* 2007; 13(7): 993-996.
- 78 Klassen DC, Liu J, Choudhuri S. Metallothionein: An intracellular protein to protect against cadmium toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1999; 39: 267-269
- 79 Capdevila M, Atrian S. Metallothionein protein evolution: a miniassay. *J Biol Inorg Chem*. 2011; 16: 977-989
- 80 Sabolić I, Breljak D, Škarica M, Herak-Kramberger CM. Role of metallothionein in cadmium traffic and toxicity in kidneys and other mammals organs. *Biomaterials*. 2010; 23: 897-926.
- 81 Maret W. Redox biochemistry of mammalian metallothioneins. *J Biol Inorg Chem*. 2011 16:1079-1086
- 82 Vasak M, Meloni G. Metallothionein structure and reactivity. *Metallothionein biochemistry and pathology*.
- 83 Maret W. Fluorescent probes for the structure and function of metallothionein. *Journal of chromatography B*. 2009; 877:3378-3383
- 84 Carpenè E, Andreani G, Isani G. Metallothioneins functions and structural characteristics. *Jtemb*. 2007; 21: 35-39
- 85 Kägi JH, Schäffer A. Biochemistry of metallothionein. *American Chemical*

- Society. 1988; 27 (23): 8509-8515
- 86 Ribas OB. Metalotioneína y algunos elementos minerales como bioindicadores en toxicología y clínica.
- 87 Bell GS, Vallee BL. The metallothionein/thionein system: An oxidoreductive metabolic zinc link. *ChemBioChem*. 2009; 10:55-62
- 88 Binz, P.A. and Kagi, J.H.R. (1999) Metallothionein: molecular evolution and classification. In *Metallothionein IV* (Klaassen, C., ed.), pp. 7-13. Birkhäuser Verlag, Basel, Switzerland-
- 89 Capdevila M, Atrian S. Metallothionein protein evolution: a miniassay. *J Biol Inorg Chem*. 2011;16: 977-989
- 90 Hidalgo J. Respuesta del sistema nervioso central a lesiones traumáticas: papel de las proteínas antioxidantes metalotioneínas. 2004: 2(5):1-12
- 91 Scott Lopez EH. Las metalotioneínas y el estrés quirúrgico. *REB* 2007; 26 (2) 67-72
- 92 García.Rico L, Robles-Buergueño MR, Valenzuela-Soto E. Las metalotioneínas y su relación con la toxicidad del cadmio en los mamíferos. *Rev Int Contam Ambient*. 1999; 15(2): 113-120
- 93 Coyle P, Philcox JC, Carey LC, Rofe AM. Metallothionein: The multipurpose protein. *CMLS Cell Mol Life Sci*. 2002; 59:627-647
- 94 Guirola TM. Metaloproteínas y metalómica: mecanismos de respuesta a metales en diversos organismos modelo, sus interacciones moleculares y su integración en redes metabólicas (trabajo para obtener el grado de Doctor en Biotecnología) 2012. Universidad de Barcelona
- 95 Swindell RW. Metallothionein and the biology of ageing. *Ageing Research Reviews*. 2011;10:132-145
- 96 Perez ME. Clonaje, expresión y caracterización estructural de una nueva metalotioneína en crustáceos, a partir de la langosta *Panulirus argus*. Estudios de su función en la mitocondria (Tesis para obtener el título de Doctor en Ciencias Químicas) 2005. Universidad de Castilla-La Mancha
- 97 Xue X, Liu Q, Cai L, Wang Z, Feng W. Stable overexpression of human metallothionein-IIA in a heart-derived cell line confers oxidative protection. *Toxicology letters*. 2009; 188:70-76
- 98 Petering DH, Zhu J, Krezoski S, Meeusen J, Kiekenbush C, Krull S, Specher T, Dughish M. Apo-metallothionein emerges as a major player in the cellular activities of metallothionein. *Society for Experimental Biology*

