



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO



**FACULTAD DE CIENCIAS**

**“EFECTO DE LA MUTACIÓN DEL RECEPTOR A HORMONAS TIROIDEAS TIPO BETA SOBRE LA PREFERENCIA DE COLOR EN EL PEZ CEBRA”**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**BIÓLOGO**

**PRESENTA**

MARÍA DE LOS ÁNGELES GARCÍA ESCAMILLA

**DIRECTOR DE TESIS**

DR. IVÁN LAZCANO SÁNCHEZ

**DIRECTOR INTERNO**

DRA. MARÍA DE LOURDES RUIZ GÓMEZ

# INDICE

<b>RESUMEN</b> .....	7
<b>MARCO TEÓRICO</b> .....	9
<b>Generalidades</b> .....	9
Contexto histórico.....	10
Síntesis y acción de las HTs.....	122
Transporte y metabolismo de las HTs.....	16
Receptores nucleares.....	18
La existencia de isoformas es común entre los NRs.....	19
<b>Receptores a hormonas tiroideas</b> .....	21
Dominios funcionales en los TRs.....	23
Dominio de unión al DNA.....	23
Dominio de unión al ligando.....	24
Sistema tiroideo y el desarrollo de la retina.....	255
<b>ANTECEDENTES</b> .....	27
<b>Regulación transcripcional</b> .....	27
Papel de la señalización tiroidea en el desarrollo del sistema nervioso central.....	27
Isoformas de TR en vertebrados.....	29
Isoformas en peces .....	31
<b>Desarrollo de los conos de la retina y hormonas tiroideas</b> .....	34
Eventos moleculares durante el desarrollo de la retina.....	37
Evidencias del papel de las HTs, TRs, y el desarrollo de la retina .....	38
<b>El sistema tiroideo durante el desarrollo del pez cebra</b> .....	39
Señalización tiroidea durante el desarrollo del pez cebra .....	40
Formación del ojo en el pez cebra .....	41
Papel de las hormonas tiroideas en el desarrollo del ojo del pez cebra .....	42
Pez cebra como modelo de estudio.....	43
<b>IMPORTANCIA DEL PROBLEMA</b> .....	46
<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	46
<b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	46
<b>OBJETIVOS</b> .....	47
<b>HIPÓTESIS</b> .....	47
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	48
<b>Mantenimiento, reproducción, colecta y almacenamiento de embriones</b> .....	48
<b>Generación de mutantes para los receptores a HTs</b> .....	48

<b>Determinación de la eficiencia de las mutaciones</b> .....	50
Extracción del gDNA.....	51
PCR.....	51
<b>Tratamientos con hormonas</b> .....	52
<b>Análisis conductual</b> .....	53
<b>Histología</b> .....	534
<b>Tinción</b> .....	544
<b>RESULTADOS</b> .....	555
<b>Determinación de la efectividad para generar crispantes</b> .....	555
Concentraciones de DNA .....	555
Amplificación de la zona de mutación mediante PCR .....	566
Resultado de las secuenciaciones.....	599
<b>Organismos silvestres y modificados</b> .....	61
<b>Tratamientos con hormonas</b> .....	666
Larvas tratadas con T3 .....	666
Larvas tratadas con T2 .....	677
<b>DISCUSIÓN</b> .....	71
<b>CONCLUSIONES</b> .....	755
<b>SUGERENCIAS PARA TRABAJOS FUTUROS</b> .....	75
<b>REFERENCIAS</b> .....	76

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Eje de circulación y síntesis de las hormonas tiroideas.....	9
Figura 2. Estructura tridimensional de los folículos tiroideos rodeados por células tiroideas foliculares epiteliales.....	11
Figura 3. Estructura química y reacciones fisiológicas enzimáticas involucradas en la síntesis de hormonas tiroideas. ....	12
Figura 4. Mecanismo de respuesta en el tirocito tras la estimulación de TSH.....	13
Figura 5. Vía de síntesis de las hormonas tiroideas.....	14
Figura 6. Estructura general de los NR.....	19
Figura 7. Mecanismo de acción de las HTs ..	21
Figura 8. Representación esquemática del DBD de TR $\beta$ en humanos.....	22
Figura 9. Estructura cristalina del dominio de unión al ligando TR $\alpha$ 1. ....	24
Figura 10. Isoformas de los TR en ratón.....	30
Figura 11. Estructura de los fotorreceptores. ....	35
Figura 12. Laberinto en cruz utilizado en prueba de preferencia de color. ....	53
Figura 13. Secuencia primaria de las isoformas de los receptores a hormonas tiroideas modificado de Lazcano et al. (2019)..	58
Figura 14. Electroferogramas de los animales control y crispantes para el l-thrb*.....	60
Figura 15. Electroferogramas de los animales control y los crispantes para l-thrb+..	60
Figura 16. Morfología del ojo en pez cebra, cortes transversales a los 5 dpf. ....	61
Figura 17. Preferencia del color en larvas de 5dpf. Se muestra la conducta en la preferencia de los grupos control y los grupos modificados con la sgRNA l-thrb+ .....	62
Figura 18. Fenotipo en larvas de los grupos control y los modificados genéticamente....	63
Figura 19. Preferencia del color en larvas de 5dpf. Se muestra la conducta en la preferencia de los grupos control y los grupos modificados con la sgRNA thrb*.....	64
Figura 20. Morfología del ojo en pez cebra, cortes transversales a los 5 dpf. ....	66
Figura 21. Preferencia del color en larvas de 5dpf. Se muestra la conducta en la preferencia del color de los grupos control y los grupos tratados con T3 0.1 nM y T3 1 nM .....	68
Figura 22. Morfología del ojo en pez cebra, cortes transversales a los 5 dpf .....	68
Figura 23. Preferencia del color en larvas de 5dpf. Se muestra la conducta en la preferencia del color de los grupos control y los grupos tratados con T2 0.1 nM y T2 1 nM .....	69

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Efectos fisiológicos de las HTs.....	26
Tabla 2. Concentraciones de DNA genómico y sus respectivos índices de pureza obtenidas de larvas de pez cebra. ....	56
Tabla 3. Concentraciones del producto de PCR y sus respectivos índices de pureza obtenidas de larvas de pez cebra .....	57
Tabla 4. Eficiencia de la mutación en individuos crispantes.....	59
Tabla 5. Preferencia de color en larvas de 5dpf. Se muestran los grupos control y los organismos modificados con ambas sgRNAs. ....	65
Tabla 6. Preferencia de color en larvas de 5dpf. Se muestran los grupos control y los organismos tratados con las dos diferentes concentraciones de T3 y T2.....	70

## RESUMEN

Las hormonas tiroideas tienen un papel esencial dentro del grupo de los vertebrados. Por ejemplo, en anfibios participan de manera activa en el proceso de metamorfosis pues se eleva su expresión en ciertas ventanas de tiempo durante su desarrollo. Asimismo, participan en diversos procesos fisiológicos y pese a que se han encontrado en algunos invertebrados, estas actúan de manera particular en los vertebrados a través de factores de transcripción que se encuentran en el núcleo. Estos factores de transcripción llamados receptores a hormonas tiroideas, pertenecen a la familia de receptores nucleares (NRs) que se caracterizan por poseer un dominio de unión al DNA y un dominio de unión al ligando. En vertebrados, encontramos de manera general dos genes que codifican a los receptores a hormonas tiroideas denominados *thra* y *thrb*, cada uno codifica para diversas isoformas ya sea por splicing alternativo o a partir de un inicio diferente de la transcripción. También se ha descubierto que algunas de estas isoformas tienen una expresión y función en tejidos específicos y en algunos casos participan de manera más activa en una ventana de tiempo particular durante el desarrollo. Dentro de las isoformas específicas codificadas por el gen *thrb* se encuentra TR $\beta$ 2 que se expresa en la retina del ojo. Se ha descubierto que esta isoforma participa en la formación de los conos de la retina, estas células participan en la foto-transducción en el proceso de la percepción visual. De manera particular, se ha demostrado que el receptor TR $\beta$ 2 participa en la formación de los conos tipo L (longitudes de onda largas-rojo).

Por lo anterior, con el fin de estudiar la fisiología del receptor TR $\beta$ 2 en el desarrollo de la retina, se empleó al pez cebra (*Danio rerio*), modelo de estudio muy útil. Entre sus ventajas se encuentra, una fácil manipulación genética; por ejemplo, editar al receptor TR $\beta$ 2 que también está presente en este modelo y ha sido denominado l-thrb+. Para explorar el efecto de la pérdida de función de la isoforma l-thrb+ sobre la fisiología de la foto-transducción del pez cebra, se utilizó la metodología de CRISPR/CAS9 para la edición del gen l-thrb+. Para ello se diseñaron dos sondas para mutar el gen, una que tiene como blanco específico la isoforma l-thrb+ (sg l-thrb+) y otra adicional, que, de manera ideal, muta todas las

isoformas codificadas por el gen *thrb* (sg *thrb\**). Se corroboró la mutación a través de la secuenciación en un grupo de diecisiete individuos, dos pertenecientes a animales silvestres (Wild Type, WT), otras ocho pertenecientes a los grupos inyectados con la gRNA (guía de RNA) l-*thrb* + y de manera adicional siete pertenecientes a la gRNA *thrb\**. Mediante el análisis de secuenciación observamos una eficiencia de mutación del 50% y el 71% de manera respectiva. Para evaluar si la mutación afecta la fisiología de la retina, los animales WT y los mutantes (crispantes) fueron evaluados mediante el empleo de la conducta de preferencia de color a los 5 días post fertilización (dpf). De manera independiente, se probó el efecto de la administración de hormonas tiroideas (HTs) en el medio de cultivo de animales WT y se sometieron a esta misma prueba. Como resultado se encontró que la preferencia hacia el color rojo disminuye en los crispantes *thrb\** (la que muta todas las isoformas). Por otra parte, las hormonas tiroideas T3 y T2 (0.1 nM y 1 nM) si mostraron un cambio en el patrón de conducta. Finalmente, se verificó a través de histología, que en los peces crispantes y los tratados con HTs no se altera la morfología general del ojo. Esto implica que el efecto observado en los experimentos no se debe a alteraciones generales del ojo, sino posiblemente a alteraciones específicas en los patrones de expresión de los conos de la retina.

## MARCO TEÓRICO

### Generalidades

Las hormonas tiroideas se encuentran presentes en todos los grupos de vertebrados, regulando procesos fisiológicos importantes como el crecimiento, el ritmo cardíaco, la termogénesis entre otros. Su rol es crítico para un funcionamiento normal de casi todos los tejidos, pues controlan de manera primaria la expresión génica a través de receptores específicos (Citterio et al., 2019 y Yen, 2001).

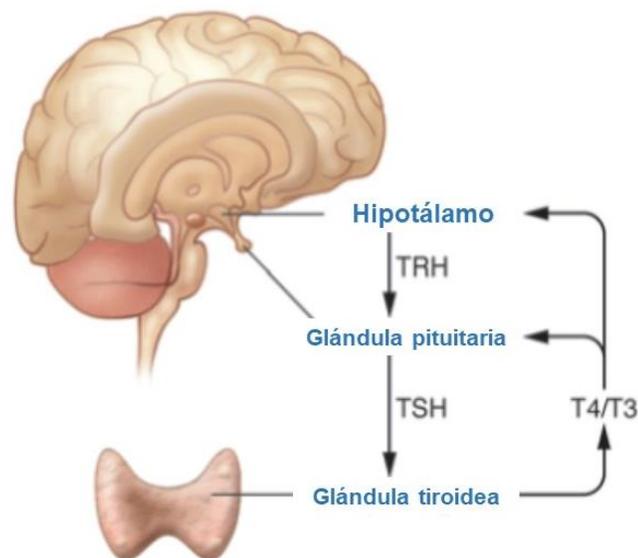


Figura 1. Eje de circulación y síntesis de las hormonas tiroideas.  
Tomado de Brent (2012).

La síntesis y secreción de estas hormonas comprende una serie de reacciones bioquímicas específicas reguladas de manera precisa por una retroalimentación negativa que comprende al hipotálamo, la glándula pituitaria y la glándula tiroidea [Eje hipotálamo-pituitaria- glándula tiroidea (HPT)] (Fig. 1). De manera particular las HTs, 3,5,3',5' tetrayodotironina o tiroxina (T4) y la forma biológica más activa la 3,5,3' triyodotironina (T3), son sintetizadas en la glándula tiroidea (Carvalho y Dupuy, 2017 y Yen, 2001).

Las alteraciones en la glándula tiroidea se encuentran entre los desórdenes más comunes del sistema endocrino. Entre las patologías más comunes se encuentran

el hipotiroidismo, es decir, bajas concentraciones circulantes de HTs debido a que la glándula tiroides no produce la cantidad de hormonas tiroideas necesarias para el funcionamiento normal del organismo. Su signo cutáneo más característico es el llamado mixedema, que se manifiesta en forma de mucinosis dándole a la piel un aspecto céreo de forma difusa. Por el contrario, en el hipertiroidismo, o altas concentraciones circulantes de HTs debido a un exceso en su biosíntesis y secreción por la glándula tiroides, produce un estado de hipermetabolismo semejante a la tirotoxicosis, también muy común en la población humana. Otro padecimiento muy común de hiperfunción de la glándula tiroidea es el bocio multinodular tóxico (BMT) que se caracteriza por la presencia de múltiples nódulos autónomos que causan un hipertiroidismo subclínico (Pulgarín et al., 2016).

Desde tiempos antiguos, se ha relacionado el bocio e hipertiroidismo con diversas deficiencias. Bassett y Williams (2016) mencionan que se ha reconocido la asociación entre el bocio, el cretinismo, el desarrollo retrasado y la estatura corta. Además, Forrest y Ng (2016) notaron como en las regiones con bocio y cretinismo endémico, la sordera era muy común, por lo que se asociaron las anormalidades de la glándula con la pérdida de la audición.

### **Contexto histórico**

Previo a darle nombre a la glándula tiroidea, en la época clásica ya se llamaba tiroides a un cartílago ubicado próximo a la glándula. Galeno, médico griego que vivió entre los años 130-200 D.C. le llamó tiroides a esta glándula por su proximidad al cartílago. Desde entonces en los textos y atlas de anatomía, la glándula recibió nombres relacionados con su anatomía y ubicación. Por ejemplo, el cirujano Giulio Casserio en su obra *Pentaestheseion* dibuja y describe a la glándula tiroidea y la llama ***glandulae radici Laryngis***, o sea <<glándula al pie de la laringe>>. Aunque fue hasta 1656, cuando el doctor Thomas Wharton en su obra *Adenographia* le pone el nombre definitivo, en latín, de ***glandula thyroidae***; es decir, glándula tiroidea (Shuja, 2008). Durante todos esos años la glándula solo se había descrito de manera anatómica. El descubrimiento de su función fue fundamentado a mediados del siglo XIX cuando en 1888 la Sociedad Clínica de

Londres publica un reporte definitivo que relacionaba a la destrucción de la glándula tiroides con patologías como el cretinismo y el hipotiroidismo en adultos. Dos años después Bettancourt y Serrano trataron con éxito a una mujer con mixedema a partir de extractos de la glándula tiroidea de oveja y seis años después Bauman demostró la presencia de yodo en la glándula. En 1909, Emil Kocher recibió el premio Nobel pues realizó estudios en la escuela suiza que fueron pioneros sobre la patología y la cirugía de la tiroides, proporcionando el conocimiento básico de las funciones de esta glándula. En 1914 Kendall aisló y cristalizó la T4 a partir de extractos tiroideos. Casi cuatro décadas después Gross y Pitt-Rivers sintetizaron T3 demostrando su presencia en el plasma humano y como esta hormona podía prevenir el bocio en ratas tratadas. En los 60's Tata et al. sugirieron que las HTs podían estar involucradas en la regulación de la expresión de los genes. A partir de esos descubrimientos y en los años siguientes, gracias al avance de la biología molecular, se estudió el efecto de las hormonas en diferentes procesos biológicos. Al principio se estudiaron los efectos en el desarrollo de anfibios, estudios que se extendieron al resto de los vertebrados y en la actualidad ya está clara su relación con la amplia variedad de funciones biológicas, cómo actúan en el organismo y cómo interactúan con sus receptores particulares (Shuja, 2008, Tresguerres, 2005 y Yen, 2001).

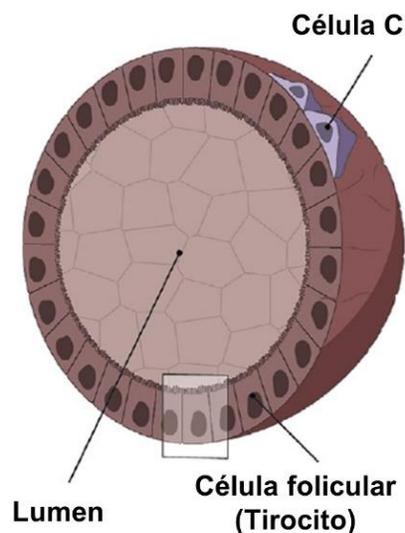


Figura 2. Estructura tridimensional de los folículos tiroideos rodeados por células tiroideas foliculares epiteliales. Tomada de Carvalho y Dupuy (2017).

## Síntesis y acción de las HTs

La serie de reacciones que provocan la síntesis y expresión de las hormonas tiroideas está ampliamente relacionada con la organización del tejido tiroideo.

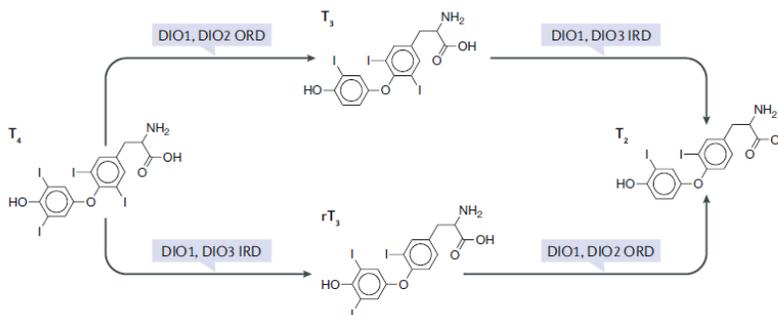


Figura 3. Estructura química y reacciones fisiológicas enzimáticas involucradas en la síntesis de hormonas tiroideas. Tomada de Citterio et al. (2019).

La glándula tiroidea está constituida por estructuras foliculares (Fig. 2) que se encuentran agrupadas formando a la glándula (Carvalho y Dupuy, 2107). Cada folículo tiene una apariencia esférica u ovoide, formada por una monocapa de células epiteliales foliculares polarizadas con forma cuboidea llamadas tirocitos, unidades funcionales que rodean una cavidad central-. Esta cavidad central llamada "coloide", es un almacén de la proteína específica de los tirocitos, la tiroglobulina (TG). La cara exterior del folículo está delimitada por una membrana plasmática basolateral que está en contacto con una gran red capilares sanguíneos en donde ocurre un intenso intercambio sanguíneo, mientras que la cara interna de los tirocitos está delimitada por una membrana apical que contiene muchas microvellosidades en contacto con el coloide. Las caras laterales de las células foliculares están unidas por desmosomas a otras células epiteliales circundadas por una membrana basal, las uniones estrechas forman una fuerte barrera que impide la difusión de proteínas a través de la membrana. Como resultado, el contenido del lumen no puede alcanzar el torrente sanguíneo a través de los espacios intercelulares. Para la síntesis de las hormonas que en su estructura molecular contienen yodo (Fig. 3), es necesaria la presencia de esta molécula en los folículos tiroideos (Carvalho y Dupuy, 2017 y Tresguerres, 2005).

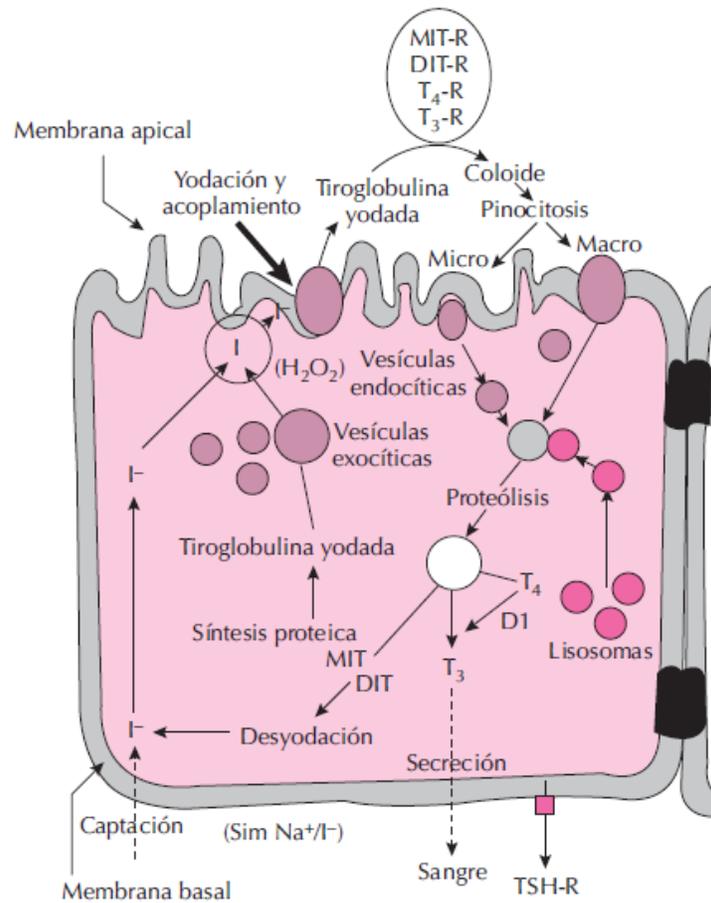


Figura 4. Mecanismo de respuesta en el tirocito tras la estimulación de la hormona estimuladora de la tiroides. Tomada de Tresguerres (2005)

El control de la síntesis de hormonas tiroideas depende en gran medida de un mecanismo de retroalimentación el cual comienza en el núcleo paraventricular hipotalámico en donde es secretada la hormona liberadora de tirotrópina (TRH), un tripéptido cuya concentración máxima se encuentra en el hipotálamo. Esta hormona llega a través de los vasos portales hipotálamo-hipofisarios a las células tirotrópicas de la glándula pituitaria que tiene receptores para TRH, y al ser activados estimulan una cascada de señalización para la síntesis y liberación de tirotrópina (Hormona estimuladora de la tiroides TSH), que es secretada por las células tirotrópicas (Bassett y Williams, 2016 y Yen, 2001).

La hormona estimuladora de la tiroides es una glucoproteína compuesta de dos subunidades, la cadena  $\alpha$  y la cadena  $\beta$  que le confiere especificidad. Posterior a su secreción, la TSH viaja por el torrente sanguíneo hasta alcanzar a su receptor (TSH-R) en la membrana plásmática del tirocito (Fig. 4) (Tresguerres, 2005 y Yen, 2001). Los TSH-R son receptores acoplados a proteínas G presentes, ubicados en

la membrana plasmática basolateral de los tirocitos, que ejercen numerosos efectos sobre la glándula. La unión de TSH a TSH-R incrementa y activa la vía del adenosín monofosfato cíclico (AMPc) que induce la fosforilación de proteínas nucleares y al elemento modulador de respuesta a AMPc (CREB), esta a su vez se une a secuencias reguladoras de genes diana activando su transcripción. Así, entre los genes cuya expresión génica es estimulada por TSH, está el simportador  $Na^+/I^-$  (NIS) (Fig. 5) (Carvalho y Dupuy, 2017 y Tresguerres, 2005). NIS transporta de manera activa  $Na^+$  y un ión de yoduro al interior de la célula en contra de su gradiente, por lo que promover su expresión es indispensable en la absorción de yoduro y la formación de las HTs (Fig. 5).

