

PROYECTO FINAL DE INGENIERÍA

**ACCIÓN DE LAS HORMONAS TIROIDEAS SOBRE LA
EXPRESIÓN DE ENZIMAS INVOLUCRADAS EN EL
METABOLISMO DE DROGAS QUIMIOTERAPEUTICAS.**

**Aschero, María del Rosario
LU: 1019096
Licenciatura en Biotecnología.**

**Tutor:
Díaz Flaqué, María Celeste
Instituto de Investigaciones Biomedicas UCA- CONICET**

**Co-Tutor Interno:
Prada, Federico
UADE**

Junio 8, 2015



UADE

**UNIVERSIDAD ARGENTINA DE LA EMPRESA
FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS EXACTAS**

Dedicado a ustedes,

Vicu, por ser lo más lindo y lo más importante.

Mami y Papi, por acompañarme incondicionalmente, y al mismo tiempo, darme tanta libertad.

Pablito, Tati, Gui y Flor, por quedarse cuando todos se fueron, y regalarnos tantos momentos felices.

Elisita, Jo, Ju y Po, mis amigas del alma.

Agradecimientos

En primer lugar quiero agradecerle a Cele, por enseñarme con tanta dedicación y paciencia, por confiar en mí y ayudarme a sentirme todos los días un poquito más segura, por las charlas, por los mates y sus consejos. A Gra, por dejarme formar parte de su equipo de trabajo, darme tantas oportunidades y permitirme conocer el ambiente de la investigación. A Lenki, Ale, Flor y Edu, por estar siempre dispuestos a ayudarme, enseñarme y hacer que me sienta tan cómoda, en un ambiente de tanta alegría y respeto. A María Laura y Alicia, por estar siempre dispuestas a ayudarme y por su compañía. A todos mis compañeros del BIOMED por su buena predisposición para ayudar siempre y por hacer más divertidos los almuerzos.

También quiero agradecerle a Fran Sánchez, por ayudarme a conocer un lugar donde me siento tan bien y aprendo tanto todos los días.

A Fede Prada y Ana Laura, por ayudarme cada vez que lo necesite, y hacerlo siempre con tan buena predisposición.

Resumen

Los linfomas de células T (LCT) son desórdenes linfoproliferativos con curso clínico agresivo sin tratamiento específico. Los tratamientos actuales además de estar acompañados, en la mayoría de los casos, de importantes efectos adversos, son costosos para el sistema de salud. Hasta la fecha, la terapia más efectiva es el régimen de combinación de quimioterapia CHOP (Ciclofosfamida, Doxorubicina, Vincristina y Prednisona), aunque también hay una variedad de otros regímenes que han demostrado una actividad similar. Sin embargo, la mala evolución clínica de la mayoría de los pacientes es alarmante y revela claramente la necesidad de mejorar los tratamientos actuales mediante la identificación de factores que afectan la respuesta a la terapia. Las proteínas que conforman la familia del citocromo P450 (CYP450), son mayoritariamente enzimas hepáticas capaces de metabolizar compuestos tanto endógenos como exógenos. Particularmente, la subfamilia CYP3A en humanos, está involucrada en el metabolismo de más del 50% de todos los medicamentos terapéuticos utilizados actualmente en la clínica. Por lo tanto, es determinante conocer el patrón de expresión de estas enzimas en cada paciente al momento de iniciar el tratamiento quimioterapéutico.

Las hormonas tiroideas (HTs), son las principales responsables de la regulación del metabolismo en la mayoría de los tejidos normales. Las HTs actúan a través de receptores nucleares (TR), mecanismo de acción denominado clásico; y mediante proteínas de membrana que actúan como receptores, activando vías de señalización (acciones no clásicas). Trabajos previos de nuestro laboratorio demuestran que las HTs son capaces de regular la fisiología de los linfomas de células T.

El principal objetivo de este trabajo fue evaluar la capacidad de las HTs de inducir la expresión y activación metabólica de la enzima CYP3A4 y las vías de señalización involucradas en estos procesos en células de linfoma T humano.

El tratamiento de las células de linfoma T humano con HTs, indujo la activación de las proteínas STAT1 y NF- κ B como factores de transcripción a través de su receptor de

membrana, la integrina $\alpha v \beta 3$ y como producto de esta vía de señalización se vió un incremento en los niveles de ARNm, de proteína y de actividad de la enzima CYP3A4. Adicionalmente en modelos de animales portadores de linfoma T se encontró la modulación *in vivo* de las enzimas metabolizadoras de xenobióticos por el estado tiroideo.

Estos resultados indican que las HTs modulan la expresión y activación de enzimas CYP450 a través de la activación de vías de señalización en células tumorales, demostrando la importancia de evaluar el estado tiroideo y el patrón de expresión de estas enzimas en cada paciente al momento de iniciar el tratamiento quimioterapéutico.

El conocimiento de los factores que regulan la transcripción de los genes que codifican a los CYP450, así como los eventos moleculares participantes, contribuirán al mejoramiento de los modelos para la predicción de la respuesta a las terapias.

Abstract

T-cell lymphomas (TCL) are lymphoproliferative disorders with aggressive clinical course without specific treatment. Current treatments also be accompanied, in most cases, of significant side effects, are expensive for the health system. To date, the most effective therapy is the combination chemotherapy regimen CHOP (Cyclophosphamide, Doxorubicin, Vincristine and Prednisone), although there are a variety of other schemes that have shown similar activity. However, poor clinical course of most patients is alarming and clearly revealed the need to improve current treatments by identifying factors that affect the response to therapy. Proteins that form the family of cytochrome P450 (CYP450) are mostly liver enzymes, able to metabolize endogenous and exogenous compounds. Particularly, the CYP3A subfamily in humans is involved in the metabolism of more than 50% of all therapeutic drugs currently used in the clinic. Therefore, is crucial to know the pattern of expression of these enzymes in each patient at the time of initiating the chemotherapeutic treatment.

Thyroid hormones (THs) are primarily responsible for regulating metabolism in most normal tissues. The THs act through nuclear receptors (TR), mechanism of action called classic; and by membrane proteins that act as receptors, activating signalling pathways (non classical actions). Previous studies from our laboratory show that THs are capable of regulating the physiology of TCL.

The main goal of this research was to evaluate the ability of THs to induce expression and metabolic activation of CYP3A4 and signalling pathways involved in these processes in TCL.

The treatment of TCL with THs, induced the activation of the proteins STAT1 and NF κ B as transcription factors through its membrane receptor, integrin α v β 3, and an increment of mRNA, protein and enzymatic activity levels of CYP3A4, like product of this signalling pathway. Additionally, in animal models carriers of T- Lymphoma, was found in vivo, modulation of xenobiotic metabolizing enzymes by the thyroid status.

These results indicate that THs can modulate expression and enzyme activation of CYP450 through activation of signalling pathways in tumor cells, demonstrating the importance of assessing thyroid status and pattern of expression of these enzymes in each patient when starting chemotherapeutic treatment.

The knowledge of factors that regulate transcription of CYP450 and molecular events involved, contribute to the improvement of models for predicting the response to therapy.

Índice

Resumen	4
Abstract	6
1. Introducción	11
2. Antecedentes	14
2.1 Neoplasias del sistema inmunitario.	14
2.1.1 Clasificación de Neoplasias Linfoides según la Organización Mundial de la Salud	14
2.1.2 Características generales de los linfomas	16
2.1.2.1 Linfoma de Hodgkin	16
2.1.2.2 Linfoma Non-Hodgkin	16
2.1.3 Tratamiento de linfomas de células T.	18
2.2 Hormonas tiroideas	21
2.2.1 Glándula tiroides	21
2.2.2 Síntesis y metabolismo de las hormonas tiroideas	24
2.2.3 Efectos biológicos de las hormonas tiroideas	28
2.2.4 Mecanismos de acción de las hormonas tiroideas	30
2.2.4.1 Acciones clásicas de las HTs a través de los TRs	31
2.2.4.2 Acciones no clásicas de las HTs	32
2.3 Citocromo P450	34
2.3.1 Nomenclatura y clasificación de CYP450	34
2.3.2 Familia CYP3A	36
2.3.2.1 CYP3A4	37
2.3.2.2 CYP3A5	38
2.3.2.3 CYP3A7	38
2.3.2.4 CYP3A43	39
2.3.3 Actividad del citocromo P450	39
2.3.3.1 Metabolismo de compuestos xenobióticos	40
2.3.3.2 Metabolismo de drogas utilizadas en el tratamiento de linfomas T	43
3. Hipótesis	45
4. Metodología	46
4.1 Ensayos in vitro con la línea celular Jurkat	46
4.1.1. Suspensiones celulares y condiciones de cultivo	46
4.1.2 Tratamientos in vitro con la línea celular Jurkat	46
4.1.3 Transfecciones con ARN de interferencia (siARN)	48
4.1.4 Extracción de ARN total	48
4.1.5 Ensayo de transcriptasa reversa (RT)	49
4.1.6 Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real, cuantitativa(qPCR)	49
4.1.7 Análisis de expresión de proteínas por Western Blot	51
4.1.8 Ensayo de la actividad enzimática de CYP3A4	53

4.2	Análisis in vivo	54
4.2.1	Modelo de Hipertiroidismo	54
4.2.2.	Modelo de Hipotiroidismo	55
4.2.3	Determinaciones hormonales en sueros	55
4.2.3.1	Determinaciones de T ₃ y T ₄	55
4.2.3.2	Radioinmunoensayo para la determinación cuantitativa de Tirotrófina (TSH)	56
4.2.4	Obtención de tumores sólidos	57
4.3	Análisis estadístico	58
5.	Resultados	59
5.1	Estudio de la regulación de la expresión del citocromo P450 inducida por hormonas tiroideas	59
5.1.1	Estudio de la regulación de los niveles de ARNm de CYP3A4 inducida por hormonas tiroideas.	59
5.1.2	Estudio de la regulación de los niveles de ARNm de CYP3A4 inducida por hormonas tiroideas unidas a agarosa.	62
5.1.3	Estudio de la regulación de los niveles expresión de CYP3A4 inducida por hormonas tiroideas libres y unidas a agarosa.	64
5.1.4	Estudio de la actividad de CYP3A4 inducida por hormonas tiroideas libres y unidas a agarosa.	65
5.2	Identificación del receptor involucrado en los efectos iniciados en la membrana plasmática por las HTs en células de linfoma T humano.	67
5.3	Análisis de las vías de señalización activadas a través del receptor de membrana para hormonas tiroideas.	74
5.4	Evaluación de la participación de las vías de señalización descriptas en la regulación de la expresión de CYP3A4.	80
5.5	Estudio de la regulación de CYP3A en tejido hepático y tumoral de ratones eu,hipo- e hipertiroideos.	84
6.	Discusión de resultados	88
6.1	Estudio de la regulación de la expresión del citocromo P450 inducida por hormonas tiroideas.	89
6.2	Identificación del receptor involucrado en los efectos iniciados en la membrana plasmática por las HTs en células de linfoma T humano.	92
6.3	Análisis de vías de señalización activadas a través del receptor de membrana.	94
6.4	Análisis de vías de señalización activadas por HTs que participan en la regulación de CYP3A4.	95
6.5	Estudio de la regulación de CYP3A en tejido hepático y tumoral de ratones eu-, hipo- e hipertiroideos.	96
7.	Conclusiones	99
7.1	Las HTs regulan los niveles la isoenzima CYP3A4 en células de linfoma T humano	99