- and Medicine. 2006; 1528-1534
- 99 Oh SH, Deagen JT, Whanger PD, Weswing PH. Biological function of metallothionein. V. Its induction in rat by various stresses. APS. 1978;E282-E285
 - 100 Deagen TJ, Whanger DP, Weswing HP. Biological function of metallothioneins. V. Its induction in rat by various stresses. 1977; 4597: E28-E28
 - 101 Inoue K, Takano H, Shimada A, Wada E, Yanagisawa R, Sakurai M, Satoh M, Yoshikawa T. Role of metallothionein in coagulatory disturbance and systemic inflammation induced by lipopolysaccharide in mice. FASEB Journal. 2005; 1-22
 - 102 Beattie JH, Wood AM, Trayhurn P, Jasani B, Vicent A, McCormack G, West AK. Metallothionein is expressed in adipocytes of brown fat and is induced by catecholamines and zinc. Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol. 2000; 278:R1082-R1089
 - 103 Van Gool J, Boers W, Sala M, Ladiges NCJJ. Glucocorticoids and catecholamines as mediators of acute-phase proteins, especially rat α -macroglobulin. Biochem J. 1984; 220: 125-132
 - 104 Prieto I, Segarra AB, Arechaga G, Martínez JM, Ramírez-Expósito MJ, Vargas F, Alba F, Ramírez M. Efecto del hipotiroidismo sobre la actividad amilopeptidasa en plasma de ratas. Endocrinología y nutrición. 2001; 48(7): 193-197
 - 105 Cruz Guerrero AH. Efectos de la activación del PPAR α en el hipertiroidismo y en la hipertensión experimental en ratas (trabajo para obtener el grado de Doctor en Fisiología) 2010. Universidad de Granada
 - 106 Scott LE. Efecto de las hormonas adrenalina, noradrenalina, corticosterona y glucagón en la inducción de metalotioneínas hepáticas durante un proceso quirúrgico abdominal en rata. (para obtener el grado de Maestro en Ciencias Químicas) 2007. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
 - 107 Eaton LD, Toal FB. Evaluation of the Cd/Hemoglobin affinity assay for the rapid determination of metallothionein in biological tissues. Toxicology and pharmacology. 1982; 66: 134-142
 - 108 Hidalgo J, Giralt M, Garvey SJ, Aemario A. Physiological role of glucocorticoid on rat serum and liver metallothionein in basal and stress conditions. Am J Physiol. 1988. 254: E71-E78
 - 109 Aburto LV. Efecto de un proceso inflamatorio inducido por cirugía sobre los niveles de mRNA mensajero de los transportadores de zinc en hígado.

- Trabajo para obtener el grado de Maestra en Ciencias Químicas. 2012. Benemerita Universidad Autónoma de Puebla.
- 110 Xue X, Liu Q, Cai L, Wang Z, Feng W. Stable overexpression of human metallothionein-IIA in a heart-derived cell line confers oxidative protection. *Toxicology letters*. 2009; 188:70-76
- 111 Dhalla SN, Adameova A, Kaur M. Role of catecholamines oxidation in sudden cardiac death. *Fundamental and clinical pharmacology*. 2010; 24: 539-546
- 112 Jing L, Wu Y, Wu J, Zhao J, Zuo D, Peng S. Peroxiredpdins are involve in metallothionein protection from doxorubicin cardiotoxicity. *European Journal of Pharmacology*. 2011; 659: 224-232
- 113 Ruttkay-Nedecky B, Nejdil L, Gumilee J, Zitka O, Masarik M, Eckshlager T, Stiborova M, Adam V, Kizek R. The role of metallothionein in oxidative stress. *Int J Mol Sci*. 2013; 14: 6045- 6066
- 114 Philippi AJ, Klyach AE, Kenny KP, Eskay AM, Gorman CR, Gleason GT. Basal and Oxidative Stress–Induced Expression of Metallothionein Is Decreased in Ascending Aortic Aneurysms of Bicuspid Aortic Valve Patients. *Circulation*. 2009; 119: 2498-2506
- 115 Oshima Y, Fujio Y, Nakanishi T, Itoh N, Yamamoto Y, Negoro S, Tanaka K, Kishimoto T, Kawase I, Azuma J. STAT3 mediates cardioprotection against ischemia/reperfusion injury through metallothionein induction in the heart. *Cardiovascular Research*. 2005; 65: 428-435
- 116 Figueira E, Branco D, Antunes CS, Gonçalves F, Freitas R. Are metallothioneins equally good biomarkers of metal and oxidative stress?. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2012;
- 117 Cordero EI. Respuesta fisiologica al estrés anestésico quirúrgico. *Acta medica*. 2002; 10 (1-2):1-7
- 118 Valdez JU. Respuesta metabólica al trauma. *Arch Cir Gen Dig*. 2000; 061.
- 119 Perel C, Echin M. Insuficiencia cardiaca y tiroidea. Daño miocárdico en el hipotiroidismo. *Insuf Cardiaca*. 2006; 1(1): 43-51
- 120 Kahaly G, Dillmann HW. Thyroid hormone action in the heart. *Endocrine Reviews*. 2005; 26 (5): 704-728
- 121 Moreno AJM. Papel de los mediadores endoteliales y del estrés oxidativo en las alteraciones cardiovasculares de disfunción tiroidea (trabajo para obtener el grado de Doctor en Fisiología) 2005. Universidad de Granada
- 122 Goodman and Gilman. Las bases en la farmacología de la terapéutica. Capítulo 56: Fármacos tiroideos y antitiroideos. Undécima. Edición. Editorial