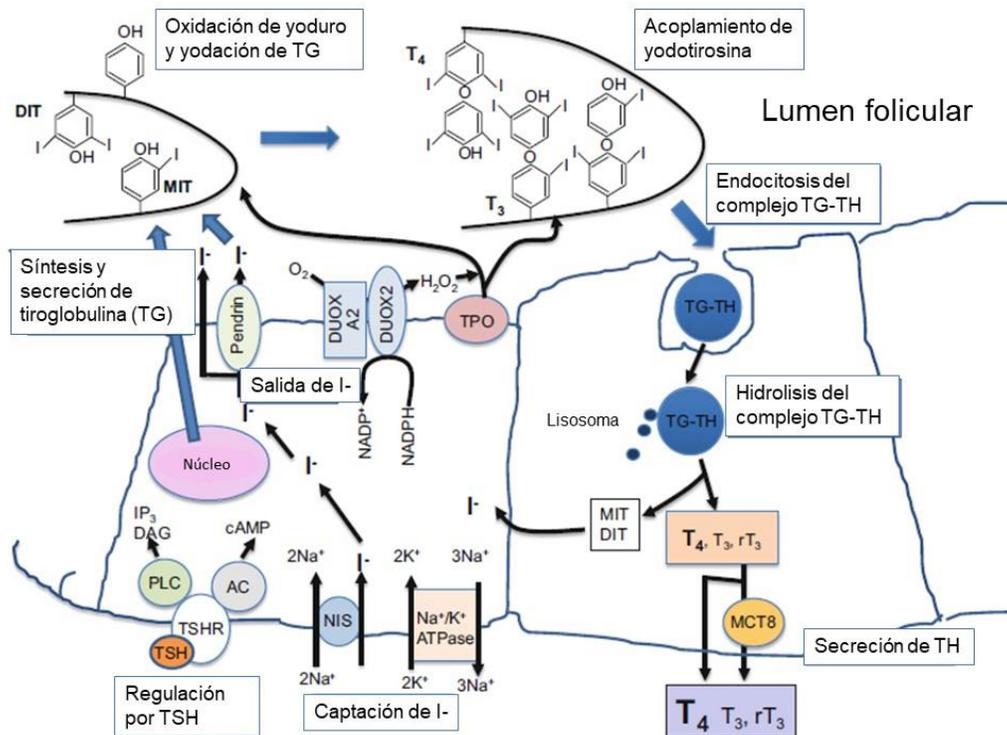


Figura 5. Vía de síntesis de las hormonas tiroideas (HTs). AC adenil ciclasa; DIT, diyodotirosina; DUOX, oxidasa dual; MCT8 transportador de monocarboxilato; MIT monoyodotirosina; NIS,  $Na^+/I^-$  simportador; PLC, fosfolipasa C; TPO peroxidasa tiroidea; TSH, tirotrópina; TSHR, receptor de tirotrópina. Tomada de Koibuchi, N. (2012).

Cuando las concentraciones de yoduro son demasiado altas y las células tiroideas son expuestas a altas concentraciones de yodo, el organismo usa como defensa el efecto Wolff-Chaikoff, mecanismo mediante el cual se reduce el transporte

activo de yodo, así como su organificación dentro de las proteínas (Carvalho y Dupuy, 2017 y Tresguerres, 2005).

Además del control sobre la expresión de NIS, la TSH controla la síntesis y exocitosis de la TG. La TG es una glicoproteína tiroidea compuesta por dos subunidades y de manera usual constituye el 75% del contenido total de las proteínas en la glándula tiroidea y su transcripción también depende de la presencia de los factores de transcripción TTF-1, TTF 2 y PAX8. Esta proteína ejerce dos funciones principales en el metabolismo del yoduro: 1) Sirve como molde para la biosíntesis de las hormonas tiroideas, 2) y proporciona almacenamiento del yodo intratiroideo que es importante para la homeostasis tiroidea (Carvalho y Dupuy, 2017 y Tresguerres, 2005).

Previo a la secreción y yodación de la TG, esta sufre cambios postranscripcionales. El ARNm de la TG es traducido por los ribosomas en el retículo endoplásmico rugoso y es expulsada al lumen, durante su paso por el aparato de Golgi se glicosila progresivamente (Fig. 4). TG también se fosforila en los residuos de serina/treonina y en unidades de carbohidratos y una vez glicosiladas las moléculas, se empaquetan en las vesículas exocitóticas. Las nuevas proteínas de TG sintetizadas son secretadas en el lumen folicular a través de las vesículas y el yodo se incorpora a algunos de sus residuos de tirosilo a través de una reacción que es catalizada por la peroxidasa tiroidea (TPO), una proteína presente en la membrana plasmática apical. Así, TPO en presencia de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) cataliza la oxidación del yoduro necesaria para la yodación de los residuos de la TG (reacción de organificación) a partir de los cuales forman residuos de MIT (monoyodotirosina) y DIT (diyotirosina). Los residuos MIT y DIT darán origen a las yodotironinas T3 y T4. La TPO no puede oxidar su sustrato sin ser previamente oxidada por una molécula de  $H_2O_2$  y se ha observado que tanto la TPO como el sistema generador de  $H_2O_2$  están ubicados en la membrana apical del tirocito, por lo que solo las moléculas de TPO localizadas en esta superficie pueden ser activadas. El sistema generador de

$H_2O_2$ , genera las moléculas a través de enzimas NADPH-oxidasas dependientes de calcio (Fig. 5) (Carvalho y Dupuy, 2017 y Tresguerres, 2005).

El acoplamiento de los residuos se logra a través de la transferencia de un grupo yodofenoxilo que ocurre en un residuo MIT O DIT llamado “donador” sobre un residuo DIT llamado “aceptor”. La estructura de TG es crítica para la reacción de acoplamiento ya que la posición antiparalela permite la formación de las hormonas. Del total de residuos de tirosilo en la TG solo una porción muy pequeña llega a yodarse y formar MIT y DIT. En condiciones normales la TG se almacena como un polipéptido extracelular en el lumen de los folículos y en los humanos en condiciones suficientes de aporte de yodo contiene de manera aproximada 7 residuos de MIT, 5 de DIT, 2 de T4 por cada molécula de TG y solo uno de cada tres moléculas de TG contiene un residuo de T3 (Carvalho y Dupuy, 2017 y Tresguerres, 2005).

Para que las hormonas sintetizadas sean lanzadas al torrente sanguíneo, antes debe ocurrir un proceso de proteólisis de la TG que comienza a través de una endocitosis de TG desde el lumen folicular mediante una macro y micro pinocitosis de la superficie apical de los tirocitos (Fig. 5). Los pseudópodos de la membrana apical engloban el coloide del lumen que entra en el citoplasma. La entrada del coloide es acompañada por la migración de lisosomas de alta densidad que se fusionan con el coloide formando fagolisosomas, en donde ocurre una digestión proteolítica de la TG a un pH bajo por las endopeptidasas catepsinas y exopeptidasas, necesarias para la ruptura de los enlaces peptídicos que mantenían unidas a la T4, T3, MIT y DIT a la proteína. Como productos de la proteólisis no solo se libera T4 y T3, también las yodotirosinas, MIT y DIT que son desyodadas por la yodotirosina desalogenasa (DEHAL1), proporcionando una fuente sostenida de yodo intratiroidal (Fig. 5).

### **Transporte y metabolismo de las HTs**

Las hormonas tiroideas son liberadas de los tirocitos a través de transportadores presentes en su membrana que liberan a las hormonas en el torrente sanguíneo. El transportador más importante y mejor conocido, que tiene un rol fundamental en

el consumo y flujo de las HT de la glándula tiroidea, es el monocarboxilato transportador 8 (MCT8) que de manera principal transporta T3 hacia las células de los tejidos blanco. En relación con las concentraciones de HT que son liberadas por la glándula tiroidea, no toda la T4 es liberada de manera directa al torrente sanguíneo. De manera contraria, la relación de T3 y T4 secretadas es más alta que la relación en la que ambas HTs se encontraban en la TG, esto se debe a la existencia de actividad enzimática dentro de la glándula en la que se genera T3 a partir de T4. La enzima encargada de esta actividad es una 5'- yodotironina desyodasa (DI) (Fig. 4) que también tiene la particularidad de ser estimulada por la TSH, representando la vía principal de producción y circulación de la T3 liberada desde la glándula. Sin embargo, la desyodasa tipo II (DII) también participa en la desyodación del anillo externo de la T4 en otros tejidos, por lo que ambas enzimas son las encargadas de la mayor producción de T3 en la que solo el 0.3% de T3 es libre en el suero, entrando a sus células blanco y generando una respuesta biológica (Carvalho y Dupuy, 2017, Tresguerres, 2005 y Yen, 2001). Un mecanismo que contribuye a mantener el equilibrio en las concentraciones de HTs es el que se encarga de inactivar las moléculas de T4 y T3, generando T3 reversa (rT3) o 3, 3'-diyodotironina (3,3'-T2) a través de otro tipo de desyodasa, la desyodasa tipo III (DIII). Cabe mencionar que la DI también puede participar inactivando las moléculas de HTs (Bassett y Williams, 2016).

Como ya se mencionó, la síntesis y secreción de la TSH tiene un efecto importante en la síntesis de las HTs, pues estimulan la expresión de otras moléculas clave para su formación. Esto mantiene los niveles HTs circulantes idóneos en los organismos, que simultáneamente ejercen un control supresor al frenar la secreción y expresión de TSH, controlando la expresión a través de la retroalimentación negativa entre las dos glándulas que participan en este eje, la pituitaria y glándula tiroidea. Así, cuando hay niveles elevados de T3, esta ejerce el efecto represor a través de su receptor nuclear en las células tirotropas, comenzando a disminuir las HTs disponibles. Este efecto se termina cuando luego de un tiempo los niveles de HTs se normalizan en la circulación antes de que

tengan repercusiones en los tejidos y se activa la respuesta compensadora iniciando nuevamente el proceso de síntesis de las THs (Tresguerres, 2005).

A pesar de que las hormonas tiroideas pueden tener efectos no genómicos en el organismo, sus efectos primarios se ejercen mayormente en la regulación de la expresión de genes diana. Las HTs ejercen esos efectos a través de la interacción de T3 con receptores situados en el núcleo celular, estos receptores son factores de transcripción altamente especializados que poseen mayor afinidad por T3, por lo que es la principal hormona que ejerce acciones genómicas (Tresguerres, 2005). Las HTs entran a la célula dirigiéndose al núcleo y se unen a los receptores de hormonas tiroideas (TRs) que pueden estar previamente unidos a las regiones promotoras. Este es el primer paso crítico en la regulación positiva o negativa de sus genes diana y, por consiguiente, de la regulación de la síntesis de proteínas (Tresguerres, 2005).

### **Receptores nucleares**

Los receptores nucleares son proteínas que constituyen la mayor clase de reguladores transcripcionales en los animales, actúan en respuesta a ligandos hormonales como los esteroides, ácido retinoico u hormonas tiroideas regulando la expresión de sus genes blanco positiva o negativamente (Laudet, 2001).

Esta respuesta se genera gracias a su estructura formada de varios dominios, algunos de los cuales comparten un alto porcentaje de su secuencia de aminoácidos con otros grupos de esta misma familia. De ellos, tres dominios están altamente conservados; el dominio A/B localizado en el N-terminal, un dominio central llamado dominio de unión al DNA (DBD) y en el C-terminal encontramos un dominio de unión al ligando (LBD) (Plateroti y Samarut, 2018; Laudet, 2001 y Lazar, 1993). Adicionalmente, la secuencia proteica de los receptores nucleares se puede dividir en regiones que incluyen los tres ya mencionados más otros adicionales que son denominados de la A a la F. Así por ejemplo la región C contiene al DBD, la región E al LBD, y el dominio D enlaza a estos dominios (Fig. 6) (Saéz et al., 2010).

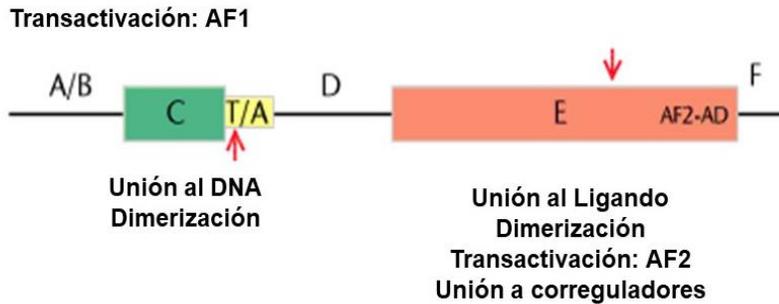


Figura 6. Estructura general de los receptores nucleares, los dominios que lo componen con sus principales funciones. Tomada de Laudet (2001).

Se presume que los genes de estos receptores se formaron a partir de un ancestro común anterior a las esponjas (Porifera), que aparecieron como un simple gen y subsecuentemente fueron duplicándose en el transcurso de la evolución y que al evolucionar adquirieron la capacidad de hetero – y homodimerización (Laudet, 2001).

La organización genómica de los NRs es variable, sin embargo, se pueden hacer algunas suposiciones de acuerdo con la posición de los intrones que están altamente conservados a través de los genes parálogos en los vertebrados. Cuando son considerados todos los miembros de esta familia, el dominio más conservado es la región C o el DBD que facilita la secuencia de interacciones específicas con el surco mayor de la doble hélice del DNA, este dominio mantiene una homología del 50% entre todos los miembros de la super familia y un poco más del 90% de homología entre receptores parálogos. La región específica más conservada se encuentra en el último intrón del DBD dentro de la caja T/A (elemento iniciador de homología máxima en una región de ocho bases), que es importante para la unión al DNA. Además del DBD, dentro del LBD un intrón localizado entre las hélices H3 y H12 parece ser una región altamente conservada en estos receptores (Saéz et al., 2010 y Laudet, 2001).

### **La existencia de isoformas es común entre los NRs**

Cuando se hallaron dos isoformas distintas del receptor a progesterona, PR-A y PR-B, se creía que era una excepción. Sin embargo, con el descubrimiento de más miembros de esta familia se dividieron en diferentes clases y se determinó

cómo estas isoformas pueden originarse de diversas maneras mediante empalme alternativo o una selección alternativa de inicio de la transcripción (Laudet, 2001 y Plateroti y Samarut, 2018).

Entre las diversas isoformas, se encuentran numerosas variantes en el N-terminal como el tipo más común; la actividad transcripcional es diferente entre cada isoforma. Por ejemplo, podemos encontrar isoformas con modificaciones en el dominio de unión al DNA. Estas isoformas continúan uniéndose a su ligando, pero no al DNA por lo que se altera la actividad transcripcional. Por otro lado, también existen isoformas con actividad dominante negativa. Estas poseen la capacidad de unirse al DNA, pero son incapaces de reconocer al ligando debido a alteraciones en la secuencia del dominio LBD, por tanto, son transcripcionalmente silenciosas y actúan como reguladores negativos de la actividad transcripcional. El último grupo de isoformas comprende aquellos que son generados por inserciones o deleciones de tramos de aminoácidos en la secuencia proteica pero aún son poco conocidas las consecuencias funcionales de estas isoformas (Darras et al., 2011 y Laudet, 2001).

El estudio comparado de los receptores ha mostrado marcadas diferencias entre el número de receptores nucleares en las distintas especies. Por ejemplo, el genoma de *Drosophila* parece contener un poco más del doble que el genoma de humano en el que se han registrado 48 receptores nucleares, mientras que el genoma del ratón contiene 49 (Magner y Antebi, 2008).

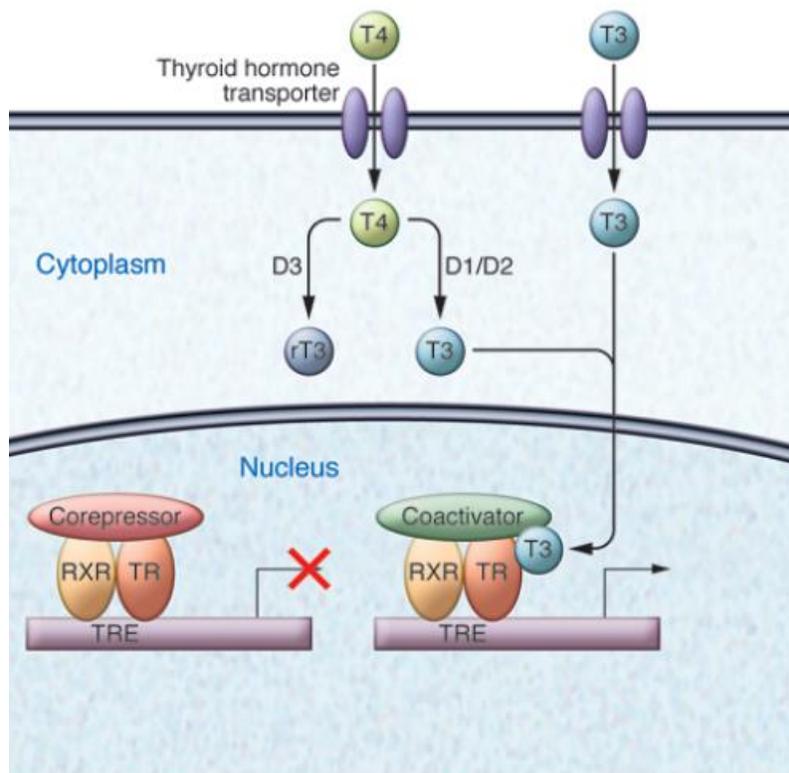


Figura 7. Mecanismo de acción de las hormonas tiroideas al entrar a la célula y alcanzar el núcleo. Tomada de Brent (2012).

## Receptores a hormonas tiroideas

Los receptores a hormonas tiroideas son miembros de la super familia de NRs, así como todos los receptores pertenecientes a esta familia, los TRs actúan como factores de transcripción dependientes de ligando que regulan la expresión de genes diana involucrados en procesos biológicos fundamentales como el desarrollo, crecimiento y diferenciación (Zhang y Lazar, 2000 y Brent, 2012). Su función principal es regular la respuesta hormonal pues forman parte de la respuesta final a la señal por hormonas tiroideas que una vez unidas al receptor, reclutan moléculas que posteriormente modifican la cromatina y contactan con la maquinaria de transcripción basal (Fig. 7) para activar la transcripción de los genes (Sladek, 2011).

En el rastreo del origen de los TRs a través de las secuencias genómicas disponibles de los animales más antiguos, se han encontrado ortólogos (secuencias homólogas encontradas en especies diferentes) de los TR en platelmintos, moluscos, crustáceos, equinodermos y anfibios, lo cual sugiere que se originaron de un ancestro común en los *Bilateria*. Sin embargo, la capacidad de unir hormonas tiroideas en particular la triyodotironina (T3) es exclusiva de los vertebrados; sin dejar atrás el hecho de que las HT tienen efectos de diferenciación, maduración y metabolismo en distintas especies de invertebrados, incluyendo cnidarios, equinodermos y artrópodos, aun cuando estas especies no tienen la capacidad de sintetizar estas hormonas. De manera clara, se han identificado genes homólogos (mismo origen) en los invertebrados. Sin embargo, todavía no está clara la presencia de dominios funcionales y si están presentes en todos los invertebrados, por lo que continúa siendo un tema controversial (Mendoza, 2015 y Wu et al., 2007).

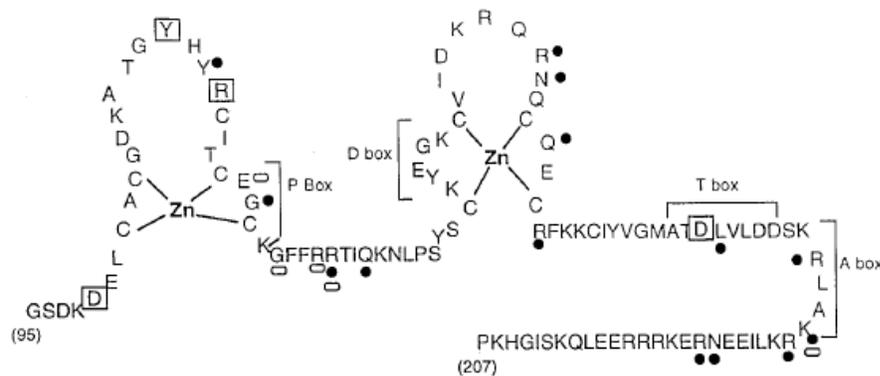


Figura 8. Representación esquemática del dominio de unión al DNA de TR $\beta$  en humanos. Se muestran los dos dedos de zinc y subregiones en las que los cuadros representan las zonas de contacto para heterodimerización TR/RXR, los óvalos contacto de base directa y los círculos sólidos interacciones proteína-fosfato. Tomada de Yen (2001).

## **Dominios funcionales en los TRs**

### **Dominio de unión al DNA**

Uno de los aspectos más importantes de los TRs es la capacidad que poseen de unirse a las regiones promotoras de diferentes genes a los cuales pueden regular transcripcionalmente. Dos motivos de unión al zinc coordinan la unión al DNA a través de cuatro cisteínas con una posición precisa que se ubican a la mitad del DBD (Fig. 8). La integridad de cada motivo de zinc es crítica pues la pérdida de estos motivos o la sustitución de los residuos de cisteína por otro aminoácido anula la capacidad de este dominio para unirse al DNA tanto en receptores a hormonas esteroides como en los TRs (Yen et al., 1995). Dentro de los dedos de zinc, los TRs comparten una “caja P” (serie de aminoácidos ubicados entre la tercera y cuarta cisteína) con otros receptores de la misma familia como los receptores de ácido retinoico (RARs), los receptores de retinoides X (RXRs) y los receptores a vitamina D (VDRs). Se ha demostrado que esta región es importante en la secuencia-específica de reconocimiento a los elementos de respuesta a las hormonas tiroideas (TREs) que se encuentran en el DNA y que son importantes para la interacción TR-DNA (Fig. 7) (Yen, 2001).

Por tanto, la secuencia a la que se unen los TRs en la región promotora de los genes diana son los TREs. En el DNA los TRs usualmente se unen formando heterodímeros con otros receptores nucleares, los RXRs, cuya superficie de dimerización está localizada en el segundo dedo de zinc en la “caja D”. La heterodimerización con estos receptores incrementa dramáticamente la unión de los TRs a los TREs (Yen, 2001) en presencia de T3. Al mismo tiempo, el receptor recluta los complejos coactivadores para obtener como resultado la estimulación de la transcripción (Plateroti y Samarut, 2018; Cheng, 2000). En presencia del ligando, los receptores son llamados holoreceptores; mientras que, en ausencia del ligando a través de la reclusión de otras moléculas se generan complejos de represión transcripcional a los que llamamos aporeceptores. A pesar de que los TRs son más estables como heterodímeros, los TRs pueden unirse a los TREs

como monómeros u homodímeros, sin embargo, esta unión es relativamente débil debido a la rápida disociación de los complejos TR-TRE (Plateroti y Samarut, 2018).

### Domino de Unión al Ligando

La función del LBD no es únicamente la unión al ligando para que de manera consecuente se inicie la transcripción, pues cuando hay ausencia de ligando el receptor actúa como represor. Este dominio consiste en doce hélices alfa que al unirse a T3 crean en conjunto una bolsa hidrofóbica en la que T3 se encuentra en el interior (Sladek, 2011). La bolsa hidrofóbica está formada por estrechamientos discontinuos a lo largo de todo el dominio. La región del carboxilo terminal formada por la hélice 12 contribuye como parte de la superficie hidrofóbica que une al ligando, sometiéndose a un mayor cambio conformacional tras la unión al ligando, por lo que las posiciones de esta hélice determinan si el TR puede interactuar con los complejos coactivadores (Yen, 2001).