7.2 La integrina $\alpha\beta_3$ es el receptor de membrana para la acciones de las HTs sobre la expresión de CYP en células de linfoma T humano	99
7.3 Las HTs activan, a través de su receptor de membrana plasmática, vías de señalización vinculadas a la regulación de los niveles de CYP3A4.	100
7.4 El estado tiroideo modula los niveles de expresión de enzimas metabolizadoras de drogas en tejido hepático y tumoral murino.	102
8. Bibliografía	103

1. Introducción

Los linfomas de células T (LCT) son un grupo heterogéneo de desórdenes linfoproliferativos agresivos de considerable variación clínica, morfológica, inmunofenotípica y genética, que incluyen aproximadamente el 10-15% del total de las neoplasias linfoides. Aunque algunos subtipos pueden seguir un curso prolongado relativamente benigno, la gran mayoría de los pacientes tienen mal pronóstico, debido a la combinación de un curso clínico agresivo y a la falta de tratamientos específicos, los pacientes son tratados generalmente, con regímenes terapéuticos diseñados para linfomas de células B. Los tratamientos actuales dependen del tipo y grado del estadio de la enfermedad, de la edad, de los síntomas y del estado general del paciente. Sin embargo, este enfoque general tiene un resultado muy pobre, con recaídas comunes y pocas opciones eficaces para la terapia de rescate, lo que evidencia la necesidad de mejorar el tratamiento, por ejemplo, mediante la identificación de factores que participan en la respuesta (Foss *et al*, 2011). Por lo tanto, todo estudio cuyo objetivo sea contribuir a mejorar la calidad de vida y/o sobrevida, o a la optimización de las terapias pre-existentes disminuyendo los efectos adversos, tendrá un efecto socioeconómico netamente beneficioso.

El citocromo P450 (CYP450) es una gran y diversa súper-familia de hemoproteínas que usan un amplio rango de compuestos exógenos y endógenos como sustratos de sus reacciones enzimáticas. Las CYP de las familias 1 a 3 son enzimas metabolizantes de drogas que participan en la activación y desintoxicación de un gran número de drogas de quimioterapia (Wrighton *et al*, 1996). Se ha demostrado que los polimorfismos genéticos y los factores ambientales alteran las actividades de CYP, dando como resultado diferencias interindividuales en el efecto de los fármacos (Evans y Relling, 2004; Willkinson. 2005). Además de las variaciones de expresión tisular constitutiva de las enzimas CYP3A, que se encuentran principalmente en el hígado, se ha demostrado su presencia en diferentes tumores (Dhaini *et al*, 2003; Kapucuoglu *et al*, 2003). Debido a que los CYP3A son capaces de inactivar muchos

medicamentos contra el cáncer, una sobreexpresión de CYP3A en los tumores podría resultar en una mayor inactivación intratumoral y la consiguiente disminución de la eficacia de las drogas (Miyoshi *et al*, 2005; RodriguezAntona *et al*, 2007). Por el contrario, una expresión disminuida de estas enzimas, podría enlentecer el metabolismo de las drogas, aumentando su vida media en el organismo y potenciando los efectos secundarios que muchas veces llevan al fracaso de la terapia.

En base a lo expuesto, es determinante conocer el patrón de expresión de estas familias proteicas en cada paciente al momento de iniciar el tratamiento quimioterapéutico, para tener un pronóstico más certero del éxito de la terapia y utilizar la droga y concentración adecuada para cada caso. El conocimiento de los factores que regulan la transcripción de los genes que codifican a los CYP3A, así como los eventos moleculares participantes, contribuirían al mejoramiento de los modelos para el screening y predicción de las interacciones de medicamentos. Si bien la regulación de las enzimas CYPs ejercida por receptores nucleares hormonales ha sido bien estudiada, pocos trabajos han explorado la regulación de estos genes por las (HTs) y sus receptores de membrana plasmática en condiciones patológicas.

El **objetivo general** de este trabajo, es el estudio de las vías de señalización activadas de manera no genómica por las HTs en LCT humanos, en particular la activación de la proteína traductora de señal y activadora de la transcripción 1 (STAT1), y la síntesis de proteínas asociadas al metabolismo de drogas, CYP3A4, como uno de los productos finales de dicha activación. Los **objetivos específicos** se detallan a continuación:

- Evaluar la participación del receptor de membrana para HTs, la integrina $\alpha\beta3$, en las vías de acción no clásicas inducidas por las HTs en LCT humanos.
- Analizar la participación de STAT1 en vías de señalización activadas por HTs a través de sus receptores de membrana.
- Analizar el efecto de las HTs en la regulación de las enzimas pertenecientes a la subfamilia CYP3A, involucradas en el metabolismo de compuestos exógenos.

A continuación en este trabajo se describe, en la sección antecedentes, los trabajos y desarrollos previos relacionados con el tema aquí propuesto, incluyendo información sobre los linfomas y sus características; las HTs y sus mecanismos de acción; y sobre las enzimas pertenecientes a la familia del citocromo P450, particularmente la subfamilia CYP3A. Luego, se describe la metodología utilizada para llevar a cabo este trabajo y alcanzar los objetivos planteados. Finalmente, se muestran los resultados obtenidos para cada uno de los ensayos realizados y sus conclusiones.

2. Antecedentes

2.1 Neoplasias del sistema inmunitario.

En la mayor parte de los órganos y tejidos se conserva un equilibrio entre la renovación y la muerte celular. Los diversos tipos de células maduras del cuerpo tienen un tiempo de vida determinado; conforme mueren estas células se generan nuevas debido a la proliferación y diferenciación de las células progenitoras. En condiciones normales, la generación de nuevas células se regula con el objetivo de que el número total de células se mantenga constante. Sin embargo, en determinadas ocasiones las células dejan de responder a los mecanismos de control, dando lugar a clones, cuya población puede alcanzar un tamaño considerable, con la posibilidad de generar un tumor (Kindt *et al*, 2007).

Los tumores provenientes de células de los tejidos linforreticulares y hematopoyéticos se clasifican como leucemias o linfomas. Las leucemias proliferan como células independientes y se identifican por su mayor concentración en la sangre o la linfa y se pueden desarrollar a partir de linajes linfoides o mieloides. Los linfomas proliferan como masas tumorales dentro de un tejido linfoide, como médula ósea, ganglios linfáticos o timo (Kindt *et al*, 2007), o en forma de linfomas cutáneos (Bradford *et al*, 2009). Actualmente, esta distinción entre leucemias y linfomas es considerada artificial, ya que son simplemente, distintas manifestaciones de la misma neoplasia (Jaffe *et al*, 2008).

2.1.1 Clasificación de Neoplasias Linfoides según la Organización Mundial de la Salud

Los linfomas constituyen un grupo muy amplio de más de cuarenta desordenes linfoproliferativos, clasificados según sus características morfológicas, inmunológicas, genéticas y clínicas (Ribatti *et al*, 2013).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) publicó en el año 2008 una actualización de la clasificación de estos desórdenes en la cual incorpora información científica y clínica reciente con el objetivo de perfeccionar los criterios de diagnóstico de neoplasias ya descritas, e introducir nuevos subtipos de la enfermedad (Vardiman *et al*, 2009). La Tabla 1 muestra los principales grupos en los cuales se han clasificado las Neoplasias Linfoides según la OMS.

NEOPLASIAS LINFOIDES Y DE TEJIDO HEMATOPOYÉTICO.
Neoplasias de precursores linfoides
Neoplasias de células B maduras
Neoplasias de células maduras T y NK
Linfoma Hodgkin
Neoplasias de histiocitos y células dendríticas
Desórdenes linfoproliferativos post- transplante(PTLD, de sus siglas en inglés)

Tabla 1: Clasificación de las Neoplasias Linfoides y de Tejido Hematopoyético según la Organización Mundial de la Salud. Publicada en el año 2008 (Campo *et al*, 2011).

La OMS distingue dos grupos principales de linfomas: los linfomas Hodgkin (LH) y los linfomas Non-Hodgkin (LNH) que junto a los mielomas múltiples y las enfermedades inmunoproliferativas conforman el grupo de enfermedades hemato-oncológicas (Jaffe, 2008)

2.1.2 Características generales de los linfomas

2.1.2.1 Linfoma de Hodgkin

El linfoma de Hodgkin es una neoplasia que involucra los ganglios linfáticos periféricos y puede afectar órganos como el hígado, el pulmón y la medula ósea. Se caracteriza por la presencia de células tumorales específicas denominadas Reed-Sternberg (HRS). Si bien, estas células derivan de células B maduras, carecen del fenotipo característico de las mismas y muestran una co-expresión inusual de marcadores de distintas células hematopoyéticas. Los LH pueden subdividirse en esclerosis nodular, celularidad mixta, rico en linfocitos, pobre en linfocitos y con predominio de linfocitos celulares. Los primeros cuatro subtipos son llamados colectivamente Linfoma de Hodgkin Clásico (Cuccaro *et al*, 2014; Romano *et al*, 2014).

En el occidente, los casos de LH ocurren con mayor frecuencia, con una incidencia anual de 3 cada 100.000 personas (Küppers *et al*, 2012). Esta incidencia, se caracteriza por una distribución bimodal en cuanto a la edad de aparición, su primer pico se localiza en adultos jóvenes (20–30 años) y un segundo pico de ocurrencia después de los 55 años. El tratamiento de esta enfermedad es sin lugar a dudas, uno de los grandes éxitos de la medicina oncológica, las tasas de curación de LH se aproximan al 80-90% de los casos totales, siendo además una de las enfermedades neoplásicas que presentan mejores resultados a largo plazo después de un tratamiento citotóxico. Sin embargo, entre el 15–20% de los pacientes es resistente a la terapia o sufre recaída usualmente en el primer o segundo año (Cuccaro *et al*, 2014).