- Mc Graw Hill. 2006. 1511-1539
- 123 Vasconcelos MH, Tam SC, Beattie JH y Hesketh JE. Evidence for differences in the post-transcriptional regulation of rat metallothionein isoforms.(1996) *Biochem. J.* 315 (Pt 12): 665-671
- 124 Brady F. O; Helvig B. Effect of epinephrine and norepinephrine on zinc thionein levels and induction in rat liver. (1984) *Am J Physiol Endocrinol Metab* 247: 318-322,
- 125 Goodman and Gilman.Las bases en la farmacología de la terapeutica. Capitulo 34: Antiarrítmicos. Undécima. Edición. Editorial Mc Graw Hill. 2006. 899-932
- 126 Tugrul TK. Comparison of the gastrointestinal anatomy, physiology, and biochemistry of humans and commonly used laboratory animals.*Biopharmaceutics & Drug Disposition.* 1995. 16, 351-380
- 127 Andreollo NA, Santos EF, Araujo MR, Lopes LR. Rat's ages versus humans's ages: Whats is the relationshi? 2015. *ABCD Arq Bras Cir Dig* 25 (1): 49-51

13. APÉNDICES

13.1. ANEXO A. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

Solución de Levotiroxina.

Fármaco empleado: Eutirox ®. Laboratorio Merck

Principio activo: Levotiroxina sódica (tabletas de 125 µg)

Para preparar 100 mL de la solución de Levotiroxina para administración vía oral. Pulverizar perfectamente 25 tabletas (3125 µg de Levotiroxina sódica) de Eutirox ® y disolver perfectamente en 80 mL de agua purificada, aforar a 100 mL.

Solución de Metimazol

Fármaco empleado: Tiapazol ®. Laboratorio SiegfriedRhein

Principio activo: Metimazol o Tiapazol (tabletas de 5 mg)

Para preparar 100 mL de la solución de Metimazol para administración vía oral. Pulverizar perfectamente 40 tabletas (100 mg de Metimazol) de Tiapazol ® y disolver perfectamente en 80 mL de agua purificada, aforar a 100 mL.

Solución de Propranolol.

Fármaco empleado: Propranolol

Para preparar 10 mL de la solución de Propranolol para administración vía intraperitoneal. Pesar exactamente 200 mg de Propranolol y disolver perfectamente en 8 mL de agua destilada, aforar a 100 mL.

Amortiguador Tris-HCl

Para preparar 100 mL de amortiguador tris-HCl a una concentración de 30 mM y un pH de 8.6. Pesar 360 mg de 2-amino-2-hidroximetil-propano-1,3 diol (Tris base) y disolver con aproximadamente 80 mL de agua destilada. Una vez disuelto ajustar el pH a 8.6 con HCl, posteriormente se aforar a 100 mL.

13.2. ANEXO B. PROCEDIMIENTOS

Inmunoensayo de la Enzima para la Determinación Cuantitativa de la Concentración de Tiroxina Total (T4) en suero.

Muestras:

El suero es la muestra indicada para este ensayo. La sangre debe ser recolectada con técnicas estandarizadas de la punción venosa y el suero debe ser separado de los glóbulos rojos, tan pronto como sea posible. Evite hemólisis excesiva, muestras lipémicas o turbias. Muestras de plasma recolectadas en tubos con EDTA, heparina u oxalato pueden interferir con el procedimiento de prueba. Las muestras de suero deben ser almacenadas de 2 a 8 °C por hasta 48 horas, y deben ser congelados a -20°C o más bajo para periodos prolongados.