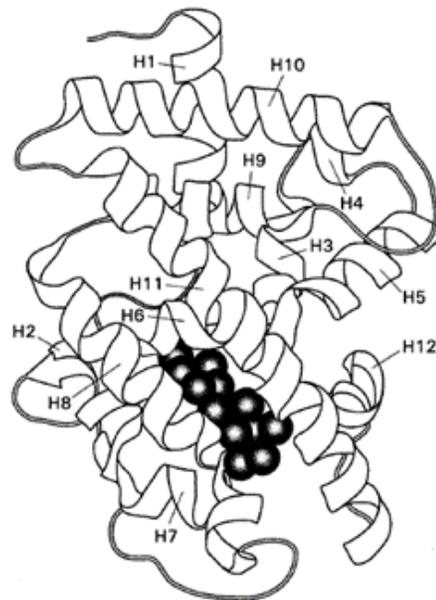


Figura 9. Estructura cristalina del dominio de unión al ligando TR $\alpha$ 1, se señala a las hélices alfa y el ligando está representado en negro. Tomada de Yen (2001).

La idea de que la mayoría de los efectos de T3 era mediada por TRs nucleares fue aceptada hasta 1980 como consecuencia de una serie de investigaciones en las que se descubrió la homología con los receptores de glucocorticoides y la oncoproteína codificada por el oncogén v-erbA. Dos estudios determinaron el camino de las siguientes investigaciones: a partir de un embrión de pollo en el equipo de Vennström y, por otro lado, se hicieron caracterizaciones a partir de una placenta humana en el equipo de Evans. Ambos equipos clonaron de manera independiente los genes y demostraron la existencia de receptores específicos para las hormonas tiroideas (Sap et al., 1986 y Weinberger et al., 1986). Los receptores nucleares hallados por los dos grupos presentaban menores diferencias en las secuencias proteicas por lo que se sugirió que se trataba de múltiples isoformas y no únicamente una variación entre especies. A partir de esos hallazgos se comenzaron a clonar isoformas de estas proteínas en distintas especies, generando el concepto de las proteínas y genes TR $\alpha$  y TR $\beta$  en vertebrados (Plateroti y Samarut, 2018; Lazar, 1993 y Yen, 2001).

### **Sistema tiroideo y el desarrollo de la retina**

Muchas son las funciones de regulación que cumplen las hormonas tiroideas (en la tabla 1 uno se resumen los efectos fisiológicos de las HTs). El desarrollo de la retina tiene mucho en común con el desarrollo de otras estructuras neurales. Entre los campos más recientes se encuentra el rol de las hormonas en el desarrollo de la neuroretina, T3 induce una variedad de efectos en los tejidos neurales. De manera general, durante el desarrollo de la retina se producen primero las células ganglionares, seguido de las amacrinas, los conos fotorreceptores y las células horizontales y al final se generan bastones fotorreceptores, células bipolares y células gliales de Müller. Basado en el conocimiento sobre el desarrollo de la retina, las HTs pueden participar en el desarrollo de uno de los siete tipos celulares. En los últimos años, se han publicado una serie de reportes en los que se intenta esclarecer el papel de las hormonas en el desarrollo del ojo en roedores, pollos, peces y anfibios (Mackin et al., 2010; Roberts et al., 2005; Ng et al., 2001 y Forrest et al., 1990). Actualmente, se vincula de manera puntual la

expresión de una isoforma específica de los TR con el desarrollo de fotorreceptores específicos de la retina, el cual es objetivo en el presente estudio.

Tabla 1. Efectos fisiológicos de las TH'S.

<b>SISTEMA</b>	<b>EFECTOS</b>
<b>CARDIOVASCULAR</b>	Aumenta la frecuencia cardíaca Aumenta la fuerza de las contracciones cardíacas Aumenta el gasto cardíaco como resultado de los dos efectos anteriores Promueve la vasodilatación periférica
<b>NERVIOSO CENTRAL</b>	Esencial para el desarrollo normal del cerebro como el crecimiento cerebeloso y la mielinización nerviosa Necesario para el desarrollo intelectual normal en infantes Necesario para la estabilidad emocional en adultos
<b>GASTROINTESTINAL</b>	Aumenta el apetito Aumenta la secreción de "jugos digestivos" Aumenta la motilidad gástrica
<b>HEMATOPOYÉTICO METABÓLICO</b>	Influye en la eritropoyesis Afecta profundamente el metabolismo oxidativo Aumenta el consumo de oxígeno en todos los tejidos, excepto el cerebro, las gónadas y el bazo Promueve la producción de calor Influye en la síntesis y degradación de carbohidratos, grasas y proteínas
<b>RESPIRATORIO</b>	Influye en el desarrollo pulmonar Necesario para la producción de surfactante Aumenta la frecuencia y la profundidad de las respiraciones
<b>ESQUELÉTICO</b>	Promueve indirectamente la formación de crecimiento mediante acciones en la glándula pituitaria Actúa sinérgicamente con la hormona del crecimiento y otros factores de crecimiento que promueven la formación ósea Afecta directamente la maduración esquelética Necesario para la progresión del desarrollo dental y la erupción
<b>PIEL</b>	Necesario para el crecimiento y la maduración de la epidermis y los folículos pilosos

*Tomada y modificada de Kirsten (2000).*

# **ANTECEDENTES**

## **Regulación transcripcional**

### **Papel de la señalización tiroidea en el desarrollo del sistema nervioso central**

En el desarrollo del sistema nervioso central (SNC), la importancia de las HTs es clara. Cuando un paciente presenta hipotiroidismo, su condición es caracterizada por retraso mental además de sordera y ataxia, resultados de una severa deficiencia de HTs durante el periodo fetal y neonatal. Diversas áreas y tipos celulares del SNC participan en la producción y secreción activa de T3, aunque al igual que en otros tejidos existen áreas en las que algunas moléculas relacionadas con la señalización tiroidea se expresan en mayores niveles. Por ejemplo, el transportador MCT8 se expresa en distintas poblaciones neuronales, pero los niveles más altos de expresión de mRNA se han identificado en las estructuras neo y allocortical (ej. córtex cerebral, hipocampo, amígdala) así como en los núcleos hipotalámicos neuroendocrinos (ej. Núcleo paraventricular), mientras que OATP1C1 otro transportador de HTs se localiza mayormente en las células endoteliales capilares y las estructuras del plexo coroideo (Calza et al., 2015).

En cuanto a los receptores a HTs (TRs), todas las isoformas son expresadas en el SNC maduro, los niveles más altos de expresión se ubican en la corteza cerebelar, hipocampal y cerebral, el bulbo olfatorio, estriado y algunos núcleos hipotalámicos (Bradley et al., 1992). En el SNC los astrocitos generan 80% de T3 disponible a partir de la prohormona T4 proveniente de la circulación, mientras que las neuronas degradan T4 y T3 a la forma inactiva rT3 y 3,3'-T2 respectivamente. Así, el cerebro puede actuar como “un órgano de activación de TH” regulando de manera autónoma los niveles de las hormonas circulantes que a su vez se regulan de manera negativa a través del eje HPT. Las HTs y sus TRs determinan el desarrollo y mantenimiento adecuado del cerebro, por lo que su disponibilidad y regulación es importante. La glándula tiroidea comienza a funcionar en la tercera y última semana de desarrollo intrauterino en ratón y rata, lo que equivale a la mitad

de la gestación en un feto humano. Sin embargo, el eje tiroideo madura y comienza a funcionar hasta el final de la primera semana postnatal. La expresión de todos los transportadores de las HTs incrementa en neuronas, astrocitos y células oligodendrogiales durante la embriogénesis en los roedores, por lo que el pico de expresión coincide con el comienzo de la diferenciación neuronal y la mielinización. Así, las desyodasas (DS) también cuentan con una expresión regulada de manera tiempo-espacial y tejido-específico. El patrón de expresión de las moléculas que participan en el sistema tiroideo cambia durante el desarrollo y la maduración del CNS, regulando de manera principal la biología de las células madre neurales (NSCs) y los linajes neuronales y gliales en mamíferos y otras especies. Por ejemplo, T3 induce el desarrollo y la maduración de los oligodendrocitos a partir de las NSCs en la que, al parecer, el TR $\alpha$  es el principal mediador involucrado y en general se expresa de manera más ubicua en el SNC. El sistema tiroideo controla también la expresión de muchos genes involucrados en la diferenciación celular final, así como las proteínas del citoesqueleto, neurotrofinas y sus receptores y las proteínas de la matriz extracelular neuronal, la diferenciación y el crecimiento axonal. En condiciones hipotiroideas, el organismo se ve afectado por una reducción en la mielinización del SNC, el papel de T3 es estimular las células precursoras de oligodendrocitos (OPCs por sus siglas en inglés). La señal detiene su proliferación e inicia su diferenciación terminal a oligodendrocitos mielinizantes (Calza et al., 2015). Algunos estudios han demostrado que TR $\beta$  promueve la expresión de las proteínas de mielina MBP, CNP Y MAG y desarrolla la mielinización en el cuerpo calloso, la corteza occipital y el nervio óptico (Dong et al., 2009 y Baxi, 2014). En respuesta a la pérdida de mielina o el incremento en su demanda, las células OPCs tienen la capacidad de diferenciarse en oligodendrocitos mielinizantes maduros en organismos adultos, lo que garantiza un recambio apropiado de materia blanca en donde el sistema tiroideo juega un papel importante. Esto se ha observado en pacientes hipotiroideos comparados con pacientes sanos, pues en los pacientes enfermos se observa una reducción significativa en el volumen de materia blanca en el cerebelo y las áreas corticales. Además, la administración de T3 favorece la

reparación y neuro protección en modelos ya caracterizados en cuanto la pérdida de mielina (Calza et al., 2015). Asimismo, se sabe que los elementos que componen a la señalización tiroidea; es decir, sus receptores, transportadores y desyodasas, están involucrados en la transcripción de genes diana en el desarrollo del cerebro. Además, T3 tiene efectos no genómicos en el cerebro, su ausencia se refleja en alteraciones que no son reguladas directamente por transcripción de algún gen por lo cual de manera activa las distintas isoformas de los genes de los TRs (Basset y Williams, 2016; Moelloer y Brcker-Preuss, 2011 y Davis et al., 2009).

### **Isoformas de TR en vertebrados**

Existe una amplia diversidad molecular en TRs por lo que se han registrado distintas isoformas en diversas especies. Los TRs son exclusivos de vertebrados y se han descrito dos tipos TR $\alpha$  y TR $\beta$ , que son codificados por dos genes distintos *thra* y *thrb*, localizados en diferentes cromosomas. En el humano se localizan en el cromosoma 17 y 3 respectivamente. Los TRs han mantenido un alto grado de conservación en su secuencia proteica a lo largo de la evolución de los vertebrados (Darras et al., 2011).

Cada copia de los genes genera sus propias isoformas por empalme alternativo o un inicio de la transcripción en distintos sitios de un promotor, por lo que las isoformas de los TRs se regulan de manera transcripcional o post transcripcional mediante el mRNA que codifica a cada una (Fig. 10), mostrando patrones característicos durante el desarrollo, confiriéndoles una función particular en los diferentes tejidos (Laudet, 2001 y Lazar 1993).

Las isoformas producidas por *thra* están bien documentadas en mamíferos. En humano y ratón se ha demostrado que, a pesar de la producción de varias proteínas por este gen, únicamente TR $\alpha$ 1 cuenta con la estructura típica de los receptores incluyendo un DBD y un LBD. La proteína TR $\alpha$ 2 también llamada *c-erbA*  $\alpha$ -2 comparte con TR $\alpha$ 1 100% de homología en los primeros 370 aminoácidos; sin embargo, un empalme alternativo genera una proteína con ausencia de los 40 aminoácidos en el C-terminal del LBD y de manera adicional contiene 120 (humano) o 122 (rata, ratón) aminoácidos que no tienen homología

con el LBD, por lo que es incapaz de unir a T3, aunque es aún capaz de unirse a los TRE's. Por lo tanto, c-erbA  $\alpha$ -2 puede actuar como inhibidor de la acción de la TH compitiendo por la unión a los TRE's con receptores que si son funcionales, representando uno de los ejemplos en los que mediante splicing alternativo se codifican proteínas antagonistas. De manera interesante, no se ha encontrado un análogo de esta dominante negativa en pollo, rana ni pez cebra. Se han reportado también isoformas truncas; por ejemplo, isoformas de TR $\alpha$  transcritas a partir de un promotor interno localizado en el intrón 7 del gen *thra*. Estas isoformas carecen de DBD y LBD, en humano y en ratón el TR $\Delta\alpha$ 1 y TR $\Delta\alpha$ 2 se generan a través de este promotor alternativo (Plateroti y Samarut, 2018; Yen, 2001 y Lazar, 1993).

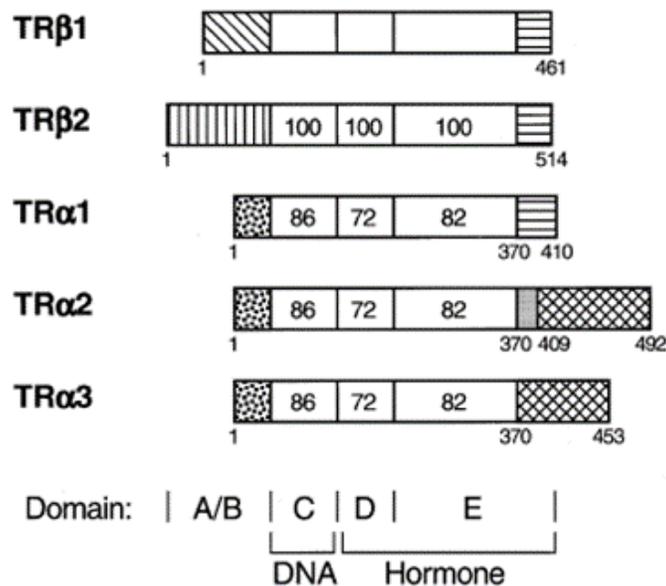


Figura 10. Isoformas de los receptores a hormonas tiroideas en ratón. Se indica la cantidad de aminoácidos y cada sombreado diferente representa secuencias totalmente diferentes. Tomado de Cheng (2000).

Por otro lado, hay dos isoformas TRs que son codificadas por el gen *thrb*. Este gen contiene dos regiones promotoras alternativas para la transcripción el mRNA que codifican las dos proteínas TR $\beta$ 1 y TR $\beta$ 2, la única diferencia entre estas dos isoformas es la longitud de su cadena amino terminal, siendo ambos auténticos receptores pues tienen alta afinidad y especificidad de unión tanto para los TRE's como para las HTs. De manera adicional en rata a partir de este gen se genera una variante más, TR $\beta$ 3, que puede participar como auténtico receptor o una

isoforma trunca que carece de la un DBD funcional (Plateroti y Samarut, 2018 y Yen, 2001). Los transcritos y proteínas de ambos genes son ampliamente expresados dentro de diferentes órganos y tejidos; sin embargo, en la rata los mRNA's TR $\alpha$ 1 y TR $\beta$ 1 son más ubicuos en los tejidos (Yen, 2001). TR $\alpha$ 1 es expresado durante el desarrollo temprano en anfibios y ratón, además tiene una alta expresión en el músculo esquelético y el tejido adiposo marrón. En el ratón, los transcritos de TR $\Delta\alpha$ 1 son principalmente encontrados en el epitelio del intestino delgado, pulmón, cerebro y durante el desarrollo temprano. También TR $\beta$ 1 es altamente expresado y representa los transcritos más abundantes en el hígado, cerebro y riñón. Por el contrario, la expresión de TR $\beta$ 2 se restringe a la pituitaria anterior, neuronas hipotalámicas en áreas específicas, así como el desarrollo del oído interno y la retina (Plateroti y Samarut, 2018). Los transcritos de la isoforma TR $\beta$ 3 han sido descritos en el pulmón, hígado y riñón de la rata y TR $\Delta\beta$ 3 en músculo esquelético, corazón, bazo y cerebro (Plateroti y Samarut, 2018). Con respecto a su secuencia de aminoácidos, las isoformas hasta ahora encontradas en humano, rata y ratón son altamente homóloga; sin embargo, hay algunas sutiles diferencias lo que sugiere que hay funciones importantes especializadas para cada isoforma, además cada isoforma se puede unir con la T3 y varios análogos de las HT con afinidad diferente. TR $\alpha$  se une a T3 con una afinidad ligeramente mayor que TR $\beta$  (Lazcano et al., 2019).

### **Isoformas en peces**

El papel de los TRs en la señalización de las HTs, está bien conservado en todos los taxa de vertebrados y a pesar de que se han encontrado homólogos en platelmintos, equinodermos y otros grupos no vertebrados, la función de los TRs como señalizadores endocrinos y sensores finales aparece en los peces, la primera clase de vertebrados con la maquinaria para sintetizar HTs y con funciones endocrinas (Blanton y Specker, 2007 y Laudet, 2001).

Del total de la diversidad de vertebrados, el 48% está representada por los peces de la cual los teleósteos ocupan el 95%. Especies como el salmón, la tilapia, el atún y otras que han resultado económicas, fáciles de cultivar y obtener y han sido objeto de estudio para concentrar en ellas investigaciones sobre el eje HPT

(Blanton y Specker, 2007). La duplicación del genoma ocurrido en teleósteos hizo que estos tengan una copia extra del gen alfa, por lo que, a diferencia de los otros cuatro grupos de vertebrados, en teleósteos existen tres genes que codifican para TRs: dos *thra* (*thra* y *thrab*) y un *thrb*. La evidencia en grupos filogenéticos más antiguos sugiere que los teleósteos tuvieron también dos copias del gen *thrb*, como se evidencia en las anguilas, un grupo de teleósteos filogenéticamente muy antiguo; sin embargo, esta copia se perdió a lo largo de la evolución (Lazcano y Orozco, 2018 y Blanton y Specker, 2007).

La primera clonación de los TRs en peces fue realizada en el lenguado japonés (*Paralichthys olivaceus*) (Yamano et al., 1994), donde se demostró la existencia de cuatro transcritos de los receptores; dos correspondientes a TR $\alpha$  y dos correspondientes a TR $\beta$ . A partir de ese trabajo se confirmó la existencia de varias isoformas de los TR en los teleósteos, que fueron clonados de manera subsecuente en especies como el pez cebra (*Danio rerio*), el salmón del atlántico (*Salmo salar*), el hipoglosos (*Hippoglossus hippoglossus*), entre otras (Lazcano y Orozco, 2018). De manera particular y debido a las ventajas que esta especie confiere, en el pez cebra se han conducido la mayoría de los trabajos relacionados a la actividad de las TH y el patrón de expresión de los TRs durante en desarrollo temprano y el crecimiento (Marelli y Persani, 2018; Darras et al., 2001 y Power et al., 2001).

Cuando se compara la expresión de ambos receptores durante el desarrollo temprano del pez cebra, se ha demostrado que en etapas tempranas TR $\alpha$  es expresado en niveles más altos que TR $\beta$ . Mientras que la expresión de ambos está presente en la transición del embrión a mitad de la blástula. Estos datos coinciden con estudios realizados en el besugo (*Sparus aurata*) (Power et al., 2001). De manera particular *thrab* (TR $\alpha$ B) se expresa en niveles altos en el SNC a las 24 hpf lo que sugiere un papel importante en su desarrollo. Su expresión también se observó en las aletas pectorales, el corazón, las células de la línea lateral y el tracto gastrointestinal (Lazcano y Orozco, 2018). Otra diferencia que se ha sugerido en la actividad de los receptores del pez cebra es que la actividad de transactivación de TR $\beta$ 1 es ligando dependiente, ya que en ausencia de T3 esta

actividad transcripcional se reprime, mientras que TR $\alpha$  tiene actividad de transactivación constitutiva en ausencia de ligando (Power et al., 2001).

En el contexto del gen *thraa*, en el pez cebra se expresa TR $\alpha$ A1 o L-TR $\alpha$ 1, una isoforma específica que contiene un C- terminal extendido al final de la hélice alfa 12 y se expresa exclusivamente en testículos u ovarios sugiriendo un rol en la reproducción. Por otra parte, mutaciones que dan origen a las isoformas truncadas en el C-terminal tienen un interés particular puesto que, al ser incapaz de unirse al ligando, estas isoformas son causantes de varias enfermedades humanas y funcionan como apo receptores. Sin embargo, su funcionalidad solo ha sido estudiada en el pez dorado (*Carassius auratus*) que expresa dos isoformas de TR $\alpha$  truncas, una que carece de 88 aminoácidos en el LBD equivalente al TR $\alpha$ 2 en mamíferos y otra que carece de manera total del LBD (TR $\alpha$ 1-t) (Nelson y Habibi, 2016).

La isoforma más representativa y funcionalmente específica en el grupo de los teleósteos es la que deriva del gen *thrb* y contiene una inserción de nueve aminoácidos al principio del LBD. Debido a esta inserción, esta isoforma se denominó receptor largo a hormonas tiroideas o L-TR $\beta$ 1, mientras que la otra isoforma codificada por este gen que carece de esa inserción se ha denominado receptor corto o S-TR $\beta$ 1 (Mendoza et al., 2013). Algunos grupos de investigación han sugerido que el patrón de expresión de la isoforma larga es más ubicuo mientras que otras investigaciones sugirieron que su expresión está restringida a la glándula pituitaria y el cerebro (Lazcano y Orozco, 2018).

Algunos otros peces expresan la isoforma con los nueve aminoácidos adicionales, más 20 aminoácidos adyacentes representando la isoforma más larga descrita hasta ahora. Sin embargo, Lazcano y Orozco (2018) identificaron codones de paro prematuro por lo que sugieren que estas isoformas pueden ser proteínas truncas. De manera interesante, una variante de TR $\beta$  con 29 aminoácidos más ha sido encontrada en varios peces pre metamórficos tempranos; sin embargo, un estudio reciente identificó esta isoforma en el bagre amarillo (*Pelteobagrus fulvidraco*) una especie que no es metamórfica, lo que sugiere que esta isoforma puede estar

presente en teleósteos metamórficos y no metamórficos (Lazcano y Orozco, 2018).

La contraparte del TR $\beta$ 2 en humanos ya ha sido descrita en pez cebra y ha sido asociada a la formación de tipos de fotorreceptores de conos en la retina (Suzuki et al., 2013).

### **Desarrollo de los conos de la retina y hormonas tiroideas**

La retina es una estructura del ojo que es en realidad una evaginación del cerebro, está constituida de receptores sensoriales para la visión llamados fotorreceptores. Hay dos tipos de fotorreceptores, los bastones y los conos. Los bastones tienen sensibilidad perceptiva baja, es decir, son sensibles a la luz de baja intensidad y funcionan bien en la oscuridad, por lo que participan cuando el ambiente está oscuro y no contribuyen en la visión en colores. Los conos, tiene un umbral sensitivo más elevado, operan mejor con luz diurna, proporcionan una mayor agudeza visual en la fóvea y participan en la visión de colores (Costanzo, 2018; Hill y Wyse, 2006). Los animales con hábitos nocturnos tienden a tener retinas constituidas solo de bastones mientras que en las retinas de los animales con hábitos diurnos predominan los conos (Hill y Wyse, 2006).