2.1.2.2 Linfoma Non-Hodgkin

Los linfomas denominados Non-Hodgkin son aproximadamente el 90% de todos los casos y representan un grupo heterogéneo de neoplasias malignas proliferativas con diferentes patrones de comportamiento y respuesta al tratamiento. Los tumores de células linfáticas,

generalmente se dividen en dos grandes categorías denominadas indolentes o agresivos, dependiendo, de las características de la enfermedad en el momento en que se presenta y la expectativa de vida del paciente (Ribatti *et al*, 2013).

Los LNH también pueden dividirse en linfomas de células B, cuya incidencia es aproximadamente el 87% del total de los casos, mientras que el 13% restante corresponde a linfomas de células T y células Natural Killer (NK). Generalmente, para linfomas de características histológicas comparables, los de células T presentan un comportamiento más agresivo que los de células B (de Leval y Gaulard, 2011; Ribatti *et al*, 2013).

Los LNH son más frecuentes en adultos que en niños y tienen un incremento gradual con la edad, sobre todo a partir de los 50 años. Existen diferencias clínico-patológicas importantes entre los LNH de la infancia con los de la edad adulta. En niños, la incidencia es menor y se presenta principalmente fuera de los ganglios linfáticos, el 50-70% presenta inmunofenotipo B, es agresivo y se cura en el 70–90% de los casos. En adultos, la incidencia es mayor, se presenta predominantemente en los ganglios linfáticos, correspondiendo el 70-90% de los casos a LNH de células B, y cuya tasa de curación es aproximadamente del 30% (Labardini Méndez *et al*, 2011).

En los linfomas de células B la incidencia de los subtipos más frecuentes es: 30% para los linfomas difusos de células B grandes, 25% linfomas foliculares, 7% linfomas de la zona marginal asociada a mucosas de tejido linfático, 7% leucemias linfocíticas crónicas y 5% linfomas de células del manto (Ribatti *et al*, 2013).

Los linfomas de células T (LCT) se dividen en inmaduros y maduros dependiendo de su origen celular. Los linfomas de origen inmaduro se originan a partir de células precursoras de linfocitos T, mientras que los linfomas de origen maduro derivan de linfocitos post-tímicos. Los LCT maduros también llamados periféricos, son los más frecuentes, representan aproximadamente el 12% del total de las neoplasias linfoides. (Dearden *et al*, 2011; Vasile *et al*, 2014). Los subtipos más frecuentes incluyen a los LCT periféricos no especificados de otro modo, los linfomas de células grandes anaplásicos y los linfomas de células T propiamente dicho

(Petrich y Rosen, 2013). Actualmente, la incidencia de los LCT presenta variaciones según la región geográfica: 20-30% en Asia y 5-10% en Europa y América del Norte de las neoplasias linfoides totales (Vasile *et al*, 2014).

2.1.3 Tratamiento de linfomas de células T.

Los LCT se incluyen entre el 13-15% de los 60.000 LNH diagnosticados anualmente en Estados Unidos, estimándose unos 8.000-9.000 casos nuevos anuales (Rodríguez-Abreu *et al*, 2008). A pesar de que cada subtipo de LCT tiene relativamente baja incidencia, la carga acumulada de estas patologías es muy significativa.

Uno de los desafíos más importantes en el estudio de los LCT, es la rápida traslación a la clínica de los conocimientos básicos que se están obteniendo sobre la biología molecular y genética de las células T.

En la actualidad la terapia más eficaz es la denominada CHOP, que utiliza en conjunto distintas drogas quimioterapéuticas: Ciclofosfamida, Doxorubicina, Vincristina y Prednisona. Existen variaciones a este régimen quimioterapéutico que adicionan drogas con importante actividad anti-linfoma, como por ejemplo Etopósido, en este caso la terapia es denominada CHOEP (Rodríguez-Antona *et al*, 2007).

- Ciclofosfamida

La Ciclofosfamida es un agente alquilante utilizado ampliamente en quimioterapia. Si bien, es efectivo como monoterapia, se utiliza frecuentemente en forma concurrente o secuencial con otras drogas antineoplásicas. Esta molécula es metabolizada en el hígado por el citocromo P450, generando metabolitos activos e inactivos.

La molécula de ciclofosfamida actúa uniendo un grupo alquilo a una base guanina del ADN, esto induce la inhibición de la replicación, logrando en última instancia la muerte celular (Chighizola *et al*, 2011).

- Doxorubicina

La Doxorubicina es un potente antibiótico anti-neoplásico, usado ampliamente en muchos y diversos tratamientos quimioterapéuticos, sin embargo, su uso se limita debido a la posibilidad de generar cardiotoxicidad dependiendo de la dosis utilizada (Zordoky y El-Kadi, 2008).

La doxorubicina es metabolizada por acción de las enzimas pertenecientes a CYP450, particularmente las de la subfamilia CYP3A (Horn *et al*, 2004).

Existen dos mecanismos propuestos mediante los cuales la doxorubicina actúa en células cancerígenas: en primer lugar su intercalación en la molécula de ADN, provocando la interrupción de la actividad de la topoisomerasa II, dañando el ADN y provocando en última instancia la muerte celular; en segundo lugar, la generación de radicales libres, como consecuencia de una reacción en la cual la doxorubicina es oxidada a semiquinona (compuesto inestable) y luego, convertida nuevamente en doxorubicina, este proceso genera especies reactivas de oxígeno, capaces de dañar la membrana celular, las proteínas y el ADN (Thorn *et al*, 2011).

- Vincristina

Es comúnmente utilizada en combinación con otras drogas en tratamientos quimioterapéuticos de neoplasias tanto sólidas como hematológicas. Es un compuesto antineoplásico que pertenece al grupo de agentes que actúan mediante su unión a tubulina, este mecanismo interfiere en la función del uso mitótico por lo tanto, es capaz de bloquear la división celular (Dumontet y Sikic, 1999).

La Vincristina es metabolizada por enzimas pertenecientes a la subfamilia CYP3A, particularmente CYP3A4 y CYP3A5, el principal producto de esta reacción es el denominado metabolito M1, inactivo biológicamente (Dennison *et al*, 2006; Bruno *et al*, 2007).

- Prednisona

La prednisona es un glucocorticoide sintético utilizado en el tratamiento de diversas enfermedades, entre estas, algunos subtipos de neoplasias del sistema inmune. Es utilizado principalmente por sus efectos glucocorticoides, como agente anti-inflamatorio e inmunosupresor.

La Prednisona es rápidamente absorbida a través del tracto gastrointestinal. Luego, es convertida en el hígado, por acción de las enzimas de la subfamilia CYP3A, en una molécula biológicamente activa denominada Prednisolona (Davis *et al*, 1978). La molécula activa es capaz de unirse de forma irreversible a receptores de glucocorticoides, desde allí, influencia en el comportamiento bioquímico general de las células blanco, por ejemplo induciendo o inhibiendo la síntesis de determinadas proteínas (Rang *et al*, 2003).

- Etopósido

Es un fármaco antitumoral utilizado en el tratamiento quimioterapéutico de distintos tipos de cáncer, entre estos, los linfomas. Como producto de su metabolización se generan metabolitos que luego, dan lugar a productos que pueden impedir el correcto funcionamiento de la topoisomerasa II y consecuentemente, causar daño en el ADN (van Maanen *et al*, 1988). La primera reacción metabólica que sufre el Etopósido cuando ingresa a la célula es llevada a cabo, en primer lugar por CYP3A4 y en menor medida por CYP3A5 (van Schaik, 2008).

2.2 Hormonas tiroideas

2.2.1 Glándula tiroides

La tiroides es una glándula neuroendocrina, cuya principal función es la síntesis y secreción de las hormonas tiroideas (HTs), tiroxina y 3,3'-5 triyodotironina (T₃ y T₄ respectivamente).

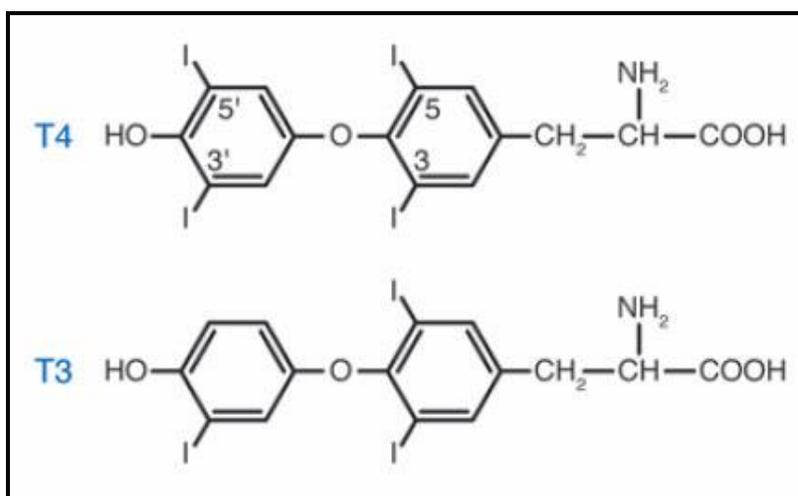


Figura 1: Estructura de las hormonas tiroideas (HTs).

La glándula tiroides se localiza por debajo del hueso hioides en la parte frontal del cuello junto al cartílago tiroides y sobre la tráquea, a la que rodea hasta alcanzar posteriormente al esófago. Está compuesta por dos lóbulos, que se encuentran conectados por el istmo y situados al lado izquierdo y derecho de la tráquea, además existe un pequeño lóbulo llamado piramidal que se encuentra en contacto con el istmo (Dumont *et al*, 2008).