Preparación de reactivo:

1. Todos los reactivos deben estar a temperatura ambiente (de 18 a 25 °C) antes de su uso.
2. Todos los reactivos deben ser mezclados por inversión suave o torbellino antes de su uso. No inducir la formación de espuma.
3. Para preparar el Conjugado de Trabajo añada 0.1 mL del Concentrado de Conjugado T4-HRPO (11x) a 1.0 mL del Diluyente de Conjugado T4 (dilución 1:10) y mezcle bien. La cantidad de conjugado diluido depende del tamaño del ensayo. El conjugado de trabajo es estable a 4°C durante 24 horas.
4. Preparar la solución Buffer de lavado aforando, el líquido concentrado de solución buffer con agua destilada, multiplicando el valor de la concentración marcada en el frasco contra el volumen indicado en el mismo. Ejemplo: Concentración 50X, Volumen 20mL. $20 \times 50 = 1000$. por lo tanto se afora a 1000 mL. para llegar a una concentración de 1x.

Procedimiento del ensayo:

1. Asegure el número deseado de pozos cubiertos en un soporte.
2. Deposite 25µL de estándares, especímenes y controles en los pozos apropiados.
3. Agregue 100 µL del Reactivo Conjugado de trabajo en cada pozo.
4. Mezcle durante 30 segundos. Es muy importante mezclar completamente.
5. Incubar a temperatura ambiente (18-25° C) durante 60 minutos.
6. Quite la mezcla de la incubación golpeando el contenido del plato a un recipiente de desechos. (No golpear fuertemente)
7. Lavar el exceso de enzima con la solución buffer de lavado 5 veces.
8. Golpeé los pozos firmemente hacia el papel absorbente para quitar las gotas de agua residuales.
9. Deposite 100 µL de Solución TMB en cada pozo. Suavemente mezcle durante 10 segundos.
10. Incube a temperatura ambiente en la oscuridad durante 20 minutos.
11. Detenga la reacción agregando 100 µL de solución de paro a cada pozo.
12. Mezcle suavemente durante 30 segundos. *Es importante asegurarse que el color azul cambie completamente a amarillo.
13. Lea la absorbancia a 450 nm con un lector de micro pozos durante los primeros 15 minutos.

Cálculo de los resultados:

1. Calcule el valor de absorbancia media (A450) para cada juego de estándares de referencia, controles, y muestras.
2. Elabore una curva estándar al trazar la absorbancia media obtenida para cada estándar de referencia comparada con su concentración en $\mu\text{g/dL}$ sobre un papel cuadrícula, con valores de absorbancia sobre el eje Y o vertical y las concentraciones sobre el eje X u horizontal.
3. Utilizando los valores de absorbancia media para cada muestra, determine la concentración correspondiente de T4 en $\mu\text{g/dL}$ desde la curva estándar.
4. Cualquier valor obtenido para las muestras diluidas debe ser adicionalmente convertido al aplicar el factor de dilución apropiado en los cálculos.

Inmunoensayo de la Enzima para la Determinación Cuantitativa de la Concentración de Triyodotironina Total (T3) en el Suero.

Muestras:

El suero es la muestra indicada para este ensayo. La sangre debe ser recolectada con técnicas estandarizadas de la punción venosa y el suero debe ser separado de los glóbulos rojos, tan pronto como sea posible. Evite hemólisis excesiva, muestras lipémicas o turbias. Muestras de plasma recolectadas en tubos con EDTA, heparina u oxalato pueden interferir con el procedimiento de prueba. Las muestras de suero deben ser almacenadas de 2 a 8 °C por hasta 48 horas, y deben ser congelados a -20°C o más bajo para periodos prolongados.

Preparación de reactivo:

1. Todos los reactivos deben estar a temperatura ambiente (de 18 a 25 °C) antes de su uso.
2. Todos los reactivos deben ser mezclados por inversión suave o torbellino antes de su uso. No inducir la formación de espuma.
3. Para preparar el Conjugado de Trabajo añada 0.1 mL del Concentrado de Conjugado T3-HRPO (11x) a 1.0 mL del Diluyente de Conjugado T3 (dilución 1:10) y mezcle bien. La cantidad de conjugado diluido depende del tamaño del ensayo. El conjugado de trabajo es estable a 4°C durante 24 horas.
4. Preparar la solución Buffer de lavado aforando, el líquido concentrado de solución buffer con agua destilada, multiplicando el valor de la concentración marcada en el frasco contra el volumen indicado en el mismo. Ejemplo: Concentración 50X, Volumen 20mL. $20 \times 50 = 1000$. Por lo tanto se afora a 1000 ml. para llegar a una concentración de 1x.