Además de los fotorreceptores, la retina contiene una red de neuronas que desarrollan los primeros estados de integración visual: las interneuronas (células horizontales, células bipolares y células amacrinas) y las células ganglionares. Las sinapsis se establecen entre las células de dos capas plexiformes, una externa y otra interna (Costanzo, 2018; Hill y Wyse, 2006). Se dice que la retina está invertida, con los fotorreceptores en la capa más externa, que es la más alejada de la luz que ingresa al ojo. Esta estructura invertida es consecuencia de la forma en la que la retina se desarrolla en el embrión (Hill y Wyse, 2006). Las capas que constituyen la retina son: 1) la capa de células pigmentarias, la retina comienza justo en el interior de la coroides constituida por esta capa de células que absorbe la luz dispersa; 2) capa fotorreceptora, constituida por los conos y bastones; 3) capa nuclear externa; en donde se ubican los núcleos celulares de los fotorreceptores; 4) capa plexiforme externa, capa sináptica que contiene

elementos pre y post sinápticos de los fotorreceptores y las interneuronas; 6) capa nuclear interna, contiene los cuerpos celulares de las interneuronas retinianas; 7) capa plexiforme, segunda capa sináptica que contiene elementos pre y post sinápticos de interneuronas retinianas; 8) capa de células ganglionares, contiene los cuerpos celulares de las células ganglionares y 9) capa del nervio óptico, axones de las células ganglionares retinianas que forman la capa del nervio óptico (Costanzo, 2018).



Figura 11. Estructura de los fotorreceptores de la retina en humano, se muestra una imagen ampliada de los segmentos externos. Tomada de Costanzo (2018).

Debido a su estructura característica, los fotorreceptores abarcan varias capas de la retina. Están compuestos por un segmento externo con membranas fotosensibles y un segmento interno con el núcleo, las mitocondrias, los otros orgánulos celulares y la terminación sináptica. Los segmentos internos de los fotorreceptores están conectados a los segmentos externos por un único cilio (Costanzo, 2018; Hill y Wyse, 2006).

Los segmentos externos de los fotorreceptores contiene a la rodopsina, una proteína que contiene un fotopigmento carotenóide que es empleado por los animales como primer paso necesario para excitar a los fotorreceptores a través de la luz. Las rodopsinas están compuestas de dos moléculas; opsinas (unas proteínas pertenecientes a la superfamilia de receptores acoplados a la proteína G) y retinal (un aldehído de la vitamina A). El retinal se conjuga con la proteína opsina por

medio de la unión del extremo aldehído con un residuo de lisina de la opsina. Se han caracterizado muchas rodopsinas con distintos espectros de absorción de luz que contienen los mismos carotenoides en consecuencia, las diferencias en las rodopsinas se deben a variaciones en la molécula de opsina (Costanzo, 2018 y Hill y Wyse, 2006).

Las distintas poblaciones de conos facilitan la visión en colores a través de las opsinas. Los bastones son largos y consisten en montones de discos de membrana doble que contiene grandes cantidades de rodopsina, las láminas están separadas de la membrana externa y formando discos aplanados mientras que en los conos tienen segmentos externos cortos con forma cónica, formados por repliegues de la membrana superficial, contienen menor rodopsina que los bastones (Costanzo, 2018; Hill y Wyse, 2006).

Los conos y los bastones transducen la luz en un potencial hiperpolarizado del receptor, es decir, convierten la energía luminosa en energía eléctrica. Un solo fotón de luz puede activar un bastón, mientras que para activar un cono se necesitan varios cientos de fotones (Costanzo, 2018 y Hill y Wyse, 2006).

La mayoría de los roedores contienen dos tipos de conos fotoreceptores. En estos, los conos expresan pigmentos fotosensibles a longitudes de onda medias (M-verde) y cortas (S-azul) y están distribuidos de manera diferencial a través de la retina (Roberts et al., 2006 y Ng et al., 2001).

Cuando la luz incide sobre los fotoreceptores, la rodopsina se transforma químicamente mediante un proceso llamado fotoisomerización, que inicia la transducción. La rodopsina activada actúa a través de una proteína G para disminuir la concentración de GMPc en el citoplasma, lo que determina el cierre de los canales de  $Na^+$  con control de puertas por GMPc que mantiene a la célula fotorreceptora despolarizada en la oscuridad. El cierre de estos canales hiperpolariza a los conos de la retina (Costanzo, 2018; Hill y Wyse, 2006).

La proyección visual principal en el cerebro de los mamíferos es el sistema geniculoestriado. La información recibida y transducida por los fotorreceptores de

la retina se transporta al SNC a través de los axones de las células ganglionares retinianas. Algunos nervios ópticos se cruzan en el quiasma óptico y otros continúan de lado ipsilateral. Los axones hacen sinapsis con una región del tálamo denominada cuerpo geniculado lateral (CGL). Las neuronas del CGL se proyectan hacia la corteza visual primaria en la parte posterior del cerebro (Costanzo, 2018; Hill y Wyse, 2006). En cuanto a los vertebrados como los peces y anfibios, los axones de las células ganglionares retinianas dejan el ojo como el nervio óptico que cruza completamente el quiasma óptico y continúa de manera contralateral hasta alcanzar una región denominada tectum óptico. Zona del SNC especializada en procesar la información visual, donde la mayoría de las fibras ópticas termina (Culverwell y Karlstrom, 2002 y Schwassmann y Kruger, 1965).

### **Eventos moleculares durante el desarrollo de la retina**

Las anomalías en la visión, así como la degeneración de los conos y los bastones en la retina, han sido asociados a mutaciones en numerosos genes existiendo un grupo de desórdenes visuales heredados congénitamente. Estos desórdenes pueden estar caracterizados por defectos como la ceguera total o errores en la discriminación de colores. Por ejemplo, en la monocromía del cono azul caracterizada por la pérdida de función de los conos L y M, las pruebas de visión de color revelan errores selectivos a lo largo de los ejes rojo y verde, en 50% de los pacientes este problema está asociado a mutaciones puntuales en los genes OPN1LW y OPN1MW que codifican a las opsinas (Weiss et al, 2012). A su vez, la expresión de las opsinas ha sido asociada a diferentes genes como el factor de transcripción cono-bastón-homeobox (CRX; por sus siglas en inglés). Furukawa et al. en 1997 demostraron mediante experimentos en ratón, que CRX tiene un rol directo en la regulación de los genes de las opsinas y su transcripción diferencial. En estos estudios se demostró que Crx solo se expresa en la capa de fotorreceptores con un pico de expresión en el día postnatal 6. Esto además, se correlaciona con el rápido incremento de la expresión celular de los genes de la

rodopsina y otros implicados en la fototransducción. La expresión de Crx persiste en la retina adulta, datos que corroboraron Eldred et al. (2018).

### **Evidencias del papel de las HTs, TRs, y el desarrollo de la retina**

Los TRs y su relación en la regulación de diversos genes deja claro que las hormonas tiroideas tienen un papel esencial en el desarrollo del SNC (Sjöberg, 1992). A partir del descubrimiento de las distintas isoformas de los TRs se generó un nuevo interés, averiguar el papel fisiológico de cada receptor. En 1990, Forrest et al. demostraron la expresión de los genes alfa y beta de TRs en el ojo de embrión de pollo; mientras que Hoskins en ese mismo año, demostró que las hormonas tiroideas desencadenan la mayor reorganización y desarrollo del ojo durante la metamorfosis en anfibios (Hoskins, 1990). Con esos antecedentes, en 1992 se demostró a través de hibridación *in situ* un patrón de expresión de mRNA específicos en las capas retinales del embrión de pollo. El mRNA identificado se expresa de manera predominante en el desarrollo temprano del ojo de pollo y codifica para una variante en el N- terminal del gen TR $\beta$ . La variante designada como TR $\beta$ 2 posee un dominio A/B terminal de 107 aminoácidos, esta región tiene una homología del 70% con el dominio N-terminal de rata que fue aislado de una línea de células pituitarias distinto del TR $\beta$  resultando ser también un TR $\beta$ 2. Ambas isoformas del gen *thrb* fueron detectadas en el ojo embrionario del pollo; sin embargo, en la retina los niveles de la nueva variante descubierta fueron más altos. A través de análisis en campo oscuro se descubrió la localización del TR $\beta$ 2 en la capa nuclear externa de la retina (ONL, por sus siglas en inglés), que es el sitio de desarrollo de las células fotorreceptoras (Sjöberg, 1992).

Al igual que en el pollo, en el ratón se han encontrado dos isoformas codificadas por el gen *thrb*, designadas como TR $\beta$ 1 y TR $\beta$ 2. Debido a la ubicación de expresión del receptor, se asoció de manera directa a la isoforma TR $\beta$ 2 con el desarrollo de los conos en la retina. Ng et al. (2001) determinaron el rol de TR $\beta$ 2 teniendo claro que su rango de expresión está restringido en mamíferos como en otros vertebrados a la ONL de la retina, la glándula pituitaria y el oído interno. Los resultados de su estudio, realizado en ratones, sugirieron que TR $\beta$ 2 tiene

funciones tejido-específicas. Además, esta isoforma no solo induce la formación de las opsinas M, sino que suprime el desarrollo de las opsinas S. En concordancia con lo anterior, los ratones mutantes para TR $\beta$ 2 presentaron niveles de expresión de las opsinas S cinco veces más de lo normal.

Roberts et al. (2005) observaron en experimentos *in vivo* e *in vitro* el patrón de expresión de las diferentes opsinas en el ratón. Estas, al ser tratadas con T3 reducen de manera significativa el número de conos que expresan a las opsinas S. Estos datos demostraron que la T3 es necesaria para inhibir la expresión de las opsinas-S en los conos dorsales de la retina. Posteriormente, Eldred et al. (2018) trabajaron con organoides retinales humanos que eran mutantes para TR $\beta$ 2 y tratados con T3. Estos estudios concluyeron que la T3 actúa a través del TR $\beta$ 2 favoreciendo el destino celular hacia conos L/M y al igual que en roedores, suprimiendo los S.

### **El sistema tiroideo durante el desarrollo del pez cebra**

El pez cebra (*Danio rerio*) ha sido durante años objeto de estudio en diversas áreas como desarrollo de vertebrados, genética del desarrollo, neurofisiología, biomedicina, entre otras, resultando ser un sistema ideal que además permite estudiar numerosos aspectos fisiológicos. Como en el resto de los vertebrados, las HTs son fundamentales para el desarrollo del pez cuya producción también es controlada por el eje HTP con estructura y función muy parecida a la de los vertebrados superiores. Por ejemplo, en los teleósteos los folículos tiroideos no forman una glándula compacta, sino que están dispersos en la región branquial que rodea la aorta branquial (Vancamp, 2018 y Marelli et al., 2016). La concentración de las HTs es alta en los huevos y larvas de algunos peces, por tanto, se ha postulado que se deben mantener los niveles adecuados de las HTs en este periodo del desarrollo. En el caso del pez cebra, mantener un estado eutiroideo promueve un buen desarrollo, participa en la transición larval y el desarrollo neural. El eje HTP se desarrolla y termina su maduración durante los primeros 3 días post fertilización por lo que la mayoría de las HTs que participan al principio del desarrollo son de origen materno, depositadas en el vitelo que se sustituye por la producción endógena a las 60 y 72 hpf cuando los tirocitos

comienzan a producir HTs endógenas (Vancamp, 2018). Los huevos del pez generalmente contienen más T4 que T3. Aunque existe una considerable variación entre especies, esto también ocurre en el pez cebra cuyo radio de expresión T4/T3 de acuerdo con mediciones realizadas por Walpita et al. (2007) varía 5:1.

### **Señalización tiroidea durante el desarrollo del pez cebra**

En el pez cebra las TH actúan a través de receptores nucleares (TRs) al igual que en el resto de los vertebrados. Los TRs regulan la expresión de los genes de manera típica por la unión en la región promotora a los TRE's. En esta especie y en otros teleósteos existen dos genes tipo TR $\alpha$  derivados de una duplicación genética denominados TR $\alpha$  (*thraa* y *thrab*), así como un gen tipo TR $\beta$  (*thrb*). Diversas isoformas originadas a partir de esos genes han sido descritas. La isoforma TR $\alpha$ 1 que presenta alta similitud con las de otros vertebrados conocida como corta y una más que de manera adicional contiene una inserción de 14 aminoácidos en el carboxilo terminal y no ha sido encontrada en ningún otro TR conocido. Esta segunda isoforma reduce la actividad transcripcional del receptor por un cambio en la afinidad de un coactivador. Por otra parte, el transcrito codificado por el segundo de los TR $\alpha$ , da origen a la proteína TRab, con una secuencia muy parecida a otras isoformas en el dominio de unión al ligando pero que de manera probable perdió funcionalidad en el amino terminal durante el transcurso de la evolución (Marelli y Persani, 2018 y Darras et al., 2001). Por otro lado, la isoforma codificada por el gen *thrb* contiene funcionalidad en los dominios LDB y el DBD, de manera similar a lo que sucede en otros vertebrados. Además, se ha descrito una segunda isoforma a partir del gen *thrb* que contiene una inserción de nueve aminoácidos en la bisagra que se ubica entre el DBD Y el LBD. Esta isoforma ha sido descrita en varias especies de teleósteos, pero no en otros vertebrados. TR $\beta$ 2 es otra isoforma descrita más reciente en el pez cebra y se caracteriza por contener un N-terminal largo que de acuerdo con las investigaciones, juega una función importante en el desarrollo de ciertos fotoreceptores de la retina (Volkov et al., 2020, Deveau et al. 2020, Marelli y Persani, 2018 y Suzuki et al., 2013).

## **Formación del ojo en el pez cebra**

De manera general, el sistema visual en el pez cebra puede ser agrupado en tres partes: todos los componentes del ojo incluyendo la retina, los sistemas que conectan a la retina con el resto de los centros visuales en el cerebro y los centros de recepción y procesamiento de información visual en el cerebro.

Esta especie es tetracromática y extiende su rango visual dentro del ultravioleta pues la capa nuclear externa contiene cuatro tipos de conos y bastones fotorreceptores, uno de estos conos es sensible a la luz ultravioleta. Esta capa está en contacto cercano con el epitelio retinal pigmentado (RPE por sus siglas en inglés). Las otras dos capas incluyen otros grupos celulares, en la capa interna se ubican los cuerpos celulares de las interneuronas bipolares, horizontales y amacrinas así como el soma de las células de Müller glía. En la capa más cercana a la lente de ojo se encuentran ubicadas células amacrinas desplazadas y las células ganglionares que forman el nervio óptico. Mientras que en la capa plexiforme interna se establecen los contactos sinápticos entre las células ganglionares y las células nucleares internas (Neuhauss, 2010).

Con una evaginación del diencéfalo, comienza el desarrollo de la retina que además es muy rápido, formando de manera posterior los lóbulos ópticos alrededor de las 10 horas post fertilización (hpf). El desarrollo se da de adentro hacia fuera, diferenciando primero las células ganglionares alrededor de las 32 hpf seguido de las células nucleares internas. Las opsinas pueden ser detectadas desde las 50 hpf y a las 55 hpf las últimas en formarse son las células de la retina externa cuyos segmentos y sus terminales sinápticas ya pueden ser detectadas en conos y bastones. De manera consecuente, aparecen las estructuras sinápticas y las neuronas de segundo orden. Alrededor de las 72 hpf el crecimiento de los axones ya se desarrolló de manera rápida y cubrieron el tectum además de haber arborizado otros nueve sitios. Estas conexiones permitirán la transmisión de la señal de los fotorreceptores cuyo desarrollo termina a los 5 días post fertilización, generando un ojo completamente funcional. A pesar de su rápida formación, la retina del pez cebra se mantiene en un continuo desarrollo, la maduración de la retina a esa edad ha sido verificada a través de sus propiedades fisiológicas y la

observación del comportamiento guiado por la visión en esta etapa larval (Neuhauss, 2010).

Mientras que los conos son subdivididos en cuatro tipos con sus respectivas opsinas, solo hay un bastón que usa rodopsina como su cromóforo. Las cuatro clases de conos en la retina del pez cebra son el rojo de longitud de onda larga (L), el verde de longitud de onda media (M), el azul de longitud de onda corta (S) y el ultravioleta (UV), estos expresan los genes de rodopsinas LWS, RH2, SW2 Y SW1 respectivamente. Mientras que los bastones expresan a la rodopsina codificada por el gen RH1. Los genes de las opsinas han sufrido múltiples duplicaciones en los peces y se han reportado dos genes funcionales de las opsinas rojas (LWS-1 y LWS-2), cuatro genes de las opsinas verdes (RH2-1, RH2-2, RH2-3 y RH2-4), mientras que solo hay una copia de los genes SWS1 y SWS2. A través de experimentos de espectrofotometría, se ha logrado medir el pico de sensibilidad de las diferentes opsinas para los bastones (501-503 nm) y los conos (cono UV, 360-361 nm; cono S, 407-417 nm; cono M, 473-480 nm; cono L 556-564 nm) (Neuhauss, 2010).

### **Papel de las hormonas tiroideas en el desarrollo del ojo del pez cebra**

Suzuki et al. en 2013 siguieron las líneas celulares precursoras de las células fotorreceptoras de la retina del pez cebra; entre los resultados encontrados mediante el uso de morfolinós (MO) para inactivar la expresión del TR $\beta$ 2, hallaron que la disminución de la expresión de este receptor reduce de manera drástica el número de conos L y causa un incremento en los conos UV. Consistente con lo que ocurre en el fenotipo del ratón, el número total de conos no se ve afectado; sin embargo, se reduce el número de los conos L. Además, TR $\beta$ 2 se expresa previo a la formación celular de los conos, por lo tanto, su expresión es necesaria para determinar el destino celular de los conos tipo L.

Mackin et al. (2019) evaluaron el efecto del tratamiento de T3 sobre la expresión de los genes que codifican para opsinas *lws1* (el gen ortólogo del *LWS* en humanos) y la opsina *lws2* (resultado de una replicación de *lws1*) en las retinas de pez cebra. Sus experimentos demostraron que el tratamiento con T3 provoca la

expresión prematura de *lws1* a los 4dpf, es decir, se expresa dos días previos al comienzo de su expresión normal. Por el contrario, *lws2* disminuye con el tratamiento de T3, por lo tanto, las HTs tienen un efecto selectivo en la regulación de los genes que codifican para los genes de las opsinas tipo L.

Recientemente, y consistente con los resultados en organismos tratados con MO, estudios realizados por Deveau et al. (2020) con mutantes de la isoforma TR $\beta$ 2, modificaron negativamente el número de conos rojos, tanto en larvas de pez como en la etapa adulta. Además, fisiológicamente observaron la pérdida de sensibilidad a la longitud de onda correspondiente a los conos rojos. Asimismo, los peces dejaron de responder de manera conductual al estímulo rojo indicando que la pérdida de los conos tipo L se extendió hasta la respuesta cerebral. Estos resultados, la mutación y la respuesta fisiológica también concuerdan con lo descrito por Volkov et al. (2020), quienes encontraron que la enzima del citocromo P450 (*cyp27c1*) participa activamente promoviendo el cambio de la vitamina A1 a A2 siendo la vitamina A2 el cromóforo base para las opsinas del cono rojo. Además, reportaron que los receptores *thraa*, *thrab* y *thrb* trabajan en conjunto promoviendo la expresión de *cyp27c1*, que en conjunto con el *thrb* en la capa externa de la retina participan en el destino celular para la formación de los conos rojos.

### **Pez cebra como modelo de estudio**

El pez cebra *Danio rerio* ha sido durante años objeto de estudio en diversas áreas como el desarrollo de los vertebrados, la genética, la neurofisiología y la biomedicina solo por mencionar algunas, resultando ser un sistema ideal que además permite estudiar numerosas enfermedades humanas.

Es un cipriniforme tropical de agua dulce que en adulto mide de 4-5 cm de largo perteneciente a la familia Cyprinidae, nativo de los ríos del norte de India, el norte de Pakistán, Nepal y Bután en el sur de Asia. Debido a sus características ahora es un pez común en los acuarios siendo una gran fuente de recursos como organismo ornamental por lo que también es fácil de obtener, darle mantenimiento y criar en el laboratorio además no requieren espacios grandes y tiene bajos

costos de producción. Se ha estudiado desde 1930, uno de los principales motivos por los que esta especie es popular en los estudios es que el embrión es transparente y se desarrolla *ex útero*, posibilitando la visualización de los eventos del desarrollo embrionario y haciéndolo más atractivo que al ratón u otra especie como organismo modelo en estudios embriológicos.

A pesar de que no poseen características sexuales secundarias ocasionalmente es difícil distinguir entre el macho y la hembra cuando estos son jóvenes, sin embargo, en los adultos el contorno corporal de la hembra grávida es suficientemente diferente a la del macho para permitir su diferenciación (Laale, 1977) esto es una ventaja pues la distinción entre hembras y machos permite seleccionarlos y obtener buenos resultados al momento de realizar las cruces. Una hembra puede producir hasta 200 huevos por desove, los alevines (cría o fase juvenil de los peces) crecen rápidamente y alcanzan la madurez sexual de 2 a 3 meses de edad. Los embriones se desarrollan rápidamente, la gastrulación esta completa dentro de las primeras diez horas post fertilización (hpf), el corazón comienza a latir al final del primer día y la mayoría de los órganos ya están formados en función dentro de los primeros cinco días de desarrollo (Beis y Stainier, 2006).

Aunado a estas ventajas existe una base de datos del pez cebra que se encuentra en línea (Zebrafish Information Network; ZFIN; [www.zfin.org](http://www.zfin.org)), proporciona al área de la investigación acceso a la información y servicios que incluye base de datos expresión genética, líneas mutantes y transgénicas además de enlaces de un genoma totalmente secuenciado (Bibliowicz et al., 2011) la mayoría de los genes descubiertos en esta especie se conservan evolutivamente y tienen homólogos en los mamíferos. Gracias a la secuenciación de todo su genoma se reveló el 70% de homología con la secuencia de nucleótidos del humano, y hasta el 84% de los genes relacionados con enfermedades humanas comparten un ortólogo en pez cebra (Vancamp y Darras, 2018).

La manipulación de estos organismos es poco invasiva y en los años recientes las nuevas habilidades experimentales han hecho que se generen muchos mutantes

de esta especie. Desde que el pionero George Streisinger estableció al pez cebra como un poderoso modelo genético se han empleado muchas técnicas genéticas a través de la mutagénesis química que incrementaron su popularidad como sistema modelo pues permite realizar el bloqueo de la expresión genética de acuerdo con las necesidades de la investigación. Esto a su vez permite que la función de cualquier gen sea fácil y rápidamente evaluada durante los primeros días de su desarrollo y las diversas funciones se han dilucidado a través de distintas técnicas como la activación de secuencia río arriba (por sus siglas en inglés GAL4-UAS), químico mutágeno etilnitrosourea (por sus siglas en inglés ENU) y etilo metanosulfonato (por sus siglas en inglés EMS). Mediante estas técnicas se inducen puntos de mutación en el pez, sin embargo, identificar la mutación es un trabajo laborioso por lo que comenzaron a emplearse otras técnicas más populares y que permiten tener una secuencia blanco específica. El uso de morfolinós, las nucleasas de dedos de zinc (ZFN) y CRISPR/CAS9 son de las más empleadas. En este sentido, la metodología de CRISPR/CAS9 resulta ser una de las técnicas de manipulación genética más eficiente. CRISPR /CAS9 se desarrolló a partir de una adaptación del sistema inmune que protege bacterias y arqueas de invasiones de virus o plásmidos. Para modificar el genoma el sistema de CRISPR/CAS9 utiliza dos componentes de tamaño pequeño, una molécula de gRNA y la nucleasa Cas9; esta característica hace posible múltiples modificaciones genéticas en los modelos empleados incluyendo el pez cebra. Con el tiempo el protocolo ha sufrido modificaciones que permiten que el sistema trabaje de manera más precisa y de manera tejido-específica (Ablain et al., 2015 y Ota et al., 2014). Por ello, el empleo de un animal con desarrollo transparente y rápido combinado con la metodología de CRISPR/CAS9 permite editar genes de forma muy rápida.