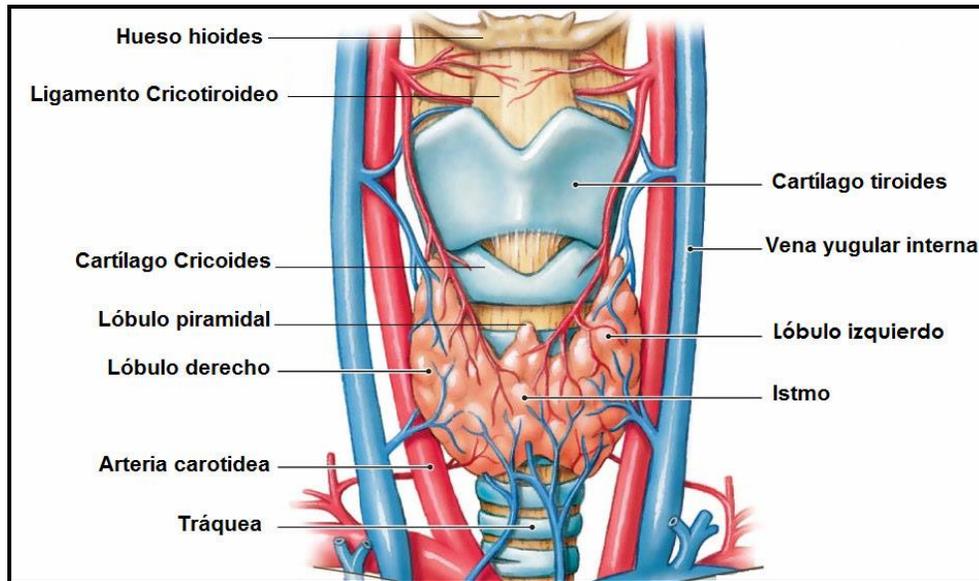


Figura 2: Localización y estructura de la glándula tiroides. Adaptado de: www.highlands.edu

La glándula tiroides se compone de folículos o acinos que pueden ser considerados, tanto desde el punto de vista estructural como funcional, como las unidades primarias o secretoras del órgano. Las células de los folículos son las responsables de la producción de hormonas, mientras que el lumen funciona como depósito para las mismas. Dentro del folículo y contenido en el lumen se localiza el coloide, constituido por una mezcla de proteínas, principalmente la tiroglobulina (Tg), otras iodoproteínas de menor peso molecular y proteínas séricas, entre ellas la albumina (Livolsi, 2001). Además de las células foliculares, existen células individuales o pequeños grupos de células que se localizan entre los acinos, denominadas parafoliculares o células C, ya que secretan calcitonina (o tirocalcitonina) en respuesta al aumento del calcio sérico. Fuera de los folículos hay células endoteliales y fibroblastos. (Livolsi, 2001; Koulouri *et al*, 2013).

La glándula tiroidea está sujeta a un fino control por parte del eje Hipotálamo-Hipófiso (Pituitario)-Tiroideo (HPT).

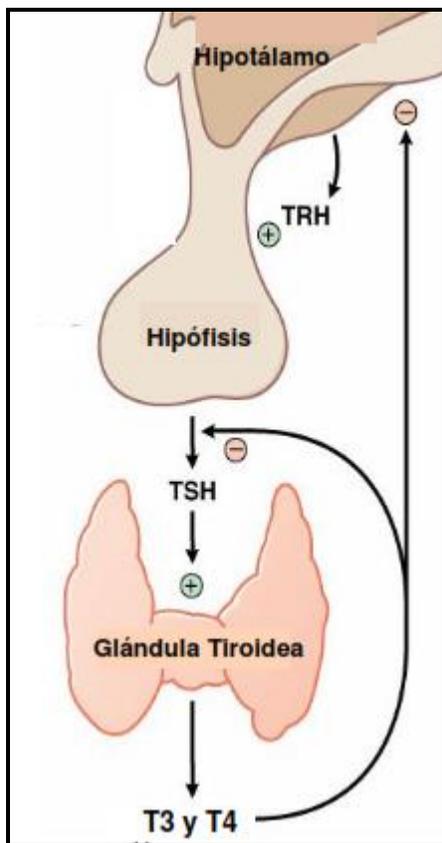


Figura 3: Representación esquemática del eje Hipotálamo-Hipófiso (Pituitario)-Tiroideo (HPT). Adaptado de Appleton y Lange, 1994.

La hormona hipotalámica involucrada en el eje HPT es la liberadora de tirotropina (TRH). La TRH se secreta y se une de manera específica a los receptores acoplados a proteína G de la membrana hipofisaria. Desde allí, es capaz de activar y estimular la secreción por exocitosis de la hormona hipofisaria estimulante de la tiroidea (TSH); además, es capaz de regular la síntesis

de TSH, ya que puede producir variaciones en la concentración y en el estado de fosforilación de proteínas nucleares que regulan genes involucrados en la síntesis de esta hormona (Gore y Roberts, 2003)

La TSH es una glicoproteína de 30kDa que forma un heterodímero compuesto por dos subunidades que se encuentran unidas de manera no covalente: α y β . El receptor de TSH esta acoplado a proteína G, tiene 7 dominios transmembrana y se expresa principalmente, pero no de forma exclusiva, en la glándula tiroides, ya que también fue identificado en varios tejidos incluyendo: cerebro, testículo, riñón, corazón, hueso, timo, linfocitos, tejido adiposo y fibroblastos (Davies *et al*, 2002; de Lloyd *et al*, 2010). La TSH activa vías de señalización que involucran el sistema adenilatociclasa, el cual regula la síntesis y liberación periférica de las HTs: T_3 y T_4 . (Gore y Roberts, 2003).

Las HTs, T_3 y T_4 , son liberadas a la circulación para cumplir su rol fisiológico sobre los distintos tejidos, y además, son capaces de regular negativamente tanto la liberación de TRH por parte del hipotálamo, como la de TSH por la hipófisis.

2.2.2 Síntesis y metabolismo de las hormonas tiroideas

La síntesis de las HTs ocurre en la glándula tiroides y requiere de cuatro elementos esenciales: Iodo, Peróxido de hidrógeno (H_2O_2), Tiroglobulina (Tg) y Peroxidasa tiroidea (TPO, de sus siglas en inglés). Las HTs controlan a través de una retroalimentación negativa la liberación tanto de la TRH en el hipotálamo, como de la TSH en la glándula pituitaria anterior (Lin X *et al*, 2004; Dietrich *et al*, 2012).

El folículo tiroideo es la estructura funcional responsable de la biosíntesis, almacenamiento y secreción de las HTs. Las células tiroideas foliculares se encuentran polarizadas y especializadas en la producción de T_3 y T_4 . La función celular depende entonces, de un grupo de proteínas bien caracterizadas que están involucradas en la biosíntesis de las hormonas (Kopp, 2013).

Las HTs son sintetizadas dentro la tiroglobulina (Tg) y permanecen unidas covalentemente a la estructura primaria de esta molécula, de alto peso molecular, hasta que ocurre la degradación proteica y la hormona es secretada.

En la figura 4 se muestran los pasos mediante los cuales son sintetizadas las HTs:

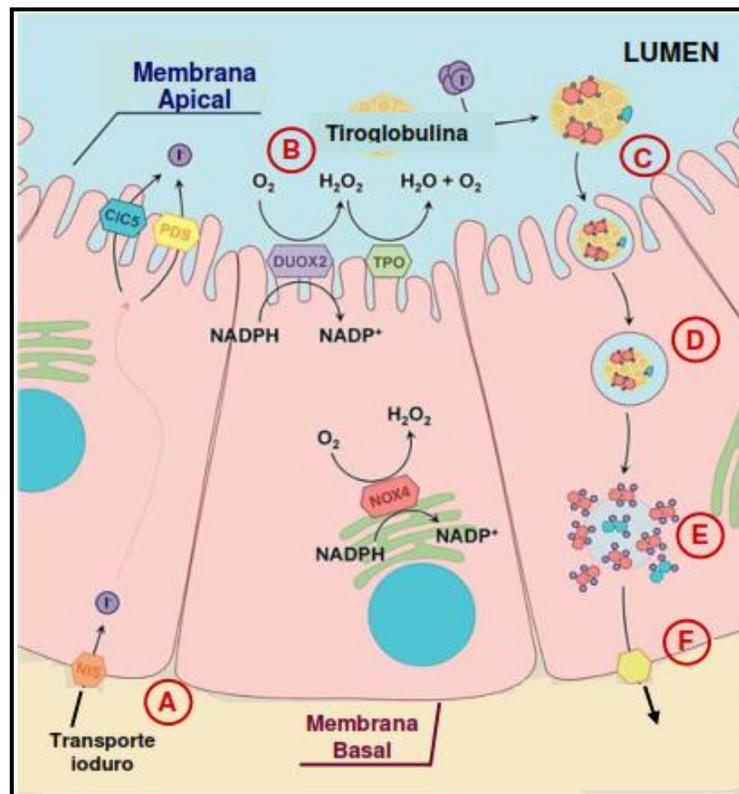


Figura 4: Síntesis de HTs. Se señalan los pasos que llevan a la síntesis de HTs, su almacenamiento en la Tg y finalmente su secreción. NIS: del inglés Na/I symporter. PDS: Pendrina. CIC5: Canal aniónico. DUOX2: Oxidasa dual 2. TPO: tiroperoxidasa. NOX4: NADPH oxidasa 4. Adaptado de: fitsweb.uchc.edu

El primer paso (A) implica el transporte de yoduro por captación activa y mediante la proteína transportadora de yodo NIS (del inglés, Na/I symporter), la cual transporta dentro de la

célula dos cationes de Sodio (Na^+) por cada anión de yoduro. El yoduro es transportado por una proteína transportadora denominada pendrina desde la membrana basal a la membrana apical donde sale al coloide. En el siguiente paso (B) participa la tiroperoxidasa (TPO) y comprende la oxidación del yoduro a yodonio, que luego se incorpora a la Tg para producir iodotirosinas. La TPO nuevamente participa en el acoplamiento (C) de las iodotirosinas para formar las iodotironinas T_3 y T_4 . Para poder disponer de las mismas para su secreción, la célula folicular capta gotitas del coloide por endocitosis (D). Luego, se produce la ruptura proteolítica de los enlaces que unen a las HTs a la Tg (E) y la deiodación de la T_4 , de modo que tanto T_4 como T_3 pueden acceder al torrente sanguíneo. La liberación de las HTs (F) se da mayoritariamente en forma de T_4 , siendo su concentración en suero 40 veces mayor que la de T_3 (Lester Reed *et al*, 2001; Dentice y Salvatore, 2011; Peking Fong, 2011).

La mayor proporción de las HTs se encuentra unida a proteínas transportadoras. El 70% de la T_4 se une a la globulina transportadora de HTs (TBG), el 20% a la albumina, mientras que el 10% restante a la transtiretina (TTR); en el caso de la T_3 se une principalmente a TBG (80%), y el resto a TTR y a albumina. La albumina tiene baja afinidad por las HTs, sin embargo participa como transportador de las mismas, debido a su elevada concentración plasmática (Lester Reed, 2001).