Procedimiento del ensayo:

1. Asegure el número deseado de pozos cubiertos en el soporte.
2. Vierta con pipeta 50 µL de estándar, muestras, y controles en los pozos apropiados.
3. Vierta 50 µL de Reactivo de Anticuerpo en cada pozo. Mezcle perfectamente por 30 segundos.
4. Agregue 100 µL de Reactivo de Conjugado de Trabajo en cada pozo. Mezcle perfectamente por 30 segundos. Es muy importante tener un mezclado completo en este paso.
5. Incube a temperatura ambiente por 60 minutos.

6. Retire la mezcla de incubación con un movimiento rápido los contenidos de la placa en un recipiente para desechos.
7. Enjuague y sacuda con movimientos rápidos los pozos de micro-tira 5 veces con solución buffer de lavado.
8. Golpetee los pozos enérgicamente sobre el papel absorbente para remover todas las gotas de agua residuales.
9. Vierta 100 μL de solución TMB en cada pozo. Mezcle cuidadosamente por 10 segundos.
10. Incube a temperatura ambiente en la oscuridad por 20 minutos sin agitar.
11. Frene la reacción al agregar 100 μL de solución de paro a cada pozo.
12. Mezcle cuidadosamente por 30 segundos. Es importante asegurarse que todo el color azul cambie a color amarillo totalmente.
13. Lea la densidad óptica a 450 nm con un lector de microplaca dentro de un plazo de 15 minutos.

Cálculo de los resultados:

1. Calcule el valor de absorbancia media (A_{450}) para cada juego de estándares de referencia, controles, y muestras.
2. Elabore una curva estándar al trazar la absorbancia media obtenida para cada estándar de referencia comparada con su concentración en ng/mL sobre un papel cuadrícula, con valores de absorbancia sobre el eje Y o vertical y las concentraciones sobre el eje X u horizontal.
3. Utilizando los valores de absorbancia media para cada muestra, determine la concentración correspondiente de T3 en ng/mL desde la curva estándar.

4. Cualquier valor obtenido para las muestras diluidas debe ser adicionalmente convertido al aplicar el factor de dilución apropiado en los cálculos.

Cuantificación de metalotioneínas por el método de saturación por Cd.¹⁷

La determinación de la concentración de MT hepática se realizara de acuerdo al método de saturación con ¹⁰⁹Cd descrito por Eaton y Toal, 1982 Procedimiento:

9. Mezclar 0.5 g de tejido (corazón) con 500 µL de regulador Tris-HCl 30 mM, pH 8.6, y homogeneizar.
10. Centrifugar durante 15 minutos a 12 000 rpm para la obtención de la fracción sobrenadante.
11. A 100 µL del sobrenadante obtenido se adiciona 100 µL de solución con ¹⁰⁹Cd.
12. Incubar por 10 minutos a temperatura ambiente.
13. Adicionar una solución de hemoglobina al 2% para eliminar el ¹⁰⁹Cd no unido a MT.
14. Los complejos hemoglobina-Cd se precipitan por calor a 95 °C, repetir este último paso una vez más.
15. La hemoglobina se precipita mediante centrifugación durante 5 minutos a 12 000 rpm.
16. La cantidad de ¹⁰⁹Cd fijado por la MT presente en el sobrenadante se mide mediante un detector de centelleo.

Anestesia.

Todos los animales se anestesiaran con Ketamina-Xilacina a una dosis de 0.2 ml/100 g de peso por vía intraperitoneal.

Inducción de Metalotioneínas por una cirugía abdominal.

Se realizara una incisión abdominal aproximadamente de 3 cm; después de un minuto se procederá a suturar con Catgut crómico de 4-0.

Producción de un modelo hipotiroideo.

Administración de metimazol vía oral a una dosis de 4.5 mg/rata/día. Por un periodo de 3 semanas.

Producción de un modelo hipotiroideo. Administración de T₄.

Administración por vía oral de tiroxina (T₄) a una dosis de 75 µg/rata/día. Por un periodo de 3 semanas.

Inhibición de la adrenalina. Administración de propanolol.

Administración por vía intraperitoneal de propanolol a una dosis de 10 mg/Kg de peso, 30 minutos antes de la cirugía y del sacrificio.