## **IMPORTANCIA DEL PROBLEMA**

En los humanos existen varias enfermedades del sistema visual entre las que se encuentran problemas para distinguir uno o varios colores. Algunas de estas enfermedades se deben a factores genéticos y a su vez algunos de ellos involucran una mutación de los genes que codifican a los TRs. Entender los mecanismos moleculares en los que se involucran los TRs para el buen desarrollo del ojo en un modelo de estudio más “sencillo”, podrían generar conocimiento básico para contender con algunos problemas de salud que afectan la visión en el humano.

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Aunque ya se han realizado estudios en el área de los receptores a hormonas tiroideas en los peces, aún falta explorar las funciones tejido-específicas de las distintas isoformas; debido a la asociación que existe entre las HTs y el TR $\beta$ 2, se explorara la pérdida de función de este gen y el impacto en el desarrollo de la retina a nivel morfológico, molecular y conductual.

## **JUSTIFICACIÓN**

Ya que estos experimentos no pueden llevarse a cabo directamente con humanos, el pez cebra es un excelente modelo de estudio por las bondades de su mantenimiento y manipulación, además, la homología en su secuencia de aminoácidos respecto a la isoforma del receptor estudiada (l-thrb+) y la humana contiene muy pocas diferencias. Por lo que esta investigación pretende generar nuevos antecedentes sobre el desarrollo de los conos de la retina y el papel de la fisiología tiroidea mediante el empleo del pez cebra con la intención de aplicar los conocimientos al área humana.

# OBJETIVOS

## OBJETIVO GENERAL

Evaluar los efectos morfológicos, moleculares y conductuales de las hormonas tiroideas y la eliminación de gen *thrb* en el desarrollo de la retina en el pez *D. rerio*.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Generar organismos mutantes mediante CRISPR/CAS9 del gen *thrb* en pez cebra.
- Analizar el efecto de la pérdida de función de la isoforma I-TR $\beta$ <sup>+</sup> de los receptores beta a hormonas tiroideas sobre la morfología del ojo y la preferencia de color en el pez cebra.
- Analizar el efecto de la administración de hormonas tiroideas sobre la morfología del ojo y la preferencia de color en el pez cebra.

## HIPÓTESIS

La isoforma denominada I-*thrb*<sup>+</sup> ortóloga del TR $\beta$ 2 en humanos participa en la formación de los conos rojos de la retina; al eliminar su expresión, se modifica la conducta sobre la preferencia de color en el pez cebra.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

Todos los experimentos se realizaron en laboratorio de receptores nucleares y neurobiología del Instituto de Neurobiología de la UNAM.

### **Mantenimiento, reproducción, colecta y almacenamiento de embriones**

Se utilizaron organismos adultos de pez cebra (*Danio rerio*) para obtener embriones. Los organismos adultos se obtuvieron de una tienda de mascotas y se habituaron de manera previa en el laboratorio en acuarios con oxígeno y un ciclo 14:10 (luz: oscuridad) a 28° C. El apareamiento se realizó de manera natural, se colocaron machos y hembras (1:2-3 respectivamente) por la tarde en pequeñas parideras con una malla que los separara del fondo para evitar el canibalismo de los embriones. Los embriones se obtuvieron de las parideras al día siguiente recién fertilizados. Una vez iniciado el ciclo de luz, se enjuagaron con agua de la llave y se colocaron en el molde para microinyección.

### **Generación de mutantes para los receptores a HTs**

La selección de la gRNA para mutar el gen *thrb* se realizó de manera previa en el laboratorio. Las secuencias del gen *thrb* se obtuvieron de la red de información del pez cebra ([www.zfin.org](http://www.zfin.org)). Para editar el genoma se siguió del protocolo establecido por Vejnar et.al, 2016 con los siguientes pasos: la puntuación del algoritmo fue asignada y aprobada en zebrafish CRISPRscan [[www.crisprscan.org](http://www.crisprscan.org)] así se asignó la sgRNA (RNA de guía único) la sgRNA I-thr $\beta$ + denominada así en el laboratorio. De manera potencial, tiene como blanco una de las isoformas descubierta de manera más reciente I-TR $\beta$ + y la gRNA *thrb*\* que tiene como blanco tres isoformas distintas codificadas por *thrb* en el pez cebra.

Las gRNAs se sintetizaron por transcripción *in vitro* de manera previa en el laboratorio usando T7 Quick High Yield RNA Synthesis Kit (New England Biolabs). El mRNA de Cas9 fue también sintetizado por transcripción *in vitro* usando un plásmido XbaI-linealizado pT3TSn-Cas9n mediante mMACHINE T3 kit (Life Technologies).

Se ensamblaron los oligos para el templado de la transcripción *in vitro* de la sgRNA I-TR $\beta$ + (plantilla taatagactcactataGGGTGAGTTATGCACCATGGgttttagagctagaa) y la Cas9 (plantilla genérica para ensamblar AAAAGCACCGACTCGGTGCCACTTTTTCAAGTTGATAACGGACTAGCCTTATT TTaacttgctatttctagctctaaaac). De manera simultánea se realizó el mismo procedimiento para otra gRNA denominada sgRNA thrb\* que elimina las tres isoformas descritas del gen *thrb*, cuya plantilla es taatagactcactataGGGAGAACCGTGAACGCCGAgtttagagctagaa y se ensambló con la misma plantilla genérica mencionada para Cas9 a través de un protocolo que emplea la Pfx DNA polimerasa. Los oligos se amplificaron a 94°C por 2 minutos, 55°C por 10 minutos y 68°C por 10 minutos (reacción de 25uL que contenía: 2.5uL de buffer de amplificación Pfx 10x, agua DEPC 19.3 uL, 0.5uL de dNTP 10nM, 1uL de ambos oligos de la sgRNA 10 $\mu$ M y de la Cas9 10 $\mu$ M respectivamente). De manera posterior se realizó la transcripción *in vitro* del templado de los oligos ensamblados con la siguiente reacción: 5uL de agua DEPC, 5uL de buffer mix dNTP, 3uL del DNA de los oligos ensamblados y 1uL de la RNA polimerasa T7. Se Incubó toda la noche a 36°C. Para la purificación se realizaron los siguientes pasos: se agregaron 20uL de agua libre de RNAsas (DEPC) y 1uL de DNAsas y se incubó la mezcla a 37°C durante 15 min, de manera inmediata se agregaron 70uL de agua para PCR para detener la reacción hasta un total de 105uL. Posteriormente, se agregaron 100uL de isopropanol y se agregó 1:10 volúmenes de acetato de sodio (3 M) pH=5.2. Toda la mezcla se incubó a -20°C por 30 minutos. Posteriormente se centrifugó a 15000 r.p.m. durante 15 minutos a 4°C., Se lavó con 500uL etanol libre de RNAsas al 70% y se centrifugó una vez más a 15000 r.p.m. durante 5 minutos. El pellet se disolvió en 20uL de agua y se midió la concentración de RNA en spectrophotometer nanodrop 1000. Se verificó la calidad de la transcripción a través de la electroforesis en gel de agarosa a una concentración del 2%.

Se preparó la mezcla de la inyección tomando en cuenta un volumen embrionario de 170 nL estimado de manera previa en el laboratorio, pues una dosis alta de

mRNA en la inyección podía resultar tóxica para el embrión. La mezcla de inyección contenía: Cas9 en una concentración de 80ng por uL, sgRNA a una concentración de 20ng por uL, KCl 0.4 M para conservar el pH de la solución, rojo fenol al 0.05% como herramienta para visualizar la microinyección y DEPC. Embriones en etapa de una célula fueron inyectados directamente usando capilares de pared delgada (1.5 OD/1.12 ID, World Precision Instruments) y una bomba para microinyección (PV 820, World Precision Instruments: hold pressure 1, eject pressure 6, period 4-5, timed 10s); con un volumen final de 1nL de la mezcla de inyección para generar a los embriones modificados (1nL contenía 80 y 20 pg de Cas9 y sgRNA por embrión, respectivamente) mientras que a los grupos control se les microinyectó 1nL de vehículo.

Una vez inyectados, los embriones se trasladaron a un plato de cultivo con medio E3 (5 $\mu$ M NaCl, 0.17 $\mu$ M KCl, 0.33 $\mu$ M CaCl, 0.33 $\mu$ M MgSO<sub>4</sub> y 250 uL de azul de metileno en una concentración de 20mg/mL) y fueron colocados en una incubadora a 28°C +/- 1°C. Se realizó un monitoreo diario de todos los embriones hasta los 5dpf edad en la que ya son larvas. Para este experimento se inyectaron grupos de 10 individuos. Cuatro grupos control que corresponden a los inyectados con la mezcla vehículo, seis grupos con la gRNA que bloquea las tres isoformas, es decir, *thrb\** y 6 grupos con la gRNA que bloquea la isoforma larga.

### **Determinación de la eficiencia de las mutaciones**

Para determinar si la inyección de las sgRNA fue eficiente en nuestros experimentos, se extrajo el DNA genómico (gDNA) para posteriormente ser secuenciado y verificar si la técnica CRISPR/CAS9 fue efectiva. Para ello, se tomaron diecisiete larvas al azar de las 120 sometidas de manera previa a la prueba de conducta (ver más adelante) y se anestesiaron mediante frío. Dos pertenecientes a los grupos control uno de cada gRNA, otras ocho pertenecientes a los grupos inyectados con la gRNA l-*thrb* + y de manera adicional siete pertenecientes a la gRNA *thrb\**.

## **Extracción del gDNA**

La extracción de DNA de cada larva se realizó de acuerdo con el procedimiento indicado en el kit Quick-gDNA Micro Prep (Zymo Research). Todo el proceso se llevó a cabo a temperatura ambiente. Las larvas se anestesiaron con frío a 4 °C y de manera posterior se homogeneizó el tejido de manera mecánica con 500µl de buffer de lisis genómica. Este lisado se centrifugó a 10,000xg por 5 minutos. El sobrenadante se transfirió a una columna de centrifugado en un tubo de colección y se centrifugó nuevamente a 10000xg por un minuto. Se desecharon los residuos del tubo de colección y se agregaron 200µl de buffer de prelavado de DNA a la columna de centrifugado y se centrifugó a 1000xg por un minuto. Se agregaron a la columna de centrifugado 500µl de buffer de lavado de DNA y se centrifugó nuevamente a 10000xg por un minuto. Por último, se transfirió la columna de centrifugado a un tubo de microcentrífuga y se agregaron 15µl de buffer de elución de DNA, se incubaron 5 minutos a temperatura ambiente, se centrifugaron por 30 segundos y se midió la concentración de cada muestra en el Nanodrop 1000.

## **PCR**

Se realizó la amplificación de los genes de interés para cada uno de los individuos mediante un PCR para cada muestra. En una reacción de 50µl se agregó 1µl de primer sentido 10µM (5' GACATAGCCCATGGTGTAAG 3') y 1µl de primer antisentido 10µM (5' CTTTCTTATGTGGCCCTTGC 3') que amplifican la zona que muta la sgRNA denominada l-thrb+, 25µl de Taq polimerasa, 21µl de agua, y 2 µl de la muestra de DNA. Este procedimiento se realizó para nueve larvas cuya inyección muta el gen que codifica la isoforma l-thrb+, ocho individuos mutantes y un control. Se realizó el mismo procedimiento para las otras ocho larvas pertenecientes al grupo de los mutantes thrb\*, siete de las cuales eran mutantes. Para cada muestra se utilizó el primer sentido (5' GCATGGCTACAGACTGTAAG 3') y el primer antisentido (5' GTTGTCAACAGGGAAGAGAC 3'). La PCR se corrió en las siguientes condiciones: 95° durante 3 minutos, 45 ciclos (95° durante 1 minutos, 57° durante 30 segundos y 68° durante 30 segundos) y al final 68° durante 7 minutos.

La amplificación del gen de interés se comprobó mediante una electroforesis en gel de agarosa al 2%. Se colocó en cada pozo 3 uL de muestra, 5 uL de buffer y 2 uL de agua para cada muestra y se corrió en una cámara de electroforesis con buffer TBE durante 25 minutos a 60 volts.

Para secuenciar los genes de interés se realizó un paso previo de purificación mediante el kit DNA clean & concentrator. Se agregó a cada muestra 250 µl de buffer de lavado de DNA, se transfirieron a una columna de centrifugado en un tubo de colección y se centrifugó durante 30 segundos. Se desechó el tubo de colección. La columna de colección se transfirió a un tubo de centrífuga y se agregaron a la columna 15µl de buffer de elución, se incubó a temperatura ambiente por un minuto, se centrifugó por 30 segundos y se midió la concentración de cada muestra en el Nanodrop 1000. El DNA se secuenció en la unidad de proteogenómica del Instituto y los resultados fueron recibidos por correo electrónico.

### **Tratamientos con hormonas**

Se sometió a embriones recién fertilizados a un tratamiento con hormonas. El experimento consistió en cinco grupos de entre 20 y 30 animales; los dos primeros grupos tratados con hormona T3 (Sigma-Aldrich) en concentraciones 0.1nM y 1nM, los siguientes dos grupos tratados con T2 en las mismas concentraciones 0.1nm y 1nM y un quinto grupo tratado con hidróxido de sodio (NaOH 0.5µN) en la misma concentración que estaba contenido como vehículo de las hormonas. El tratamiento se realizó mediante la aplicación de NaO. En el caso del grupo control, las hormonas diluidas y el NaOH se agregaron la concentración correspondiente a cada grupo en 7 mL del medio para la incubación de los embriones. Se realizó cambio del medio y nueva dosis de hormonas de manera diaria durante cinco días.

## Análisis conductual

La prueba de conducta se realizó mediante el protocolo establecido por Jong-Su Park et al. (2016) con modificaciones. Se utilizaron laberintos cruzados de 4 brazos de colores (rojo, azul, verde y amarillo) de 1.5 cm por lado elaborados con hojas de acrílico que fueron pintadas de un color en cada brazo como se muestra en la Figura 12. Se colocaron grupos de 10 larvas en cada laberinto. La prueba se llevó a cabo con todos los grupos inyectados, organismos control y modificados, además también se sometieron todos los grupos tratados con hormonas a esta prueba. La prueba se realizó sobre un transiluminador Hoefler con luz visible y se tomaron fotos cada tres minutos durante treinta minutos. La posición las larvas se determinó de manera manual mediante la fotografía del laberinto. De manera previa se elaboraron tres laberintos con distinto patrón en el orden del color para así eliminar el sesgo. Cada laberinto se aisló al momento de la prueba para evitar perturbaciones del ambiente. Se cuantificó el porcentaje de las larvas que permanecían en cada brazo de color en una escala del 1-100 % y se promedió el número de larvas en cada color desde el tiempo cero hasta los 30 minutos.



Figura 12. Laberinto en cruz diseñado en el laboratorio, cada brazo mide 1.5 cm de largo.

## **Histología**

Una vez aplicada la prueba de conducta se fijaron larvas de 5dpf en PFA al 4% durante toda la noche a 4°C. A la mañana siguiente se realizaron tres lavados con buffer fosfato salino (PBS) más Tween al 0.1% (PBSTw) y se criopreservaron los tejidos en trenes de sacarosa al 10, 20 y 30%. Las larvas se colocaron en cada concentración durante toda la noche a 4°C. Una vez preservadas en sacarosa al 30% se mantuvieron a 4°C hasta su uso. Para realizar los cortes del tejido se realizó el montaje de las larvas sobre hielo seco en Tissue Freezing Medium y se realizaron cortes de 5 micras en el criostato.

## **Tinción**

Las muestras fueron enviadas ya fijadas a la unidad de microscopía, en donde se realizaron los cortes y posteriormente se tiñeron para comparar la morfología de los grupos; se enviaron cinco larvas de cada grupo, tanto silvestres como mutantes y se aplicó la técnica de tinción hematoxilina-eosina. Para las observaciones en la morfología de los ojos cuyos individuos fueron sometidos a tratamientos con hormonas tiroideas se utilizaron dos tinciones, hematoxilina-eosina y Kluver-Barrera, de acuerdo con el protocolo de la unidad de microscopía del Instituto.

## RESULTADOS

### Determinación de la efectividad para generar crispantes

#### Concentraciones de DNA

Para determinar la efectividad del sistema de CRISPR/CAS9 para generar las mutaciones en los TRs, se extrajo el DNA genómico (DNAg) de las larvas microinyectadas con este sistema. Se obtuvieron las concentraciones del DNA DNAg de 17 larvas inyectadas, ocho de ellos con la gRNA que elimina la isoforma del receptor beta larga denominada I-thrb+; siete con la gRNA que noquea las tres isoformas del gen *thrb* denominada thrb\* y dos muestras de DNA de individuos silvestres que no fueron microinyectados con el sistema CRISPR/CAS9. Las concentraciones de DNA cuantificadas en un nanodrop 1000 se muestran en la Tabla 2.

Se puede observar que el primer índice de pureza 260/280 en todas las muestras es cercano a 2, además en todas las muestras la concentración de DNA fue suficiente para los requerimientos del experimento por lo que se contó con el material biológico suficiente. La concentración total (muestras resuspendidas en 15µl) se observa en la Tabla 2. Así, después de extraer satisfactoriamente el DNAg continuamos con el procesamiento de las muestras y sometimos el DNA a PCR para amplificar los genes de interés.

Tabla 2. Concentraciones de DNA genómico y sus respectivos índices de pureza obtenidas en el nanodrop 1000. La última fila corresponde a el individuo control en ambos grupos.

thrb*				I-thrb+			
Concentración (ng/μl)	Total en 15 μl	Índices de pureza 260/280    260/230		Concentración (ng/μl)	Total, en 15 μl	Índices de pureza 260/280    260/230	
27.5	412.5	1.90	0.64	50.2	753	1.92	0.21
44.6	669.0	1.90	0.75	47.7	715.5	1.90	0.13
57.9	868.5	1.90	0.62	64.8	972	1.53	0.40
50.2	753	1.86	0.30	56.7	850.5	1.92	0.17
53.3	799.5	1.90	0.86	78.5	1177.5	1.90	0.48
64.3	964.5	1.81	0.17	50	750	.90	0.13
70.7	1060.5	1.86	0.26	38.3	574.5	1.64	0.14
-	-	-	-	74.2	1113	1.86	0.20
67.7	1015.5	1.82	2.11	71.1	1066.5	1.85	2.11

### Amplificación de la zona de mutación mediante PCR

A partir del DNAg obtenido se amplificó la zona en donde tentativamente se generarían las mutaciones del gen *thrb* mediante oligos correspondientes para cada gRNA. En el caso de gRNA *thrb\** los oligos amplifican al inicio del LBD, zona en donde tentativamente se localiza la mutación. Para la gRNA *I-thrb+* los oligos amplifican en la zona del N-terminal de la isoforma que contiene el extremo N-terminal extendido. Se corrió la PCR para las muestras correspondientes y se verificó que amplificamos los productos de PCR deseados mediante la electroforesis en gel de agarosa- una vez corroborada la amplificación, se purificó este producto de PCR y se obtuvieron las siguientes concentraciones cuantificadas en el nanodrop 1000, los valores se muestran en la siguiente tabla:

Respecto a los valores en la amplificación de los genes del DNA de cada, larva los resultados muestran la pureza en las muestras amplificadas de acuerdo con los índices 260/280 y 260/230 (Tabla 3). El paso siguiente para procesar las muestras

requirió del servicio de secuenciación de ácidos nucleicos del Instituto de Neurobiología. En el caso de productos de PCR la concentración mínima debe ser 100ng/μl, todas las muestras obtenidas en el laboratorio están por arriba de esta concentración por lo que el producto de PCR de las muestras fue suficiente para la secuenciación, la concentración total se muestra en la columna que indica los 15 μL en los que se diluyó la muestra.

Tabla 3. Concentraciones del producto de PCR y sus respectivos índices de pureza obtenidas en el nanodrop 1000. La última fila corresponde a el individuo control en ambos grupos.

<b>thrb*</b>				<b>I-thrb+</b>			
<b>Concentración (ng/μl)</b>	<b>Total en 15 μl</b>	<b>Índices de pureza</b>		<b>Concentración (ng/μl)</b>	<b>Total, en 15 μl</b>	<b>Índices de pureza</b>	
		<b>260/280</b>	<b>260/230</b>			<b>260/280</b>	<b>260/230</b>
110.7	1660.5	1.90	2.27	157.8	2367	1.89	2.34
111.3	1669.5	1.90	2.33	191.7	2875.5	1.88	2.33
109.5	1642.5	1.90	2.26	123.5	1852.5	1.88	2.42
120.3	1804.5	1.86	1.54	126.8	1902	1.87	2.39
109.4	1641	1.90	2.31	130.9	1963.5	1.88	2.43
124.5	1867.5	1.90	2.42	111	1665	1.93	2.41
122.9	1843.5	1.90	2.36	117.2	1758	1.91	2.40
-	-	-	-	108.5	1627.5	1.91	2.38
117.5	1762.5	1.90	2.14	130.1	1951.5	1.83	2.33



Figura 13. Secuencia primaria de las isoformas de los receptores a hormonas tiroideas modificado de Lazcano et al. (2019). La alineación representa en color azul claro el DBD y en azul rey el LBD. Se presentan cinco isoformas entre las que se pueden observar la isoforma L-thrb+ recientemente identificada con el inserto de 29 aminoácidos y su ortólogo en humanos. El sitio blanco de la sgRNA de esta isoforma está denotado en el cuadro anaranjado mientras que la sgRNA que edita a las tres isoformas del gen thrb está señalado con el recuadro verde, en el mismo patrón de colores se representa la secuencia blanco en nucleótidos correspondiente a la zona blanco en el genoma.

## Resultado de las secuenciaciones

En la Figura 13 se muestran las gRNA que se diseñaron en el laboratorio. La primera, cuya secuencia blanco elimina las tres isoformas del gen *thrb* se muestra en el recuadro verde y la segunda, cuyo blanco es la isoforma del gen beta más larga descrita hasta ahora (TR $\beta$ 2) se muestra en el recuadro anaranjado., Esta isoforma contiene una inserción de 29 aminoácidos y una extensión en el N-terminal. Estas características la distinguen de las otras dos isoformas representadas pertenecientes al gen *thrb*. En la alineación también se puede observar la similitud del N-terminal extenso con su isoforma TR $\beta$ 2 ortóloga en humanos.

Se analizó de manera individual la secuencia de cada larva de pez para corroborar la mutación de los genes de los receptores y se obtuvo la eficiencia de la mutación para cada grupo (Tabla 4). Para la gRNA *thrb*\* la eficiencia fue del 71%, indicando que más de la mitad de los individuos inyectados presentaban la modificación genética.

En la Figura 14 se observa la secuencia de dos organismos donde A es el individuo control sin modificación genética. El electroferograma muestra la lectura constante de cada base, mientras que en B se indica con una flecha amarilla la región en la que se observa de manera clara el cambio en la resolución del electroferograma, justo en la zona donde se especulaba habría mutación en la secuencia del DNA.