La T_3 también puede producirse por la 5'-deiodinación del anillo externo de la T_4 por deiodinasas. La deiodinasa de tipo 1 (DIO1) se encuentra en tejidos periféricos como el hígado y el riñón y es responsable de la conversión de la mayor parte de T_4 a T_3 en circulación. La deiodinasa tipo 2 (DIO2) tiene una distribución más amplia encontrándose en tiroides, cerebro, glándula pituitaria, tejido adiposo, corazón y músculo esquelético, entre otros; esta deiodinasa tiene como función la conversión de T_4 a T_3 para uso intracelular, este proceso metabólico es la principal fuente de T_3 en tejidos distintos de la glándula tiroides (Gereben *et al*, 2008; Bianco, 2011). Por su parte la deiodinasa tipo 3 (DIO3) puede inactivar a las HTs: en el caso de T_4 formando T_3 reversa y para la T_3 dando como resultado T_2 y finalizando así, el accionar de ambas hormonas. La localización celular es una característica importante, ya que las HTs están en

circulación, pero su mecanismo de acción tiene lugar en el interior de las células mediante su interacción con receptores nucleares. Estudios realizados indican que DIO1 y DIO3 se encuentran en la membrana plasmática, mientras que DIO2 es una proteína que reside en el retículo endoplasmático (Gereben et al, 2008). Las HTs pueden ingresar al interior celular por difusión o mediante transportadores localizados en la membrana plasmática (Heuer, 2009).

Una vez en el interior celular, la pro-hormona T_4 puede ser transformada por medio de la acción de DIO2 a T_3 , molécula biológicamente activa, capaz de difundir hacia al núcleo, eventualmente uniéndose a sus receptores (TR), y dando como resultado la regulación de los genes blanco (Cheng, 2010). Por lo tanto, la señalización inducida por las HTs puede ser modificada por efecto de las DIO, ya sea, potenciando su acción a través de la conversión de T_4 a T_3 mediante DIO2, o inactivando su acción a través de la expresión de DIO3 (Gereben *et al*, 2008).

Finalmente, las HTs se metabolizan periféricamente por diversas vías esquematizadas en la Figura 5, a fin de transformarlas en sustancias más hidrosolubles para permitir su eliminación. Además de los mecanismos de inactivación ya mencionados, tiene lugar en el hígado la conjugación, que se puede dar con sulfato o la glucuronidación cuyo efecto final es la eliminación de las HTs.

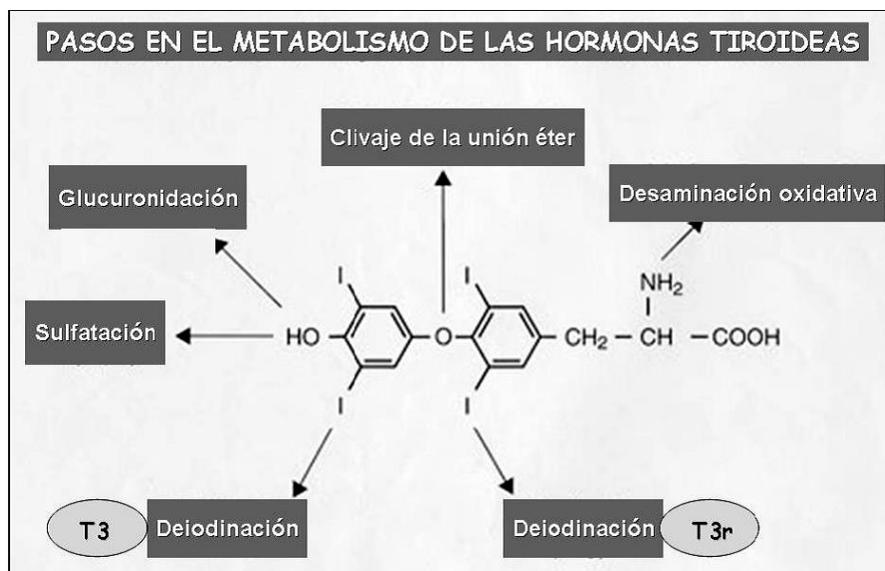


Figura 5: Conversión metabólica periférica de las hormonas tiroideas. Adaptado de slideplayer.es

2.2.3 Efectos biológicos de las hormonas tiroideas

Las HTs modulan distintos procesos fisiológicos y cumplen un rol muy importante en el crecimiento, desarrollo, diferenciación y mantenimiento de la homeostasis (Oetting y Yen, 2007). Las HTs ejercen su actividad en todos los sistemas del organismo, ya que sus receptores nucleares se expresan en casi todos los tejidos, sin embargo, existen diferencias en la respuesta a las mismas, ya que estos presentan patrones de expresión diferentes de los receptores y sus isoformas, y de las deiodinasas.

Las principales acciones sistémicas de las HTs abarcan el aumento del metabolismo basal, la estimulación de la termogénesis y la regulación del consumo de oxígeno celular. Los cambios en la función tiroidea aumentan la captación de glucosa, la demanda de vitaminas y modifican las concentraciones de proteínas y enzimas séricas. Además, las HTs tienen la

habilidad de inducir vías anabólicas y catabólicas como la lipogénesis y la lipólisis, contribuyendo de esta manera a la inducción del consumo energético. (Pucci *et al*, 2000; Brent, 2012).

Las HTs ejercen una serie de acciones periféricas fundamentales para el correcto funcionamiento de varios órganos y sistemas. Suprimen la secreción de TSH por parte de las células tirotropas hipofisarias regulando negativamente la transcripción de sus genes por un mecanismo mediado por la deiodinación intracelular de T_4 en T_3 . A nivel del sistema nervioso, tienen un papel fundamental en el desarrollo del cerebro fetal durante el periodo neonatal, además, regulan proteínas y glúcidos que participan en la mielinización (Williams, 2009). En el hígado, cumplen un rol importante en la homeostasis lipídica hepática (Malk y Hodgson, 2002), ya que estimulan las enzimas que regulan la lipogénesis y la lipólisis, inducen la síntesis de transaminasas y de proteínas plasmáticas y regulan la síntesis de colesterol. En el tejido adiposo, la T_3 regula el consumo basal de oxígeno, el almacenamiento de grasa, la lipogénesis y la lipólisis, también induce la diferenciación del tejido adiposo y estimula la proliferación de los adipocitos. (Hulbert, 2000; Brent, 2012). Los efectos hormonales de la T_3 y T_4 se extienden también, al músculo esquelético, allí favorecen la acción contráctil, la biosíntesis de miosina y de enzimas lisosómicas y la captación de glucosa. Finalmente, un correcto funcionamiento tiroideo es fundamental para el desarrollo óseo y para mantener la regulación a nivel gonadal (Gogakos *et al*, 2010)

El estado tiroideo de un individuo depende del funcionamiento del eje endócrino. Si este funciona correctamente, el individuo se encuentra en un estado denominado eutiroideo, en caso de existir patología tiroidea primaria, se pueden dar distintos escenarios. Se denomina estado hipertiroideo a aquel donde los niveles hormonales están por encima de los normales. Las consecuencias dependen de la gravedad de la patología, pero en todos los casos, implica la exacerbación de todas las funciones sistémicas y periféricas mencionadas anteriormente (Potenza *et al*, 2009; Hörman y Schumm-Draeger, 2010). Por el contrario, cuando la secreción hormonal es insuficiente y los niveles de las HTs se encuentran por debajo de los valores normales, se denomina estado de hipotiroidismo, cuyos síntomas clínicos se relacionan

con una disminución del metabolismo. También, se han definido estados leves y subclínicos de estos desordenes, caracterizados por un aumento o reducción de la TSH circulante según se trate de hipo- o hipertiroidismo subclínicos; como sus nombres lo indican, en estas circunstancias los síntomas de la enfermedad son leves o inexistentes, pero pueden progresar a enfermedad manifiesta si no se realiza la intervención terapéutica (Karmisholt *et al*, 2011). También, pueden darse casos de aumento o reducción de los niveles hormonales pero secundarios a una patología hipotalámica o hipofisaria.

2.2.4 Mecanismos de acción de las hormonas tiroideas

La acción de las HTs comprende la modificación de la expresión de genes mediante receptores nucleares para HTs, denominados TRs. Estos receptores se encuentran codificados por los genes THRA y THRB localizados en los cromosomas 17 y 3, y que codifican para las proteínas TR α y TR β respectivamente (Yen *et al*, 2001). Ambos genes comparten alta homología en su estructura proteica incluyendo el dominio de unión al ADN (DBD en su siglas en inglés) y la porción C terminal del dominio de unión al ligando (LBD de su sigla en inglés). La especificidad de las secuencias está dada por una región corta de aminoácidos en el DBD.

Los TRs se unen a elementos de respuesta a HTs (TREs de su sigla en inglés) en los promotores de sus genes blanco, actuando como potenciadores de la transcripción de estos genes. El LBD une la T₃ con una afinidad 10-15 veces mayor que la T₄ (Yen *et al*, 2006; Cheng *et al*, 2010). Existen varias isoformas de los TRs producto del empalme alternativo. El THRA genera dos isoformas TR α_1 y TR α_2 , que difieren en la región carboxilo terminal donde está ubicado el dominio de unión a la hormona; el gen THRB genera también dos isoformas denominadas TR β_1 y TR β_2 a través de la elección de un promotor alternativo (Cheng *et al*, 2010). Los receptores para las HTs se encuentran basalmente asociados al ADN, es decir, que aun en ausencia de hormona tiroidea son capaces de regular la transcripción de genes ya que se encuentran asociados a co-represores (Oetting y Yen, 2007).

2.2.4.1 Acciones clásicas de las HTs a través de los TRs

El denominado modelo clásico de acción de las HTs comprende la inducción de la transcripción de genes a través de la participación de los TRs como factores de transcripción ligando-dependientes. El mecanismo comienza con el paso a través de la membrana basal de las HTs, su metabolización y su posterior unión a su receptor en el núcleo, provocando así, un cambio conformacional en el mismo que permite que el TR forme dímeros, sean estos, heterodímeros (TR/receptor de retinoides) u homodímeros (TR/TR) (Lee y Rivalsky, 2005; Moeller y Broecker-Preuss, 2011; Tata, 2013). Una vez formado el complejo hormona-receptor, se asocia a proteínas co-activadoras iniciando la transcripción de los genes blanco. En ausencia de T_3 , el TR se une constitutivamente a un grupo de proteínas con actividad histona deacetilasa (HDAC), cuya principal función es la de reprimir el proceso de transcripción. En presencia de T_3 el receptor cambia de conformación, provocando además de la dimerización, la liberación de los co-represores y su reemplazo por co-activadores, facilitando el proceso de transcripción (Aranda y Pascual, 2001; Oetting y Yen 2007; Moeller y Fuhrer, 2013). En el caso de genes que son regulados de manera negativa por las HTs el proceso es el inverso, ya que su transcripción es estimulada en ausencia de T_3 e inhibida ante la unión de la hormona al receptor (Yen, 2001; You et al, 2010).