Tabla 4. Individuos crispantes secuenciados se muestra el número de individuos secuenciados en ambos grupos, así como el número de individuos que resultaron con cambios genéticos para evaluar la eficiencia de la mutación.

thrb*			l-thrb+		
Número total de individuos	7	Eficiencia de la mutación %	Número total de individuos	8	Eficiencia de la mutación %
Individuos registrados con la mutación	5	71%	Individuos registrados con la mutación	4	50%
Individuos sin la mutación	2		Individuos sin la mutación	4	

Guía denominada **thrb\***

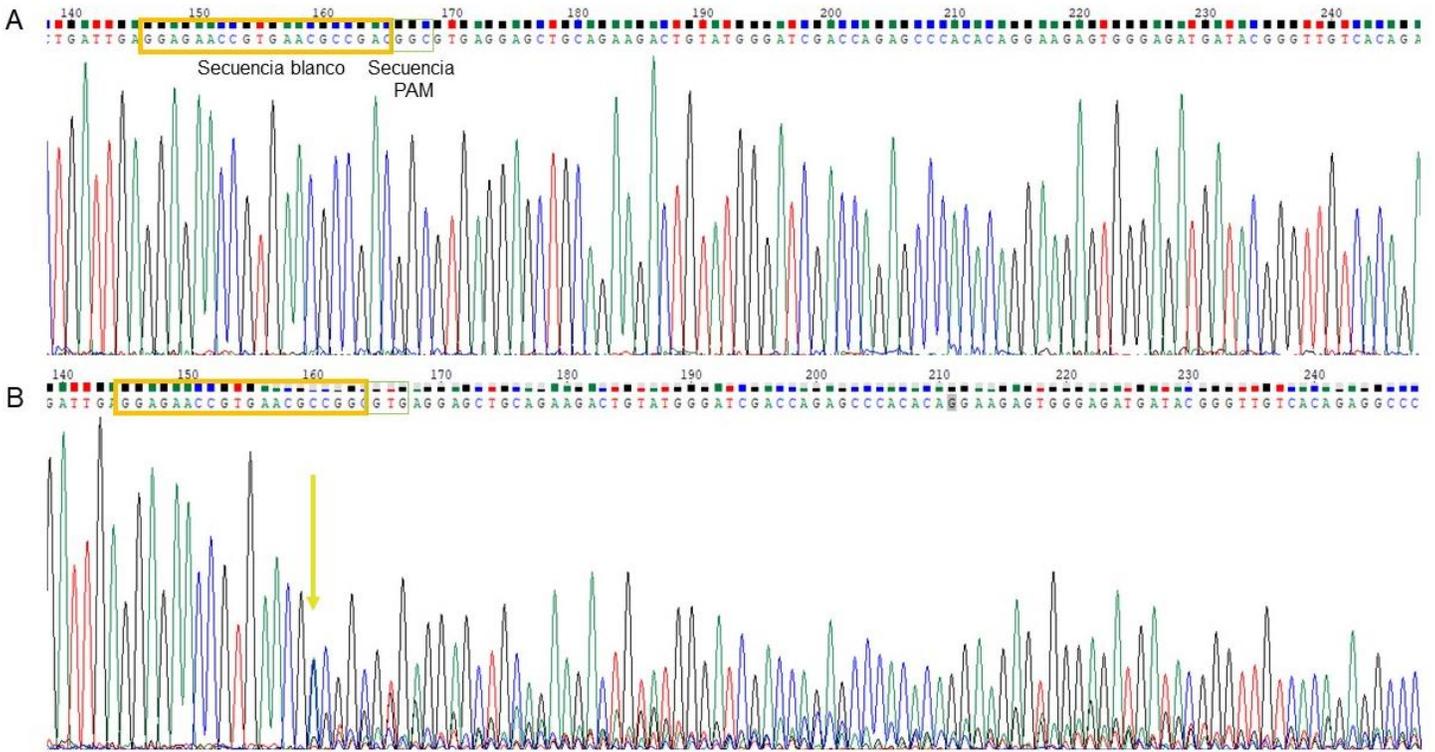


Figura 14. Electroferogramas de los animales control y críspantes para el **thrb\***. Se muestra la zona blanco de la gRNA que noquea las tres isoformas descritas del gen **thrb** (A) Individuo sin modificación genética (B) Críspante de las tres isoformas del gen **thrb**, la flecha indica la zona a partir de la cual se observó un cambio en el marco de lectura.

Guía denominada **L-thrb +**

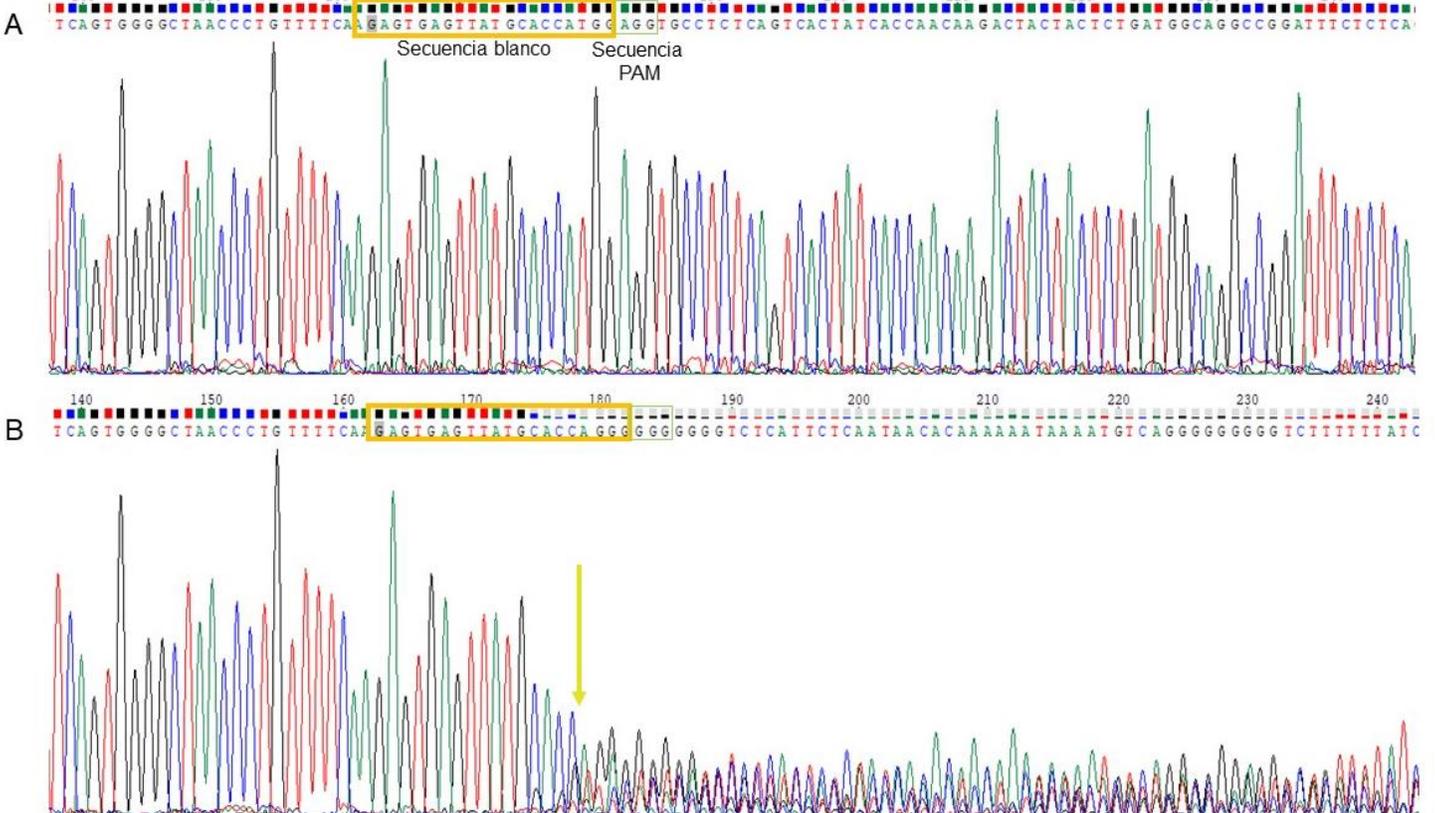


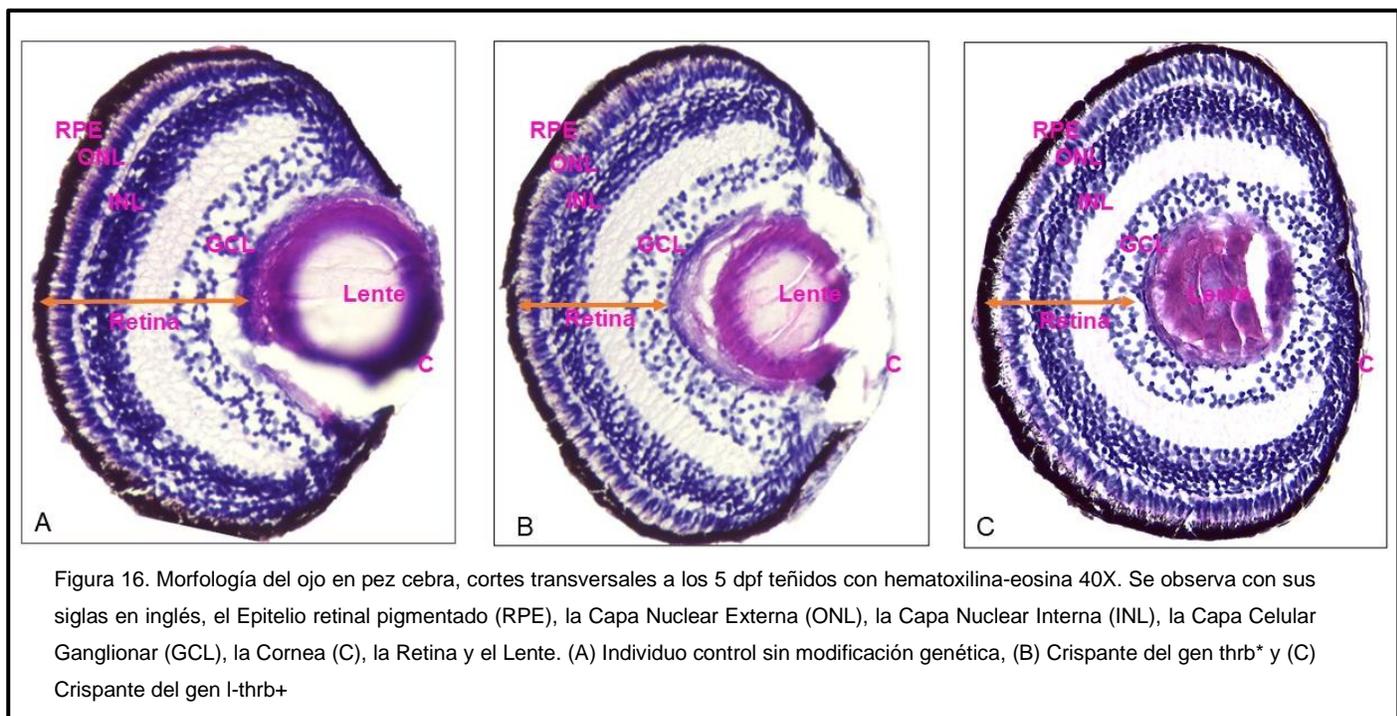
Figura 15. Electroferogramas de los animales control y críspantes para el **L-thrb+**. Se muestra la zona blanco de la gRNA que elimina la isoforma **L-thrb+** del gen **thrb** (A) Individuo sin modificación genética (B) Críspante de la isoforma **L-thrb+**, la flecha indica la zona a partir de la cual se observó un cambio en el marco de lectura.

Por otra parte, las secuencias correspondientes a la gRNA I-thrb+ arrojaron una eficiencia en la inyección del 50% (Tabla 4). Es decir, al menos la mitad de todos los organismos inyectados resultaron ser mutantes de esta isoforma. En la Figura 15 se muestran los electroferogramas obtenidos de la secuenciación de esta isoforma. En A, se muestra la secuencia de los animales control, mientras que B, representa al crispante cuyo cambio en la resolución del cromatograma se señala con la flecha amarilla.

En ambos casos se observa de manera clara que las sgRNA diseñadas para modificar las isoformas del gen *thrb* resultaron eficientes, pues es claro el cambio en el marco de lectura del genoma en las larvas. Por lo tanto, analizamos aspectos de la fisiología del ojo en animales control y animales crispantes.

## Organismos silvestres y modificados

### Morfología del ojo



La tinción en hematoxilina-eosina realizadas para los grupos nos permitió comparar la morfología del ojo en individuos silvestres y crispantes, es decir, los organismos inyectados con las sondas *thrb\** y I-*thrb+*.

Se logró observar que histológicamente no existe ningún cambio aparente en la estructura u organización del ojo en las larvas del pez cebra (Fig. 16 A, B y C). En los tres grupos se observan la capa interna y externa de la retina sin ningún cambio radical aparente. En la Figura 16 A se observa el organismo sin modificaciones genéticas, además de las capas de la retina se observa el epitelio retinal pigmentado, las células ganglionares, la lente y la córnea mientras que en la Figura 16 B y C se observa la misma organización. Por lo tanto, podemos decir que la mutación del gen *thrb* no afecta la morfología y estructura del ojo ni la retina. El daño mecánico que se puede observar en los cortes es producto de la técnica para la obtención de los cortes del ojo.

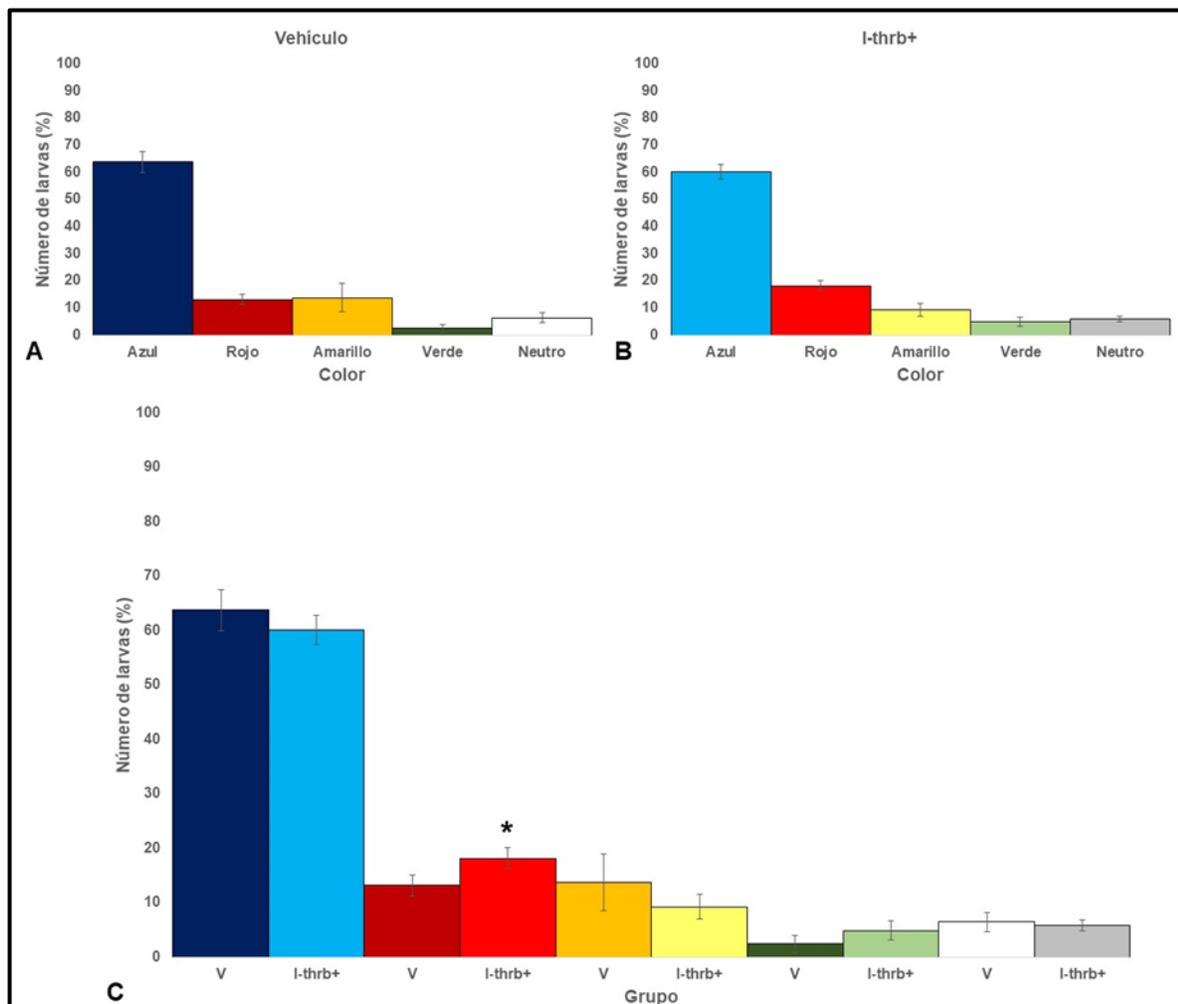


Figura 17. Preferencia del color en larvas de 5 dpf. En donde A representa la conducta en los grupos control y B representa la conducta de las larvas modificadas con la guía I-thrb+. En la gráfica C se encuentran representados ambos grupos, las barras de lado izquierdo pertenecen al grupo control o vehículo mientras que las de lado derecho indican la preferencia en las larvas modificadas, la preferencia a cada color se indica a través del color de cada barra. Los grupos con diferencias estadísticamente significativas respecto al control del color correspondiente se señalan con \* ( $p < 0.05$ ).

## Análisis conductual

A los 5dpf las larvas de pez cebra ya cuentan con un sistema visual totalmente funcional y pueden detectar las diferentes longitudes de onda a través de la retina. Se ha reportado que las larvas silvestres tienen una preferencia al color azul, rojo y verde predominando en ese orden (Jong-Su Park et al., 2016). Por ello, seleccionamos esta ventana de tiempo para determinar si la generación de larvas crispantes para el gen *thrb* modificaba el patrón de preferencia de color. Para ello, se eligieron aquellas larvas que mantenían un nado constante, característico del nado de larvas a 5dpf. Para ambas guías algunas larvas mostraron anomalías en la morfología, se observaron cambios en el plan corporal y dificultad para moverse debido a la mutación como previamente se había reportado (Lazcano et al., 2019, Fig. 18), estos animales se descartaron de los experimentos conductuales.

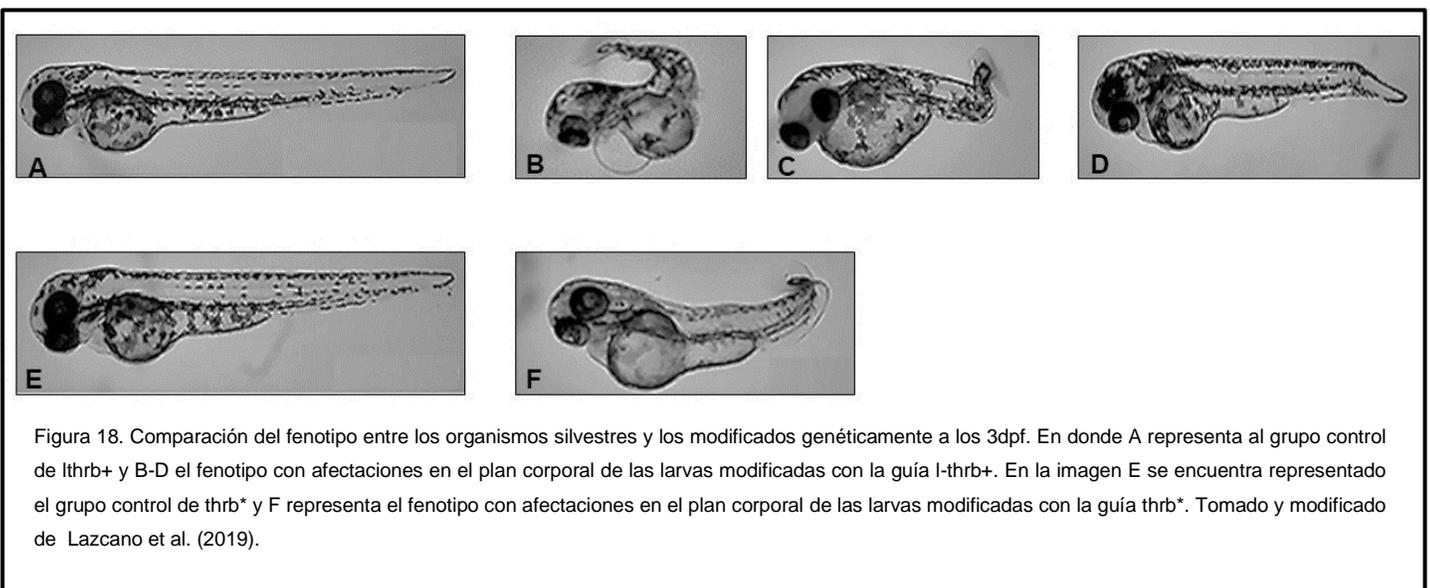
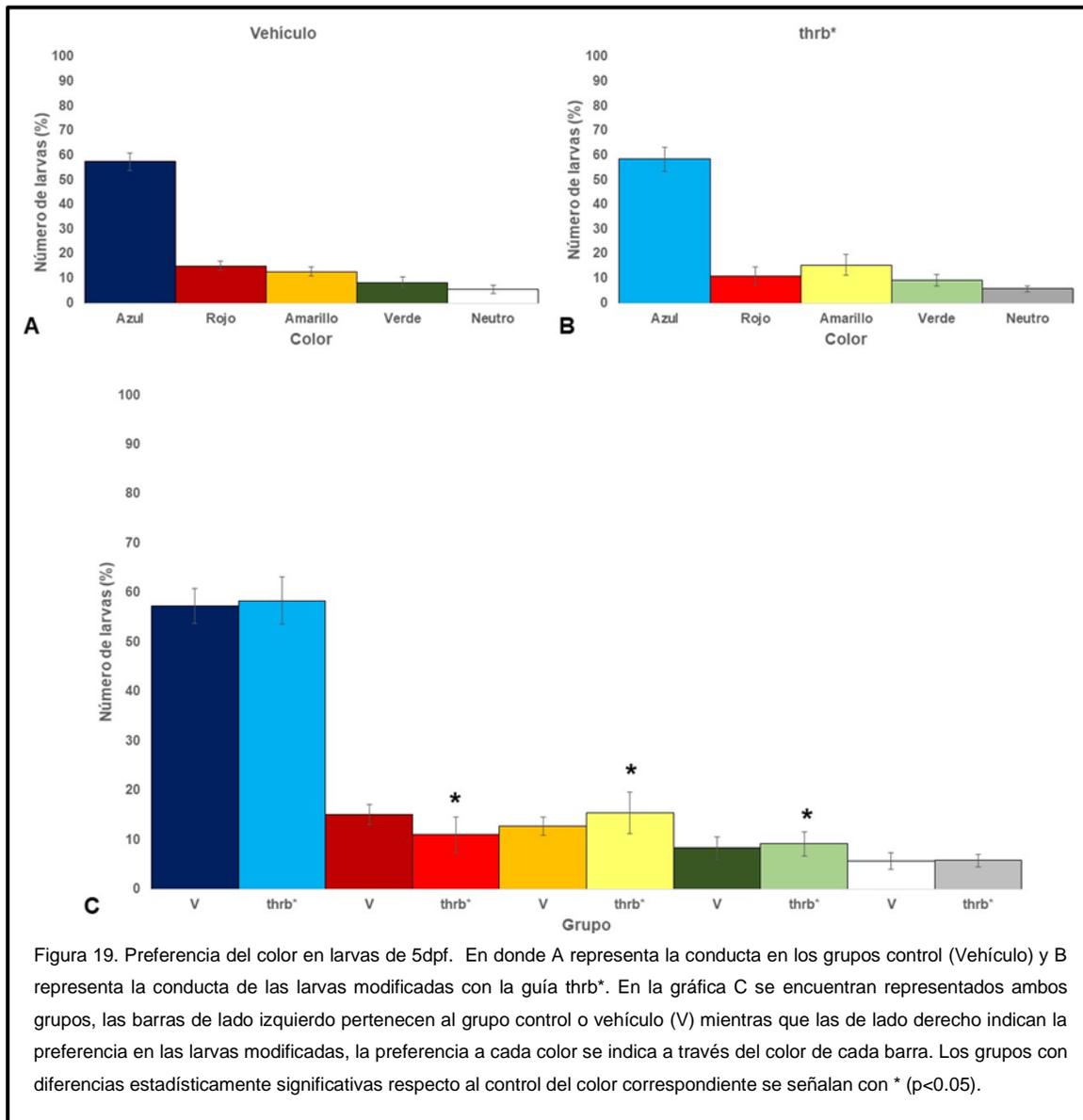


Figura 18. Comparación del fenotipo entre los organismos silvestres y los modificados genéticamente a los 3dpf. En donde A representa al grupo control de *lthrb+* y B-D el fenotipo con afectaciones en el plan corporal de las larvas modificadas con la guía *l-thrb+*. En la imagen E se encuentra representado el grupo control de *thrb\** y F representa el fenotipo con afectaciones en el plan corporal de las larvas modificadas con la guía *thrb\**. Tomado y modificado de Lazcano et al. (2019).