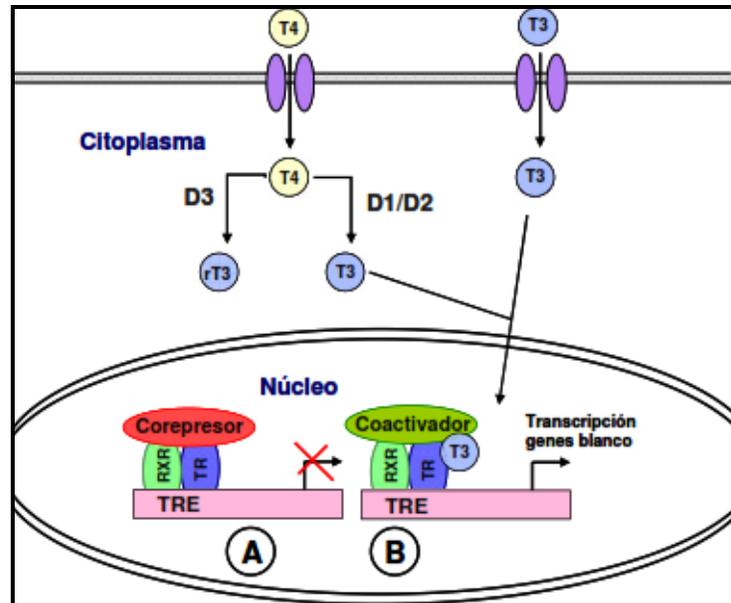


Figura 6: Mecanismo de acción clásica de las HTs. (A) La unión constitutiva del TR al co-represor provoca el reclutamiento de proteínas deacetasas de histonas (HDAC), lo que causa la condensación de la cromatina y la represión de la transcripción. (B) Al unirse la T_3 al TR provoca el intercambio del co-represor por un co-activador, se descondensa la cromatina y se facilita la transcripción. Adaptado Juvenal, 2009.

2.2.4.2 Acciones no clásicas de las HTs

Se denominan acciones no clásicas de las HTs a aquellas que podrían ser mediadas por isoformas de los receptores nucleares asociados a la membrana plasmática, citoplasmáticos o bien, por otros tipos de receptores de membrana de alta afinidad para HTs (Basselt *et al*, 2013). Entre los mecanismos no clásicos se pueden mencionar la inducción de cambios en los patrones de fosforilación de proteínas efectoras de distintas vías de señalización (Shih *et al*, 2004; Cordeiro *et al*, 2013), la modulación de la disponibilidad de moléculas que actúan como segundos mensajeros (Yamauchi *et al*, 2008) y la modificación de la estabilidad de ARN mensajero (ARNm) (Serrano-Nacimiento *et al*, 2010). Trabajos anteriores han propuesto que las HTs son capaces de desencadenar efectos genómicos y no genómicos que actúan en forma

cooperativa para la activación de cascadas de señalización, particularmente MAPK (Davis *et al*, 2006).

En el año 2005, Berghy col. demostraron la existencia de una proteína de membrana capaz de unirse a las HTs y actuar como iniciador de acciones no genómicas desencadenadas por las hormonas. La proteína fue inicialmente descrita en células fibroblásticas como la integrina $\alpha\beta3$. Dicha integrina actúa como receptor de vitronectina y es miembro de la súper-familia de glicoproteínas de moléculas de adhesión que median la unión de las células a la matriz extracelular por reconocer la secuencia conservada Arginina-Glicina-Aspartato (RGD) presente en varias proteínas plasmáticas y de matriz. Las acciones de las HTs sobre la integrina $\alpha\beta3$ como receptor de membrana, fueron demostradas tanto en células normales, como en células de vasos sanguíneos (Berghy *et al*, 2005; Davis *et al*, 2011), en células no cancerosas inmortalizadas y en varios tipos de líneas celulares tumorales como por ejemplo, cáncer de próstata y carcinomas renales (Kimbrow y Simons, 2006). Además, se reconoció el sitio dentro de la integrina en el cual, se produce la unión con las HTs, el mismo se localiza en las cercanías del sitio de unión a RGD e involucra dos sitios de unión denominados S1 y S2 capaces de transducir señales diferentes (Davis *et al*, 2011; Freindorf *et al*, 2012). El sitio S1 se une de manera exclusiva a T₃, mientras que el sitio S2 se une ambas, pero con mayor afinidad a T₄.

Trabajos previos de nuestro laboratorio (Barreiros Arcos *et al*, 2011) han demostrado que las HTs son capaces de activar mediante receptores localizados en la membrana plasmática, vías de señalización en células de linfoma T murino. En esta vía de señalización participa la integrina $\alpha\beta3$, como receptor de membrana plasmática. Las esfingomielinasas como activadoras de una isoforma atípica de la quinasa C (PKC ζ). La PKC ζ activa, es capaz de fosforilar NF- κ B que luego, transloca al núcleo para actuar como factor de transcripción. La activación de NF- κ B se produce tanto en forma directa, como indirecta, en este último caso, mediante ERK1/2.

Adicionalmente, estudios realizados por Cayrol y col. (2015) demostraron que las HTs, a través de sus acciones no genómicas, son capaces de inducir cambios transcripcionales en linfomas de células T, CUTLL1. Particularmente se identificaron 118 transcriptos regulados en

forma positiva y 5 de manera negativa, estos genes participan en procesos de traducción, angiogénesis, proliferación y diferenciación de linfocitos, replicación y transcripción de ADN, entre otros. En concordancia a lo observado en líneas de linfoma T murino, se identificó como proteínas partícipes de la vía de señalización activada por HTs, a través de la integrina $\alpha\beta3$, a ERK1/2 y NF- κ B.

2.3 Citocromo P450

El citocromo P450 constituye una familia multigénica de hemoproteínas constitutivas e inducibles que tienen un rol central en el metabolismo oxidativo y en la activación y detoxificación de un amplio rango de compuestos xenobióticos (Murray *et al*, 2007).

Las enzimas CYPs son expresadas principalmente en tejido hepático, aunque también se expresan en tejido extra-hepático como intestino delgado, riñón y pulmón, y en tumores sólidos incluyendo los de mama, colon, pulmón, esófago, ovario y sarcomas (Morag *et al*, 2004; van Schaik, 2008).

Los genes pertenecientes a esta familia se encuentran codificados en todas las especies, desde procariontes a roedores y humanos, lo que sustenta la teoría de que todos los CYPs provienen de un ancestro común originado, probablemente, hace 3 billones de años; (Nerbert *et al*, 2013).

2.3.1 Nomenclatura y clasificación de CYP450

La denominación citocromo P450 proviene de la característica de esta hemoproteína, en su forma reducida y unida a monóxido de carbono, presenta un máximo de absorbancia a los 450 nm. (Orellana y Guajardo, 2003).

Los CYPs están organizados en familias y subfamilias según su porcentaje de similitud en las secuencias de aminoácidos de cada gen; aquellas enzimas que contengan un porcentaje de homología igual o mayor al 40% son asignadas a una misma familia, designada por un número, mientras que aquellas que compartan un porcentaje de homología igual o mayor al 55% pertenecen a una misma subfamilia, designada por una letra (Nebert *et al*, 2013). Un segundo número arábigo, luego de la letra, indica la isoforma individual (Molina Ortiz *et al*, 2012).

El genoma humano contiene 18 familias de CYPs, divididas en 41 subfamilias, codificados por 57 genes funcionales y 58 pseudogenes; en el genoma de ratón existen 108 genes funcionales codificantes para CYPs y 88 pseudogenes (Nebert y Russell, 2002; Zanger *et al*, 2013).

Las familias humanas CYP2, CYP3 y CYP4 contienen más genes que las restantes 15, estas tres familias también son las más grandes en ratones y en otros genomas de mamíferos. Esta expansión se debe a que la mayoría de los genes pertenecientes a estas familias son inducibles, es decir que responden aumentando sus niveles proteicos a determinadas condiciones ambientales, como por ejemplo dietas, inductores químicos, presencia de drogas, feromonas, entre otros; a este grupo de enzimas inducibles se adicionan las que integran el grupo CYP1. Las restantes 14 familias se componen generalmente por un único miembro, son raramente inducibles y participan generalmente en funciones críticas para el mantenimiento de la vida celular (Nebert, *et al*, 1987; Nelson *et al*, 2004; Nebert *et al*, 2013).

Como se mencionó anteriormente, si bien las enzimas CYPs son expresadas en varios tejidos humanos, se localizan principalmente en el hígado. En tejido hepático humano adulto, la subfamilia CYP3A es la más abundante, siendo esta el 29% del total de los CYPs presentes. También son expresadas la subfamilia CYP2C (18%) y las isoformas CYP1A1 (13%), CYP2E1 (7%), CYP2A6 (3%) y CYP2D6 (2%). El 28% restante, corresponde a enzimas CYPs indeterminadas (Alcorn y McNamara, 2002; Molina Ortiz *et al*, 2012).

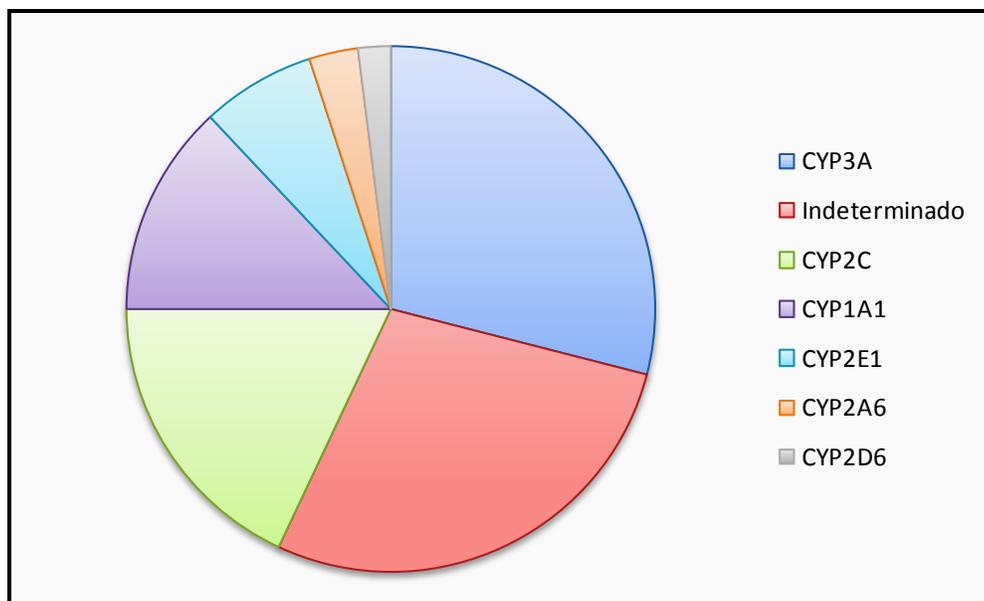


Figura 7: Distribución porcentual del contenido de CYP450 en el hígado adulto humano. Adaptado Molina Ortiz et al, 2012.