En los embriones inyectados con la gRNA denominada I-thrb+ que elimina solo a la isoforma (TRβ2), se observa una ligera diferencia hacia la preferencia del color azul y amarillo, a su vez se observó un ligero aumento por la preferencia a los colores rojo y verde (Fig. 17). Estos cambios en la preferencia de color solo fueron estadísticamente significativos en la preferencia hacia el color rojo cuando se compara al grupo control con el grupo de los organismos crispantes ( $p < 0.05$ ) (Fig. 17). Por otra parte, las larvas inyectadas con la gRNA *thrb\** (Fig. 19) que muta a las tres isoformas codificadas por el gen *thrb*, se observó un ligero aumento en el color azul y amarillo, un aumento mucho más discreto en el verde y una disminución en el color rojo cuando se comparan con el grupo control (Fig. 19A y 19B) con diferencias estadísticas significativas ( $p < 0.05$ ).



De manera general, no se observaron grandes cambios en la conducta de preferencia de color entre los grupos control y las larvas crispantes en ninguno de los experimentos (Tabla 5). Las larvas se comportaron de la misma manera en todos los grupos, mostrando una conducta ya reportada; es decir, una preferencia mayor por el color azul, seguido del color rojo y amarillo, al final y con menor preferencia el verde. Además, se encontraron porcentajes similares en la conducta de neutralidad, es decir, la cantidad de larvas que permanecían en el centro de la cruz lo que representa que estaban en el centro de manera aleatoria al momento de realizar la fotografía.

Tabla 5 Preferencia de color en larvas de 5dpf.

	Azul	Rojo	Amarillo	Verde	Neutro
Control	63.7 ± 3.7	13.1 ± 13.1	13.7 ± 5.1	2.4 ± 1.5	6.4 ± 1.7
l-thrb+	60.1 ± 2.6	<b>18.1 ± 1.9</b>	9.2 ± 2.2	4.8 ± 1.7	5.7 ± 1.0
Control	57.4 ± 3.5	15.2 ± 2.0	12.8 ± 1.8	8.3 ± 2.2	5.7 ± 1.6
thrb*	58.4 ± 4.7	<b>11.0 ± 3.6</b>	<b>15.4 ± 4.2</b>	<b>9.2 ± 2.4</b>	5.8 ± 1.2

Se muestran los grupos control y los organismos modificados con ambas sgRNAs. Los grupos con diferencias significativas respecto al grupo control están marcados en letras negritas.

## Tratamientos con hormonas

### Larvas tratadas con T3

La Figura 20 muestra a los organismos sometidos a dos dosis diferentes de T3 y el grupo control. Se observan algunas anomalías en el grupo control (Fig. 20A) producto del daño mecánico en el procesamiento de las muestras, sin embargo, es la única diferencia observable entre el grupo control y los grupos tratados con T3 0.1 nM (Fig. 20 B) y los tratados con T3 1 nM (Fig. 20 C). En los tres grupos se observa el epitelio retinal pigmentado, la capa nuclear externa e interna de la retina, la capa de células ganglionares, la lente y la córnea sin modificaciones.

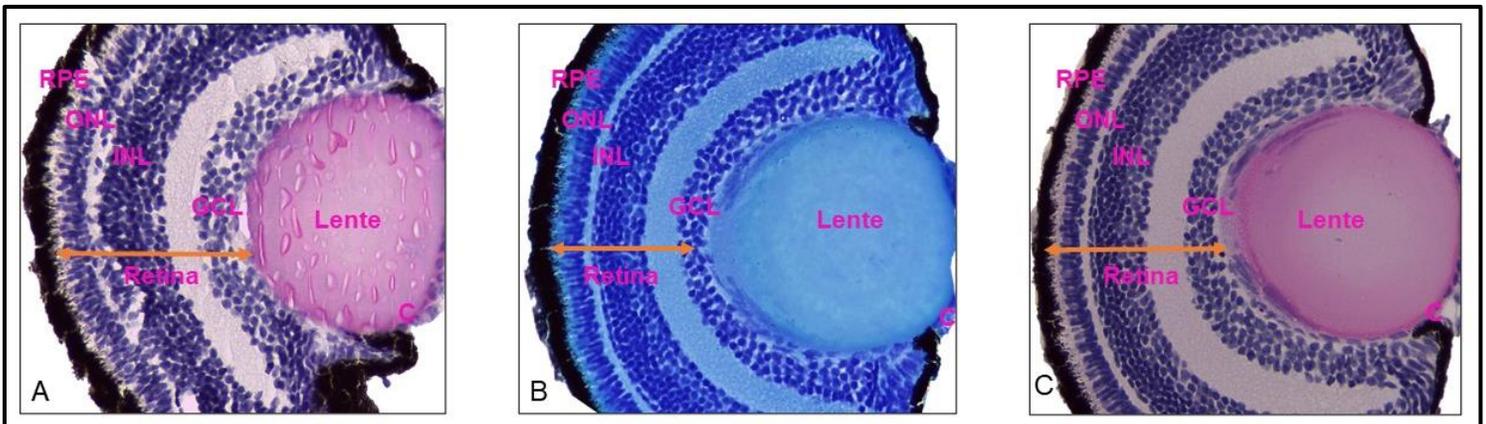


Figura 20. Morfología del ojo en pez cebra, cortes transversales a los 5 dpf teñidos con hematoxilina-eosina (A y C) y Kluver-Barrera (B) 40X. Se observa con sus siglas en inglés, el Epitelio retinal pigmentado (RPE), la Capa Nuclear Externa (ONL), la Capa Nuclear Interna (INL), la Capa Celular Ganglionar (GCL), la Cornea (C), la Retina y el Lente. (A) Individuo control sin modificación genética (B) Larva tratada con T3 0.1 nM y (C) Larva tratada con T3 1 nM.

## **Análisis de conductual**

Tomando en cuenta el comienzo de un funcionamiento total en el sistema visual, se decidió probar el efecto de la administración de HTs sobre la preferencia de color en el día 5. Al igual que en las observaciones realizadas de manera previa, la tendencia en la preferencia del color de larvas a los 5dpf se observa en la Figura 21 A, en donde predomina la preferencia hacia los colores en orden azul, rojo, amarillo y verde. Al someter a los organismos a tratamientos con hormona T3 se observaron algunos cambios notables en la conducta en ambos tratamientos (Fig. 21 B y C) con una reducción en la tendencia hacia el color verde. Se observó preferencia al color amarillo con la concentración 0.1 nM mientras que con la concentración 1 nM se observó una reducción. Respecto al color azul, resalta el aumento en la preferencia de este en el tratamiento con T3 1 nM. Por último, se observó un aumento en la preferencia hacia el color rojo en los organismos tratados con la concentración más baja de T3.

## **Larvas tratadas con T2**

En peces, la hormona 3'5'-T2 es un ligando natural alternativo de los receptores a hormonas tiroideas. En 2013 Navarrete-Ramírez et al. estudiaron el papel de esta hormona en tilapia y encontraron que este ligando se une de manera preferente al receptor TR $\beta$ 1. Por lo tanto, se decidió determinar si la administración de esta hormona pudiese tener un efecto sobre la fisiología de la retina, pues hasta el momento no hay estudios sobre esta posible interacción. La Figura 22 muestra la morfología de los ojos del pez cebra obtenida mediante cortes histológicos en las larvas sometidas a diferentes concentraciones (0.1 nM y 1 nM) de T2, así como el grupo control. Al igual que los organismos sometidos a tratamientos con T3, pese a los daños estructurales mecánicos, no se observan cambios aparentes o anomalías en la morfología del grupo control (Fig. 22 A) respecto a los grupos sometidos a tratamientos por 5 días con la hormona T2 (Fig. 22B y C). A pesar del tratamiento con T2, en los tres grupos se observa el epitelio retinal pigmentado, la capa nuclear externa e interna de la retina, la capa de células ganglionares, la lente y la córnea sin modificaciones.

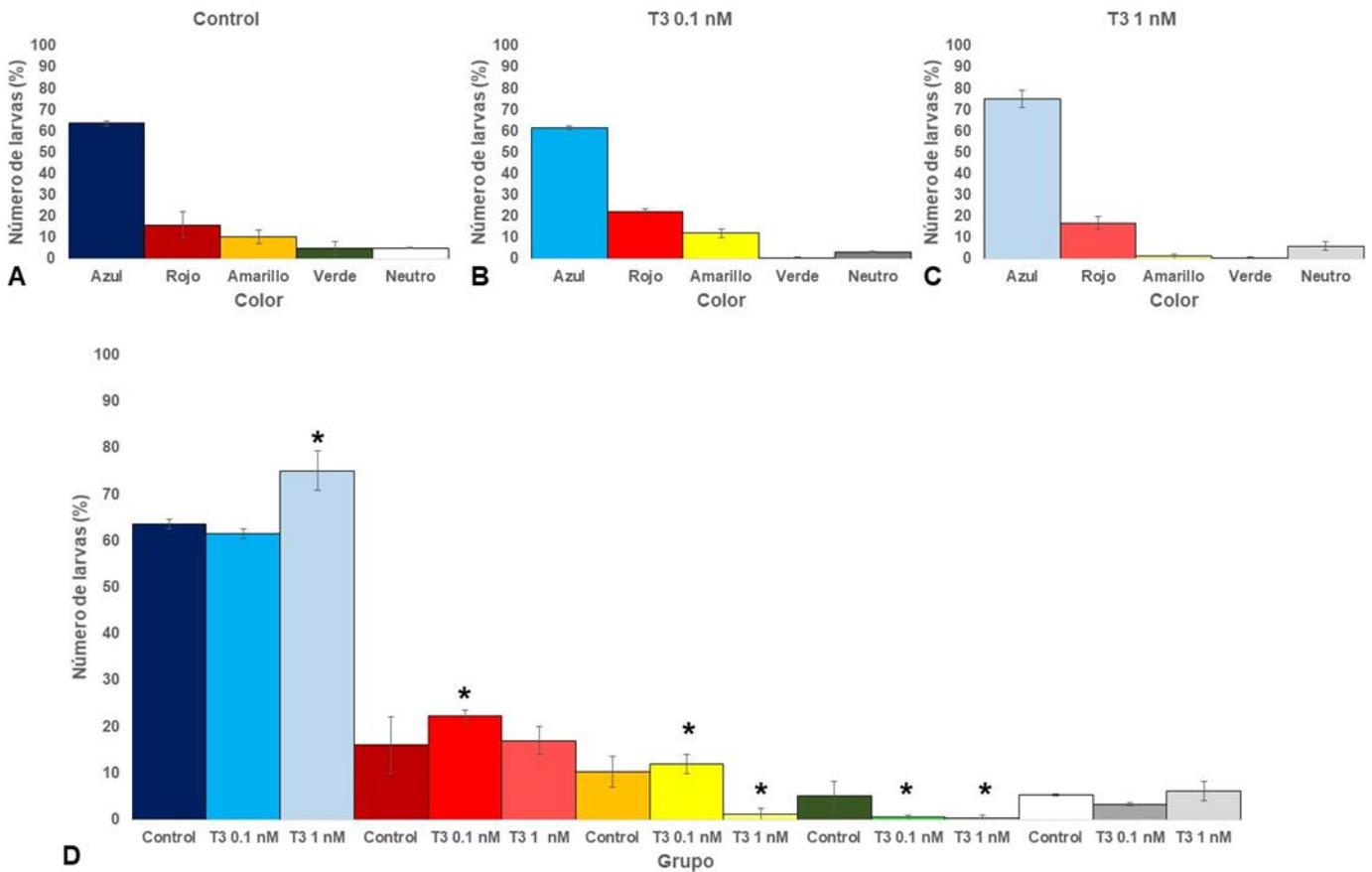


Figura 21. Preferencia del color en larvas de 5dpf, el color de la barra indica la preferencia de las larvas en la prueba de conducta. Se muestra la preferencia en la conducta comparando el grupo control con los tratamientos a hormona T3 01 nM y T3 1 nM. En donde A representa la conducta de los grupos control, B los grupos tratados con T3 0.1 nM y C a los grupos tratados con T3 1 nM. En la gráfica D se encuentran representados los tres grupos las barras del lado izquierdo pertenecen al grupo control, las del centro a los organismos tratados con T3 0.1 nM y los de las de la derecha con T3 1 nM. Los grupos de los tratamientos con diferencias estadísticamente significativas respecto al control del color correspondiente se señalan con \* ( $p < 0.05$ ).

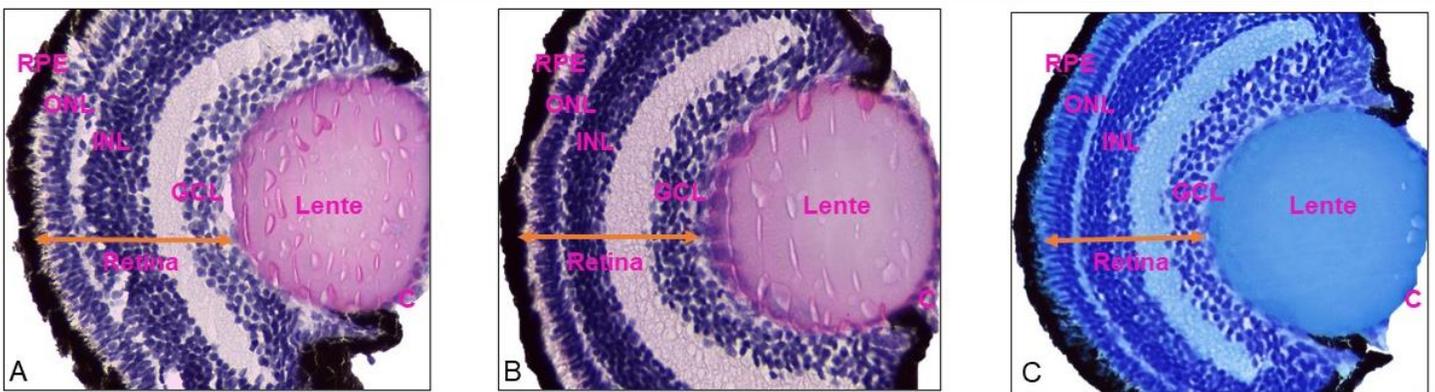


Figura 22. Morfología del ojo en pez cebra, cortes transversales a los 5 dpf teñidos con hematoxilina-eosina (A y B) y Kluver-Barrera (C) 40X. Se observa con sus siglas en inglés, el Epitelio retinal pigmentado (RPE), la Capa Nuclear Externa (ONL), la Capa Nuclear Interna (INL), la Capa Celular Ganglionar (GCL), la Cornea (C), la Retina y el Lente. (A) Individuo control sin modificación genética, (B) Larvas tratadas con T2 0.1 nM y (C) Larvas tratadas con T2 1 nM.

## Análisis conductual

Para el caso del ligando alternativo probado en el laboratorio, nuevamente observamos que la tendencia en la preferencia del color de larvas silvestres a los 5dpf como se observa en la Figura 23A, en donde predomina la preferencia hacia los colores en orden azul, rojo, amarillo, verde y neutro en donde no se observa una diferencia notable entre la preferencia por el color verde y la zona neutral.

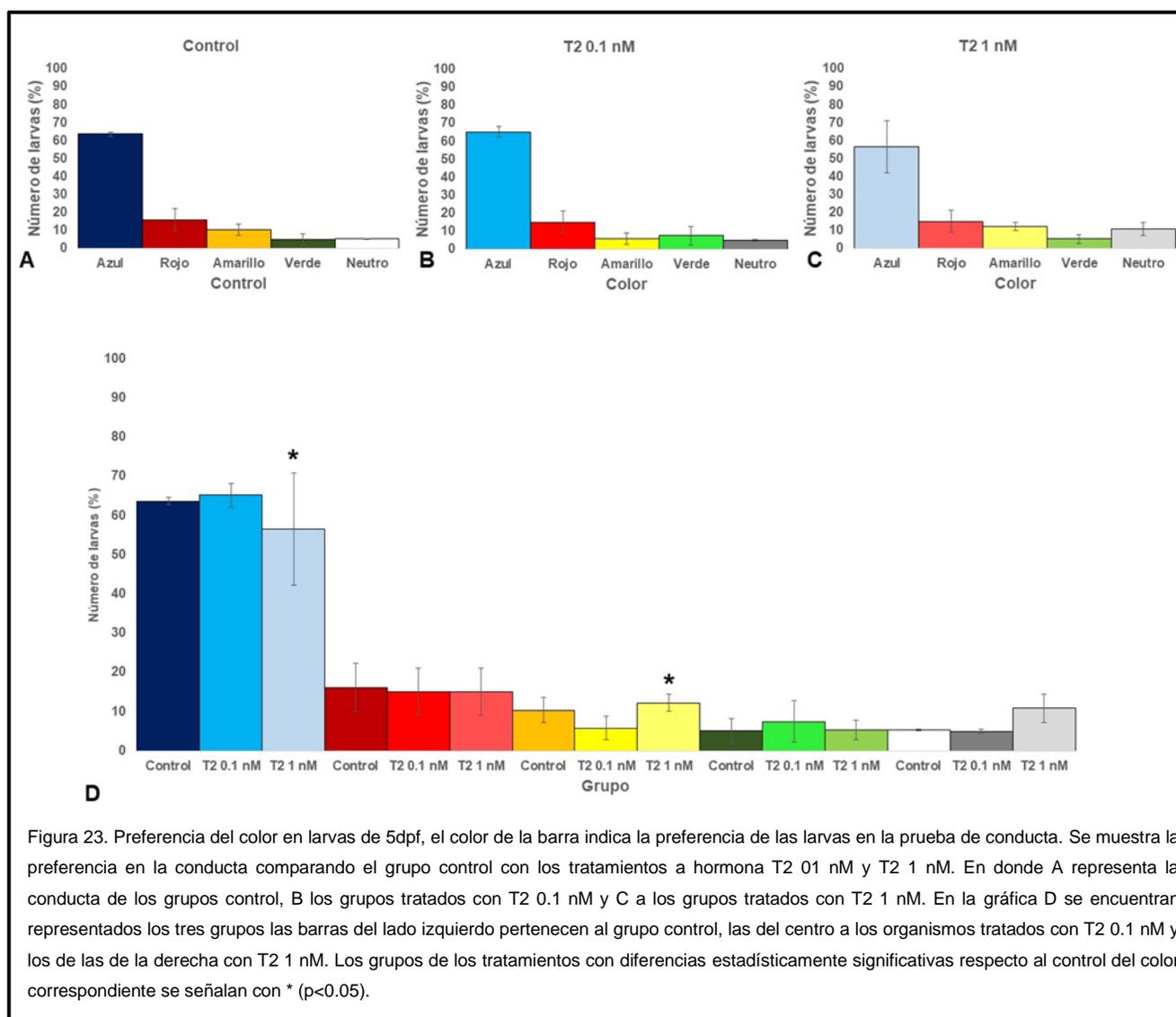


Figura 23. Preferencia del color en larvas de 5dpf, el color de la barra indica la preferencia de las larvas en la prueba de conducta. Se muestra la preferencia en la conducta comparando el grupo control con los tratamientos a hormona T2 01 nM y T2 1 nM. En donde A representa la conducta de los grupos control, B los grupos tratados con T2 0.1 nM y C a los grupos tratados con T2 1 nM. En la gráfica D se encuentran representados los tres grupos las barras del lado izquierdo pertenecen al grupo control, las del centro a los organismos tratados con T2 0.1 nM y los de las de la derecha con T2 1 nM. Los grupos de los tratamientos con diferencias estadísticamente significativas respecto al control del color correspondiente se señalan con \* ( $p < 0.05$ ).

A diferencia de los resultados de conducta en los organismos tratados con T3 (Tabla 6), en los tratamientos con hormona T2 se observaron menos cambios en la conducta de los organismos tratados (Fig. 23 B y C) cuando se comparan con el grupo control (Fig. 23 A). Los únicos cambios notables en la conducta fueron una reducción en la preferencia hacia el color azul, un aumento en la preferencia hacia el color amarillo (en los organismos tratados con T2 1 nM) y un ligero aumento por la preferencia hacia el verde (en las larvas tratadas con T2 01 nM). Además, observamos que en este experimento el cambio de conducta hacia el color rojo es mucho menos notable, es decir, no hay ninguna diferencia entre los tratamientos y el grupo control.

Tabla 6. Preferencia de color en larvas de 5dpf.

	Azul	Rojo	Amarillo	Verde	Neutro
Control	63.6 ± 0.9	16.1 ± 6.1	10.3 ± 3.2	5.1 ± 3.0	5.2 ± 0.2
T3 0.1nM	61.6 ± 1.0	<b>22.4 ± 1.2</b>	12.0 ± 2.0	<b>0.5 ± 0.5</b>	3.3 ± 0.3
T3 1 nM	<b>75.1 ± 4.2</b>	<b>17.0 ± 2.9</b>	<b>1.2 ± 1.2</b>	<b>0.4 ± 0.4</b>	6.1 ± 2.0
Control	63.6 ± 0.9	16.1 ± 6.1	10.3 ± 3.28	5.1 ± 3.0	5.2 ± 0.2
T2 0.1nM	65.2 ± 2.9	15.1 ± 6.0	5.8 ± 3.0	7.4 ± 5.2	4.9 ± 0.5
T2 1nM	<b>56.5 ± 14.3</b>	15.1 ± 6.0	<b>12.2 ± 2.2</b>	5.2 ± 2.5	10.8 ± 3.5

Se muestran los grupos control y los organismos tratados con las dos diferentes concentraciones de T3 y T2. Los grupos con diferencias significativas respecto al control están marcados en negritas

Si bien se observa un cambio en la conducta de las larvas podemos rescatar que los tratamientos con hormonas muestran mucha variación, y a diferencia del grupo control, hay cambios en el patrón de la preferencia de los colores.

## DISCUSIÓN

Dentro de los primeros intentos por descubrir el papel específico de los TRs, en los 90's vincularon la expresión de las isoformas del gen *thrb* de pollo con el desarrollo del sistema visual, relacionando a la isoforma denominada TR $\beta$ 2 con expresión específica en la capa nuclear externa de la retina (Forrest et al. 1990). Estas isoformas poseen un dominio A/B terminal más largo, que ya ha sido localizado en distintas especies incluyendo al humano. Al expresarse únicamente en la capa externa de la retina, esta isoforma con un N-terminal largo ha sido asociada de manera directa con el desarrollo de los conos en la retina (Forrest et al. 1990; Sjöberg, 1992; Ng et al., 2001; Roberts et al., 2005; Suzuki et al., 2013; Eldred et al., 2018; Makin et al., 2019 y Deveau et al., 2020).

De manera particular, en el pez cebra se encontró una isoforma más larga con una inserción de aminoácidos que fue denominada l-thrb+ (Lazcano et al., 2019). Esta similitud entre esta isoforma y su homóloga en humanos se observó en la alineación mostrada en los resultados, lo cual nos da una ventaja como herramienta para estudiar la visión en el pez cebra como modelo.