2.3.2 Familia CYP3A

Es el grupo más abundante de enzimas CYP450 en el hígado, está constituida por cuatro isoformas: CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7 y CYP3A43, las cuales están estructuralmente relacionadas. Los genes que codifican para esta subfamilia se localizan en el cromosoma 7q22.1, tienen un tamaño de 231 kilobases, y las proteínas que sintetizan son responsables del metabolismo de aproximadamente el 50% de los fármacos utilizados actualmente (van Schaik, 2008).

La similitud entre la secuencia de aminoácidos de CYP3A4 y CYP3A5 es del 83%, mientras que la de 3A4 y 3A7 es del 88%. A pesar de su semejanza estas subfamilias difieren en su distribución en los tejidos, la edad de aparición y sus propiedades metabólicas. CYP3A4 es la

enzima predominante del hígado adulto humano (ver Figura 7), mientras que en hígado fetal la principal enzima es CYP3A7. Las enzimas CYP3A4 y CYP3A7 en sus secuencias de nucleótidos muestran 95% de similitud y además, son capaces de metabolizar en muchos casos, el mismo sustrato (de Wildt *et al*, 1999; Williams *et al*, 2002; Alcorn y McNamara, 2003).

2.3.2.1 CYP3A4

Esta enzima se encuentra expresada principalmente en el hígado y en intestino delgado, constituye aproximadamente del 30% al 40% del contenido total de citocromos hepáticos. Si bien, es la isoforma más expresada en tejido hepático, la variabilidad existente entre-individuos es muy alta (>100 veces) y no se han reportado casos de ausencia total de esta enzima (Ohtsuki *et al*, 2012; Zanger y Schwab, 2013).

Se ha demostrado que cataliza el metabolismo oxidativo de la mayoría de los agentes terapéuticos de importancia clínica, así como compuestos endógenos como la testosterona, cortisol, progesterona, androstanediol y estradiol siendo también capaz de metabolizar compuestos pro-carcinógenos. En el hígado fetal, esta isoforma, muestra actividad limitada, aproximadamente el 10% de la actividad en la etapa adulta. Al mes de edad, se observa un incremento del 30-40% del nivel mostrado en adultos, alcanzando su maduración al año de edad (Hakkola *et al*, 2001).

La enzima CYP3A4 es la isoforma de CYP450 mayormente expresada en el intestino delgado, aunque sus niveles no son similares a los presentes en el hígado, contribuye de esta forma, al primer paso de metabolización para drogas administradas por vía oral (Ding&Kaminsky, 2003; von Richter *et al*, 2004; Daly, 2006).

En la actualidad son reconocidos 20 polimorfismos para este gen, sin embargo, la mayoría de ellos son alelos poco frecuentes. La única excepción es una variante alélica del promotor denominada CYP3A4*1B (-392 A>G), que tiene una frecuencia de 2-9% en individuos caucásicos, 35-67% en afroamericanos y es poco frecuente en asiáticos (van Schaik, 2008).

2.3.2.2 CYP3A5

En humanos adultos es considerada el segundo miembro de la subfamilia CYP3A. Si bien, en el hígado se encuentra expresada en menor proporción que CYP3A4, en tejidos extra-hepáticos como el tracto respiratorio, cerebro, pulmón y riñón su expresión es predominante respecto a CYP3A4. La especificidad de sustratos es similar a la de CYP3A4, sin embargo, existen algunas diferencias en sus propiedades catalíticas, ya que generalmente es menos activo (Lacroix *et al*, 1997; de Wildt *et al*, 1999; Molina Ortiz *et al*, 2012).

Hines y col. en 2007, analizó la expresión hepática de CYP3A5 durante la gestación, al nacimiento y en la etapa neonatal. Sus resultados muestran que en el primer trimestre de gestación la expresión de CYP3A5 es nula, posteriormente, durante el segundo trimestre la expresión empieza a ser detectable y para el tercer trimestre la expresión de CYP3A5 se encuentra en aumento, mientras que al nacimiento la expresión se mantiene constante (Hines *et al*, 2007).

La expresión de CYP3A5 en hígado es polimórfica debido a que solo el 5-10% de los caucásicos la expresan, sin embargo el 60% o más de los individuos africanos y afroamericanos tienen cantidades apreciables de esta enzima en su tejido hepático (Zanger y Schwab, 2013). Esta diferencia étnica se debe a que existen individuos homocigotas para el alelo denominado, CYP3A5*3 que codifica una variante aberrante, cuya consecuencia es la ausencia de la enzima y de su actividad (Hustert *et al*, 2001; Kuehl *et al*, 2001).

2.3.2.3 CYP3A7

Es la principal isoforma de CYP450 detectada en el hígado en etapa fetal y neonatal, constituyendo cerca del 32% del contenido total de CYP450 hepático. Tiene un papel importante en el metabolismo de compuestos endógenos, participa, por ejemplo, en reacciones importantes

para la formación de estradiol durante la gestación (Hakkola *et al*, 2001; Molina Ortiz *et al*, 2012).

Esta enzima es detectable en etapas tempranas de gestación, entre 50-60 días, mostrando un pico máximo de actividad en la primera semana post-parto; posteriormente, la actividad de CYP3A7 disminuye significativamente durante el primer año de vida. Aunque en la etapa adulta puede detectarse actividad, es menor al 10% en comparación a la observada en hígado fetal (Alcorn y McNamara 2003; Biéche *et al*, 2007). Esta expresión residual, se debe a polimorfismos en la región promotora, sin embargo su impacto en la farmacocinética de drogas es muy limitado. La incidencia del polimorfismo, denominado CYP3A7*1C, es del 3% en individuos caucásicos y del 6% en afroamericanos adultos (Kuehl *et al*, 2001; Burk *et al*, 2002).

2.3.2.4 CYP3A43

El rol de la isoforma CYP3A43 en el metabolismo de drogas no se encuentra determinado hasta el momento. Esta enzima es expresada en muy bajos niveles en el hígado humano, alcanzando el 0.1-0.2% del total de los transcritos de CYP3A (van Schaik, 2008).

2.3.3 Actividad del citocromo P450

La mayoría de las familias de CYP participan en el metabolismo de compuestos endógenos, como por ejemplo, esteroides, ácidos grasos, eicosanoides, y vitaminas liposolubles; solo algunos miembros de las familias, clasificadas como CYP1, CYP2 y CYP3 están involucradas en el metabolismo de drogas y compuestos xenobióticos (Singh *et al*, 2011).

Esteroides	Xenobióticos	ÁcidosGrasos	Eicosanoides	Vitaminas	Desconocido
1B1	1A1	2J2	4F2	2R1	2A7
7A1	1A2	4A11	4F3	24A1	2S1
7B1	2A6	4B1	4F8	26A1	2U1
8B1	2A13	4F12	5A1	26B1	2W1
11A1	2B6		8A1	26C1	3A43
11B1	2C8			27B1	4A22
11B2	2C9				4F11
17A1	2C18				4F22
19A1	2C19				4V2
21A2	2D6				4X1
27A1	2E1				4Z1
39A1	2F1				20A1
47A1	3A4				27C1
51A1	3A5				
	3A7				

Tabla 2: Compuestos metabolizados por las isoenzimas de CYP450. Miembros de la familia CYP450 humana y tipo de sustrato que son capaces de metabolizar. (Molina Ortiz et al, 2012).

2.3.3.1 Metabolismo de compuestos xenobióticos

La biotransformación de xenobióticos se realiza básicamente en dos fases. La fase I, catalizada principalmente por el sistema de mono-oxigenasas dependiente del citocromo P450, particularmente las isoformas CYP1A2, 2A6, 2B6, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1, 3A4, 3A5, 3A7; y la fase II, en la que participan una serie de transferasas que catalizan reacciones de conjugación de los xenobióticos con diversas moléculas de naturaleza endógena como ácido glucorónico, sulfatos, acetato, el tripéptido glutatión o algunos aminoácidos. El objetivo final de ambas fases es aumentar la solubilidad en agua de los compuestos y así facilitar su excreción del organismo a través de la orina o la bilis (Orellana y Guajardo, 2003).

En la fase I, la reacción principal que catalizan los CYP450 es la mono-oxidación (Figura 8). La reacción es dependiente de NADPH, ya que suministra el electrón necesario para

la reducción del Fe^{3+} a Fe^{2+} . El producto final de la misma es el compuesto xenobiótico en estado oxidado, capaz de liberarse de la enzima y permitir que esta comience un nuevo ciclo (Molina Ortiz et al, 2012).

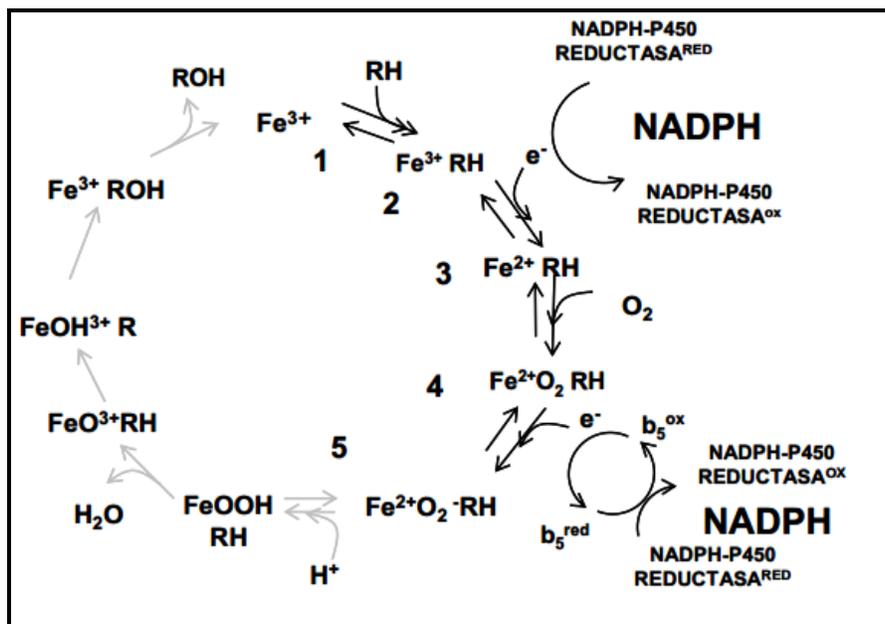


Figura 8: Ciclo catalítico general de CYP450. El ciclo inicia con la interacción de un sustrato (RH) y culmina con la disociación de un producto oxidado (ROH) por CYP450 (Molina Ortiz et al, 2012).