El sistema utilizado resulto concordante con los resultados obtenidos previamente en el laboratorio (Lazcano et al., 2019), se comprobó que las gRNAs sintetizadas e inyectadas causaron un cambio en la secuencia genética de los peces. Al utilizar dos guías diferentes para editar el gen *thrb* en los organismos los resultados nos facilitan la comparación entre los efectos que pueden tener ambas gRNA sobre la fisiología del ojo y la retina.

Al igual que con Deveau et al. (2020) CRISPR/Cas9 confirió ventajas sobre el tiempo de experimentación para generar la mutación que provocó pérdida de función de los genes de interés de manera permanente con respecto a las metodologías como MO utilizadas de manera anterior para el estudio de la retina en el ojo por Suzuki et al. (2013) experimentos en los que las ventanas de estudio para la experimentación se veían limitados debido a que los MO detienen la expresión de los RNAm de manera transitoria.

Si bien las hormonas tiroideas durante el desarrollo participan de manera constante en la formación del ojo, como en la metamorfosis en los anfibios (Hoskins, 1990), la manipulación de la isoforma TR $\beta$ 2 no altera la estructura general del ojo, sino que de manera puntual cambia solo la expresión de ciertos conos de la retina. Concordante con esto, en la histología de nuestros grupos experimentales no se observaron modificaciones en las capas de la retina. Es probable que para observar cambios más discretos se deba analizar la expresión de las diferentes opsinas en la retina. En algunos organismos este aspecto ya ha sido estudiado; por ejemplo, en ratones la mutación en TR $\beta$ 2 produce un defecto transcripcional en la diferenciación de los conos, pero la estructura de la retina no se ve afectada (Roberts et al., 2005 y Ng et al., 2001).

Por lo tanto, podemos deducir que la pérdida de función de la isoforma TR $\beta$ 2 conducirá a la reducción de los conos L en los organismos y esta reducción a su vez la pérdida de sensibilidad en las longitudes de onda largas, que en nuestro caso se representaron con el color rojo en las pruebas de conducta. Tomando en cuenta el patrón de conducta que siguen los peces cebra del grupo control, se comparó la conducta de estos con los organismos modificados. De acuerdo con Jong-Su Park et al. (2016), las larvas de pez cebra tienen un patrón de conducta hacia la preferencia de colores; en la que los colores preferidos siguen el orden: azul, rojo, amarillo y verde. Este dato se corroboró con los análisis de conducta obtenidos de los grupos control en el laboratorio.

En este trabajo, únicamente con la gRNA *thrb*\* se observa una disminución en la preferencia por el color rojo; esta preferencia fue estadísticamente significativa con respecto al grupo control. Es probable que el efecto que se observa empleando esta gRNA se deba a que con esta modificación genética se mutan diferentes isoformas que son codificadas por el gen *thrb*, a diferencia de la gRNA *l-thrb*+ que muta solo a la isoforma con el N-terminal extendido y que es un homólogo del TR $\beta$ 2 de los mamíferos. En este contexto, también existen algunos factores que pudieron determinar la conducta de las larvas y por los cuales, es posible que no se hayan observado cambios en la conducta por la preferencia hacia el color rojo

en los organismos mutados con la sgRNA I-thrb+. Por un lado, cabe resaltar la eficacia de la mutación del gen en los peces por lo que no todos los peces necesariamente llevan la mutación. Por otro lado, Eldred et al. (2018) mutaron la expresión del gen *thrb* en organoides humanos y concluyeron que resultaba más eficiente utilizar una gRNA que mutaba distintas isoformas del *thrb*, que usar una sonda que únicamente modificaba la expresión de la isoforma TR $\beta$ 2. Esto sugiere que es posible que otras isoformas del *thrb* puedan estar jugando un papel en la formación de conos de la retina. Otro aspecto importante que debe tomarse en cuenta es que en el caso de las larvas del pez cebra, al utilizar el sistema CRISPR/Cas9 se emplearon en los experimentos los organismos inyectados de manera directa (generación F0), por lo cual las pruebas de conducta se realizaron con organismos mosaico. Esto quiere decir que no todas las células del organismo resultan con la mutación. Por ello, una tarea futura será crear las generaciones F1 para la experimentación, lo cual asegurará que el organismo tenga mutados ambos alelos en todas sus células. Lo anterior implica que se necesitan hacer modificaciones en el protocolo de experimentación, pues pese a que se obtuvo modificación genética en los organismos, esta no generó resultados con diferencias estadísticas significativas en el caso de ambas sondas. Lo anterior es una de las causas posibles por las que no observamos cambios en la conducta de las larvas, posiblemente porque no todas las células que expresan el gen *thrb* en la retina fueron mutadas. Debido a esto y a que el cambio necesario para estudiar la fisiología en los organismos es muy puntual en la retina, se propone para futuras investigaciones aplicar una de las técnicas más recientes de CRISPR/Cas9 que muta genes de manera específica; es decir, mutar los genes de TR $\beta$ 2 únicamente en las células del ojo. Aplicando la técnica de CRISPR/Cas9 tejido-específico, podemos asegurar que el receptor está trabajando de manera específica en esa área del organismo, aplicando así la técnica con modificaciones que Ablain et al. (2015) utilizaron en sus experimentos.

En 2006 Roberts et al. demostraron *in vivo* e *in vitro* que la T3, promueve la formación de los conos M a costa de reducir de manera significativa la expresión de las opsinas S. Además, Eldred et al. (2018) reportaron que en organoides

humanos tratados con T3 se promueve la formación de los conos L/M (a través del TR $\beta$ 2), pero se suprime la formación de los S. Recientemente Volkov et al. (2020) afirman que en larvas de pez cebra sometidas a tratamientos con HTs, estas participan regulando el destino de las opsinas L y la conversión de los cromóforos base (fotopigmentos) en la visión de longitud de onda larga. Si las T3 promueven la formación temprana de los conos L en el pez cebra, entonces se esperaría un incremento en la preferencia hacia el color rojo. La modificación en la conducta indica que se está dando un cambio en la expresión de las opsinas en el pez cebra, y como se esperaba, si hubo un aumento por la preferencia hacia el color rojo con la concentración de T3 0.1nM.

Mendoza et al. (2013) proponen a T2 como un ligando alternativo, por lo que se observó que ambas HTs desencadenaron procesos fisiológicos en el organismo, sin embargo, Lazcano et al., (2019) mencionan que un incremento drástico en la concentración de estas puede ocasionar efectos tóxicos o mortalidad en las larvas de pez cebra, esto podría explicar el letargo observado en algunas de las larvas tratadas con las hormonas. Lo anterior debido a la participación de las hormonas en el desarrollo del organismo, por lo que es necesario, previo a someter a las larvas a una prueba de preferencia de color, someterlas a una prueba optocinética para verificar el correcto funcionamiento del sistema visual, pues histológicamente en ambos tratamientos con hormonas no se observaron cambios en la morfología y las capas de la retina en el ojo. En resumen, los tratamientos con T3 modificaron la conducta de las larvas; sin embargo, pueden no solo estar influyendo en las opsinas que se encuentran en los conos L y modificando la expresión de las otras opsinas, proceso que debe verificarse mediante el marcaje de las opsinas pues no se observan cambios en las capas de la retina. Respecto a la hormona T2, Mendoza et al. (2013) registraron la interacción de este ligando con una isoforma de TR $\beta$ 1, en estos experimentos no observamos cambios significativos en la conducta de las larvas, este puede deberse a que T2 pudiera no tener efectos en esta ventana de tiempo y/o que la hormona no tiene efectos particulares sobre la fisiología y desarrollo del sistema visual.

## **CONCLUSIONES**

De manera general y de acuerdo con lo esperado, se logró modificar el gen *thrb* de pez cebra y se obtuvieron organismos crispantes con el uso de dos gRNAs que modifican las secuencias de las isoformas de los receptores *thrb*. Histológicamente esta modificación en el gen *thrb* no provoca cambios en la estructura de la retina pues, no se observaron cambios ni daños en la formación de las capas de la retina a pesar de que algunas larvas presentaron anomalías en el plan corporal. Por otra parte, aunque el 50% de los organismos resultaron modificados, se observó cambio en la preferencia de color en los animales mutados para todas las isoformas del gen *thrb*. Respecto a los tratamientos con hormonas, probablemente en este caso T2 no tiene efectos sobre la fisiología del desarrollo de la retina. Por su parte, T3 sí cambió el patrón en la preferencia de los colores de manera significativa y no se observaron modificaciones aparentes o daños en la formación de las capas de la retina. Por lo anterior, la T3 y sus receptores participan en el desarrollo de la retina del pez cebra.

## **SUGERENCIA PARA TRABAJOS FUTUROS**

Para trabajos futuros será importante utilizar la técnica CRISPR de tejidos específicos para dilucidar la función específica de esta isoforma del gen *thrb* en el organismo, así como utilizar generaciones F1 para que ambos alelos en el ojo del organismo estén modificados. Además, se deben realizar observaciones puntuales enfocados al marcaje de las opsinas para verificar el cambio en la expresión de estos fotorreceptores.

## REFERENCIAS

- Ablain, J., Durand, E. M., Yang, S., Zhou, Y., & Zon, L. I. (2015). A CRISPR/Cas9 vector system for tissue-specific gene disruption in zebrafish. *Developmental cell*, 32(6), 756-764.
- Bassett, J. D., & Williams, G. R. (2016). Role of thyroid hormones in skeletal development and bone maintenance. *Endocrine reviews*, 37(2), 135-187.
- Baxi, E. G., Schott, J. T., Fairchild, A. N., Kirby, L. A., Karani, R., Uapinyoying, P., & Calabresi, P. A. (2014). A selective thyroid hormone  $\beta$  receptor agonist enhances human and rodent oligodendrocyte differentiation. *Glia*, 62(9), 1513-1529.
- Beis, D., & Stainier, D. Y. (2006). In vivo cell biology: following the zebrafish trend. *Trends in cell biology*, 16(2), 105-112.
- Blanton, M. L., & Specker, J. L. (2007). The hypothalamic-pituitary-thyroid (HPT) axis in fish and its role in fish development and reproduction. *Critical reviews in toxicology*, 37(1-2), 97-115.
- Bibliowicz, J., Tittle, R. K., & Gross, J. M. (2011). Toward a better understanding of human eye disease: Insights from the zebrafish, *Danio rerio*. *Progress in molecular biology and translational science*, 100, 287-330.
- Bradley, D. J., Towle, H. C., & Young, W. 3. (1992). Spatial and temporal expression of alpha-and beta-thyroid hormone receptor mRNAs, including the beta 2-subtype, in the developing mammalian nervous system. *Journal of Neuroscience*, 12(6), 2288-2302.
- Brent, G. A. (2012). Mechanisms of thyroid hormone action. *The Journal of clinical investigation*, 122(9), 3035-3043.
- Calzà, L., Fernández, M. and Giardino, L. (2015). Role of the thyroid system in myelination and neural connectivity. *Comprehensive Physiology*, R. Terjung (Ed.). <https://doi.org/10.1002/cphy.c140035>
- Carvalho, D. P., & Dupuy, C. (2017). Thyroid hormone biosynthesis and release. *Molecular and cellular endocrinology*, 458, 6-15.

- Cheng, S. Y. (2000). Multiple mechanisms for regulation of the transcriptional activity of thyroid hormone receptors. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, 1(1), 9-18.
- Cheng, S. Y. (2000). Multiple mechanisms for regulation of the transcriptional activity of thyroid hormone receptors. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, 1(1), 9-18.
- Citterio, C.E., Targovnik, H.M. & Arvan, P. The role of thyroglobulin in thyroid hormonogenesis. *Nat Rev Endocrinol* 15, 323–338 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41574-019-0184-8>
- Costanzo, L. S. (2018). *Fisiologia*. Elsevier.
- Culverwell, J., & Karlstrom, R. O. (2002, December). Making the connection: retinal axon guidance in the zebrafish. In *Seminars in cell & developmental biology* (Vol. 13, No. 6, pp. 497-506). Academic Press.
- Darras, V. M., Van Herck, S. L., Heijnen, M., & De Groef, B. (2011). Thyroid hormone receptors in two model species for vertebrate embryonic development: chicken and zebrafish. *Journal of thyroid research*, 2011.
- Davis, P. J., Davis, F. B., Lin, H. Y., Mousa, S. A., Zhou, M., & Luidens, M. K. (2009). Translational implications of nongenomic actions of thyroid hormone initiated at its integrin receptor. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 297(6), E1238-E1246.
- Deveau, C., Jiao, X., Suzuki, S. C., Krishnakumar, A., Yoshimatsu, T., Hejtmancik, J. F., & Nelson, R. F. (2020). Thyroid hormone receptor beta mutations alter photoreceptor development and function in *Danio rerio* (zebrafish). *PLoS genetics*, 16(6), e1008869.
- Dong, H., Yauk, C. L., Rowan-Carroll, A., You, S. H., Zoeller, R. T., Lambert, I., & Wade, M. G. (2009). Identification of thyroid hormone receptor binding sites and target genes using ChIP-on-chip in developing mouse cerebellum. *PLOS one*, 4(2), e4610.
- Easter Jr, S. S., & Nicola, G. N. (1996). The development of vision in the zebrafish (*Danio rerio*). *Developmental biology*, 180(2), 646-663.

- Eldred, K. C., Hadyniak, S. E., Hussey, K. A., Brenerman, B., Zhang, P. W., Chamling, X., & Johnston, R. J. (2018). Thyroid hormone signaling specifies cone subtypes in human retinal organoids. *Science*, 362(6411).
- Tresguerres, J. A. F. (2005). Fisiología humana: La glándula tiroides. In *Fisiología humana* (pp. 890-912).
- Forrest, D., & Ng, L. (2016). Thyroid hormone and the mammalian auditory system. In *Hearing and Hormones* (pp. 163-189). Springer, Cham.
- Forrest, D., Sjöberg, M., & Vennström, B. (1990). Contrasting developmental and tissue-specific expression of alpha and beta thyroid hormone receptor genes. *The EMBO journal*, 9(5), 1519-1528.
- Furukawa, T., Morrow, E. M., & Cepko, C. L. (1997). Crx, a novel otx-like homeobox gene, shows photoreceptor-specific expression and regulates photoreceptor differentiation. *Cell*, 91(4), 531-541.
- Glaschke, A., Weiland, J., Del Turco, D., Steiner, M., Peichl, L., & Glösmann, M. (2011). Thyroid hormone controls cone opsin expression in the retina of adult rodents. *Journal of Neuroscience*, 31(13), 4844-4851.
- Hill, R., Wyse, G., & Anderson, M. (2006). *Fisiología animal. Ed Madrid: Panamericana edit*, 106.
- Hoskins, S. G. (1990). Metamorphosis of the amphibian eye. *Journal of neurobiology*, 21(7), 970-989.
- Kirsten, D. (2000). The thyroid gland: physiology and pathophysiology. *Neonatal Network*, 19(8), 11-26.
- Koibuchi, N. (2012). Molecular mechanisms of thyroid hormone synthesis and secretion. *Nihon rinsho. Japanese journal of clinical medicine*, 70(11), 1844-1848.
- Laale, H. W. (1977). The biology and use of zebrafish, *Brachydanio rerio* in fisheries research. A literature review. *Journal of Fish Biology*, 10(2), 121-173.
- Laudet, V. (2001). Nuclear receptor genes. e *LS*. <https://doi.org/10.1242/jcs.00247>

- Lazar, M. A. (1993). Thyroid hormone receptors: multiple forms, multiple possibilities. *Endocrine reviews*, 14(2), 184-193.
- Lazcano, I., & Orozco, A. (2018). Revisiting available knowledge on teleostean thyroid hormone receptors. *General and comparative endocrinology*, 265, 128-132.
- Lazcano, I., Hernández-Puga, G., Robles, J. P., & Orozco, A. (2019). Alternative ligands for thyroid hormone receptors. *Molecular and cellular endocrinology*, 493, 110448.
- Lazcano, I., Rodríguez-Ortiz, R., Villalobos, P., Martínez-Torres, A., Solís-Saíenz, J. C., & Orozco, A. (2019). Knock-down of specific thyroid hormone receptor isoforms impairs body plan development in zebrafish. *Frontiers in endocrinology*, 10, 156.
- Mackin, R. D., Frey, R. A., Gutierrez, C., Farre, A. A., Kawamura, S., Mitchell, D. M., & Stenkamp, D. L. (2019). Endocrine regulation of multichromatic color vision. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(34), 16882-16891.
- Magner, D. B., & Antebi, A. (2008). *Caenorhabditis elegans* nuclear receptors: insights into life traits. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 19(5), 153-160.
- Marelli, F., Carra, S., Agostini, M., Cotelli, F., Peeters, R., Chatterjee, K., & Persani, L. (2016). Patterns of thyroid hormone receptor expression in zebrafish and generation of a novel model of resistance to thyroid hormone action. *Molecular and cellular endocrinology*, 424, 102-117. Marelli, F., & Persani, L. (2018). Role of thyroid hormone receptors in zebrafish development. *In Thyroid Hormone Nuclear Receptor* (pp. 287-298). Humana Press, New York, NY.
- Mendoza, A., Navarrete-Ramírez, P., Hernández-Puga, G., Villalobos, P., Holzer, G., Renaud, J. P. & Orozco, A. (2013). 3, 5-T2 is an alternative ligand for the thyroid hormone receptor  $\beta 1$ . *Endocrinology*, 154(8), 2948-2958.

- Mendoza Cisneros, A. (2015). Estudios fisiológicos y moleculares para dilucidar la función de las hormonas tiroideas: el mecanismo de acción de la 3, 5-diyodotironina (T2) en teleósteos. Universidad Nacional Autónoma de México, Colección posgrado. ISBN 9786070271083.
- Moeller, L. C., & Broecker-Preuss, M. (2011). Transcriptional regulation by nonclassical action of thyroid hormone. *Thyroid research*, 4(1), 1-7.
- Navarrete-Ramirez, P., Luna, M., & Orozco, A. (2014). 3, 5-di-iodothyronine stimulates tilapia growth through an alternate isoform of thyroid hormone receptor  $\beta 1$ . *Journal of molecular endocrinology*, 52(1), 1-9.
- Nelson, E. R., & Habibi, H. R. (2016). Thyroid hormone regulates vitellogenin by inducing estrogen receptor alpha in the goldfish liver. *Molecular and cellular endocrinology*, 436, 259-267.
- Neuhauss, S. C. (2010). Zebrafish vision: structure and function of the zebrafish visual system. In *Fish Physiology* (Vol. 29, pp. 81-122). Academic Press.
- Ng, L., Hurley, J. B., Dierks, B., Srinivas, M., Saltó, C., Vennström, B., ... & Forrest, D. (2001). A thyroid hormone receptor that is required for the development of green cone photoreceptors. *Nature genetics*, 27(1), 94-98.
- Ota, S., Hisano, Y., Ikawa, Y., & Kawahara, A. (2014). Multiple genome modifications by the CRISPR/Cas9 system in zebrafish. *Genes to Cells*, 19(7), 555-564.
- Park, J. S., Ryu, J. H., Choi, T. I., Bae, Y. K., Lee, S., Kang, H. J., & Kim, C. H. (2016). Innate color preference of zebrafish and its use in behavioral analyses. *Molecules and cells*, 39(10), 750.
- Plateroti, M y Samarut J. (Ed.). (2018). Thyroid hormone nuclear receptor. Humana Press. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7902-8>
- Power, D. M., Llewellyn, L., Faustino, M., Nowell, M. A., Björnsson, B. T., Einarsdóttir, I. E., & Sweeney, G. E. (2001). Thyroid hormones in growth and development of fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 130(4), 447-459.

- Pulgarín, S. R., Sánchez, L. M. M., & Jaramillo, L. I. J. (2016). Enfermedad tiroidea: una aproximación clínica y genética. *Archivos de Medicina (Manizales)*, 16(2), 359-372.
- Shuja, A. (2008). History of thyroid surgery. *The Professional Medical Journal*, 15(02), 295-297.
- Roberts, M. R., Hendrickson, A., McGuire, C. R., & Reh, T. A. (2005). Retinoid X receptor  $\gamma$  is necessary to establish the S-opsin gradient in cone photoreceptors of the developing mouse retina. *Investigative ophthalmology & visual science*, 46(8), 2897-2904.
- Roberts, M. R., Srinivas, M., Forrest, D., de Escobar, G. M., & Reh, T. A. (2006). Making the gradient: thyroid hormone regulates cone opsin expression in the developing mouse retina. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(16), 6218-6223.
- Sáez, P. J., Lange, S., Pérez-Acle, T., & Owen, G. I. (2010). Nuclear receptor genes: evolution. *eLS*. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0006145.pub3>
- Sap, J., Muñoz, A., Damm, K., Goldberg, Y., Ghysdael, J., Leutz, A., ... & Vennström, B. (1986). The c-erb-A protein is a high-affinity receptor for thyroid hormone. *Nature*, 324(6098), 635-640.
- Schwassmann, H. O., & Kruger, L. (1965). Organization of the visual projection upon the optic tectum of some freshwater fish. *Journal of Comparative Neurology*, 124(1), 113-126.
- Sjoberg, M., Vennstrom, B., & Forrest, D. (1992). Thyroid hormone receptors in chick retinal development: differential expression of mRNAs for alpha and N-terminal variant beta receptors. *Development*, 114(1), 39-47.
- Sladek, F. M. (2011). What are nuclear receptor ligands?. *Molecular and cellular endocrinology*, 334(1-2), 3-13.
- Shuja, A. (2008). History of thyroid surgery. *The Professional Medical Journal*, 15(02), 295-297.
- Suzuki, S. C., Bleckert, A., Williams, P. R., Takechi, M., Kawamura, S., & Wong, R. O. (2013). Cone photoreceptor types in zebrafish are generated

by symmetric terminal divisions of dedicated precursors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(37), 15109-15114.

- Vancamp, P., & Darras, V. M. (2018). From zebrafish to human: A comparative approach to elucidate the role of the thyroid hormone transporter MCT8 during brain development. *General and comparative endocrinology*, 265, 219-229.
- Volkov, L. I., Kim-Han, J. S., Saunders, L. M., Poria, D., Hughes, A. E., Kefalov, V. J., ... & Corbo, J. C. (2020). Thyroid hormone receptors mediate two distinct mechanisms of long-wavelength vision. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(26), 15262-15269.
- Weinberger, C., Thompson, C. C., Ong, E. S., Lebo, R., Gruol, D. J., & Evans, R. M. (1986). The c-erb-A gene encodes a thyroid hormone receptor. *Nature*, 324(6098), 641-646.
- Weiss, A. H., Kelly, J. P., Bisset, D., & Deeb, S. S. (2012). Reduced L-and M-and increased S-cone functions in an infant with thyroid hormone resistance due to mutations in the THR $\beta$ 2 gene. *Ophthalmic genetics*, 33(4), 187-195.
- Wu, W., Niles, E. G., & LoVerde, P. T. (2007). Thyroid hormone receptor orthologues from invertebrate species with emphasis on *Schistosoma mansoni*. *BMC evolutionary biology*, 7(1), 1-16.
- Yamano, K., & Inui, Y. (1995). cDNA cloning of thyroid hormone receptor  $\beta$  for the Japanese flounder. *General and comparative endocrinology*, 99(2), 197-203.
- Yen, P. M., Wilcox, E. C., & Chin, W. W. (1995). Steroid hormone receptors selectively affect transcriptional activation but not basal repression by thyroid hormone receptors. *Endocrinology*, 136(2), 440-445.
- Yen, P. M. (2001). Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. *Physiological reviews*, 81(3), 1097-1142.
- Zhang, J., & Lazar, M. A. (2000). The mechanism of action of thyroid hormones. *Annual review of physiology*, 62.