Cada uno de los miembros de la familia CYP450 tiene su propia especificidad por el sustrato que metaboliza, sin embargo, en muchos casos la misma droga puede ser metabolizada por más de una enzima perteneciente a este conjunto, generando redundancia en este importante mecanismo de defensa frente a la presencia de sustancias tóxicas (van Shaik, 2008).

En la figura 9 se muestra la contribución de cada CYP al metabolismo de fármacos actualmente disponibles en el mercado (Alcorn y McNamara, 2002; Bieche et al, 2007).

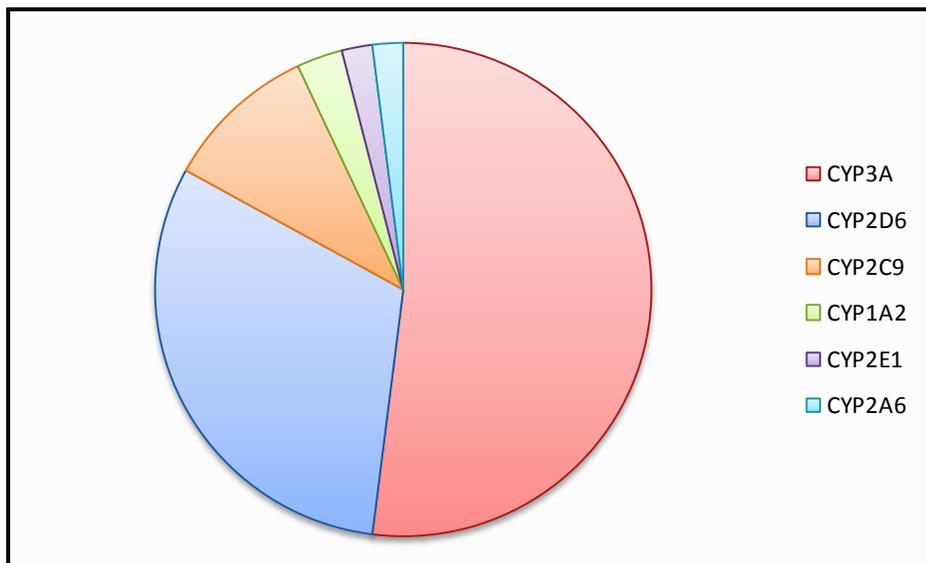


Figura 9: Estimación porcentual de la contribución de enzimas CYP en el metabolismo de fármacos disponibles en la actualidad. Adaptado: Alcorn y McNamara, 2002.

Los productos de las reacciones catalizadas por estas enzimas (metabolitos), en el caso específico de los fármacos antineoplásicos, pueden ser moléculas inactivas o con propiedades antitumorales. El resultado final depende principalmente de si el sustrato que metabolizan es un fármaco antitumoral biológicamente activo *per se* o si es un pro-fármaco inactivo. En el primer caso, la acción de las enzimas P450 ocasiona una desactivación del fármaco, generando metabolitos que poseen una actividad antitumoral reducida o nula. En el segundo caso el efecto, de la reacción catalizada por las enzimas P450, genera una activación del pro-fármaco, promoviendo su actividad anti-tumoral (Quiñones *et al*, 2008).

Se han observado diferencias en la expresión de algunas subfamilias de CYP450 entre individuos sanos y en asociación con algunas patologías como las enfermedades

neoplásicas, donde algunas enzimas se sobre-expresan en diferentes tipos de células tumorales (Gray Cancer Institute, 2002).

La variación inter-individual de CYP450 causa diferencias en el metabolismo de los fármacos en general. De esta manera, algunos individuos responden mejor al tratamiento antitumoral, dependiendo de si se produce una mayor o menor cantidad de enzimas CYP450 específicas en sus organismos y si el sustrato que se metaboliza es activo por sí mismo o si, por el contrario, se activa a través de la reacción catalizada por la enzima CYP450. Según el consenso general, las dos principales causas que provocan la variación inter-individual del metabolismo de los fármacos son: los polimorfismos genéticos y la inducción o inhibición enzimática debida al suministro concomitante de otros fármacos, factores ambientales o al mismo sustrato (Dees *et al*, 2005).

2.3.3.2 Metabolismo de drogas utilizadas en el tratamiento de linfomas T

Los linfomas de células T (LCT) constituyen un complejo grupo de tumores, más de la mitad de estos se clasifican como inespecíficos, grupo que incluye tumores heterogéneos tanto histológica como clínicamente. Los LCT son considerados tumores agresivos, con una pobre respuesta al tratamiento y un período menor de sobrevida que los linfomas de células B, típicamente menos del 30% de los casos de LCT superan un periodo de supervivencia de 5 años (Foss *et al*, 2011).

Como se mencionó anteriormente, en la actualidad la terapia más efectiva para el tratamiento de LCT, es un régimen de combinación quimioterapéutica, denominado CHOP: Ciclofosfamida, Doxorubicina, Vincristina y Prednisona. En algunos casos la adición de drogas con actividad anti-linfoma como el Etopósido (CHOEP), contribuyen a la efectividad de las terapia (Rodriguez-Antona *et al*, 2007).

Fármaco/Pro-fármaco	Mecanismo de acción	P450 activación	P450 inactivación
Ciclofosfamida	Agente alquilante	CYP2B6 CYP3A4	
Doxorrubicina	Antibiótico citotóxico	CYP3A4	
Vincristina	Inhibición de la polimerización de la tubulina		CYP3A
Prednisona	Efecto glucocorticoide	CYP3A	
Etoposido	Inhibición de la topoisomerasa II		CYP3A CYP2E1 CYP1A2

Tabla 3: Drogas quimioterapéuticas actualmente utilizadas en el tratamiento de LCT. Adaptado de Morag et al, 2004.

La totalidad de las drogas quimioterapéuticas utilizadas actualmente para el tratamiento de LCT son metabolizadas en primera instancia por enzimas pertenecientes a la subfamilia CYP3A.

Son varias las subfamilias de enzimas CYP450 involucradas en la inactivación de fármacos anti-tumorales. La subfamilia CYP3A participa en la resistencia a Vincristina, fármaco inhibidor de la polimerización de la tubulina, utilizados en quimioterapia contra linfomas, cáncer de mama y de pulmón. Por otra parte, también juega un rol importante en la resistencia a Etopósido, compuesto farmacológico capaz de inhibir la enzima topoisomerasa II. Contrariamente a la acción enzimática descrita anteriormente, existen subfamilias de enzimas CYP450 que catalizan reacciones cuyo producto son metabolitos con potentes propiedades antitumorales. Ejemplos de este fenómeno son la Ciclofosfamida, la Doxorrubicina y la Prednisona, pro-fármacos metabolizados por la enzima CYP3A4 (Quiñones *et al*, 2008).

3. Hipótesis

Nuestra hipótesis general de trabajo es que existe una relación entre las vías de señalización activadas por hormonas tiroideas y la regulación de la expresión de las enzimas pertenecientes a la subfamilia CYP3A. Esta subfamilia es responsable del metabolismo de aproximadamente el 50% de las drogas actualmente utilizadas, más aun, participa del metabolismo de todos los compuestos quimioterapéuticos utilizados en el tratamiento de LCT. Por lo tanto, esta modulación estaría implicada en la respuesta a la terapia de los pacientes con LCT. Asimismo, que la integrina $\alpha\beta3$ y la proteína transdutora de señal y activadora de la transcripción 1 (STAT1) participan como receptor de membrana plasmática y factor de transcripción respectivamente, en esta vía de señalización iniciada por hormonas tiroideas en LCT.

4. Metodología

4.1 Ensayos in vitro con la línea celular Jurkat

4.1.1. Suspensiones celulares y condiciones de cultivo

La línea celular de origen humano Jurkat, utilizada en el desarrollo de este trabajo, es un linfoma de células T de origen inmaduro, que fue cedida gentilmente por la Dra. Roxana Schillaci (IBYME-CONICET, Argentina).

Las células fueron cultivadas en concentraciones óptimas para su crecimiento ($1-5 \times 10^5$ células/ml) en medio Dubelcco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Sigma Aldrich, USA) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB, Gibco BRL) y mantenidas a 37°C en una atmósfera con 5% CO₂. El medio de cultivo fue renovado diariamente una vez que las células alcanzaron el crecimiento exponencial.

Las células Jurkat fueron mantenidas en forma de macrocultivos en frascos T-25 o T-75, o cultivadas en microplacas de 6 o 12 pocillos para la obtención de extractos celulares utilizados luego en los distintos ensayos.

4.1.2 Tratamientos in vitro con la línea celular Jurkat

Antes de realizar los tratamientos las células fueron sincronizadas, cultivándolas durante 24 horas en medio DMEM en ausencia de SFB.

En los ensayos realizados, las células fueron tratadas a distintos tiempos con concentraciones fisiológicas de HTs libres (T₃= 1nM; T₄= 100 nM, Sigma Aldrich Co) y con HTs unidas a agarosa (HTs-ag) en concentraciones similares. Ambos tipos de HTs unidas a agarosa fueron sintetizadas en el laboratorio del Dr. Farías y se obtuvieron de la misma forma en la que se describió previamente en nuestros trabajos (Barreiro Arcos *et al*, 2011).Brevemente, el brazo

espaciador (entre la matriz y el grupo activado), “*N-Hydroxysuccinimide (NHS)-activated Sepharose 4 FastFlow 14- atom*”, se obtuvo de la compañía GE Healthcare (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden). Los grupos amino primarios de las HTs fueron unidos directamente al grupo éster activo para formar una unión amida de acuerdo a las indicaciones del proveedor (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden). La presencia de T₃ y T₄ libres, testada por RIA, fue muy baja, menos de 1 mol por hormona libre cada 10⁵-10⁴ moles de HTs unidas a agarosa. La estabilidad del conjugado hormona-agarosa, se determinó en los sobrenadantes de cultivos de 24 horas con T₃-ag o T₄-ag y no se obtuvieron niveles detectables de hormonas libres en los mismos.

La ventaja de poder utilizar estos dos tipos de HTs radica en que las HTs en su forma libre actúan tanto de manera genómica como no genómica; mientras que el sistema HTs- ag nos permite evaluar solo los efectos iniciados en la membrana plasmática, ya que las mismas son incapaces de atravesarla y acceder al núcleo.

Según, el tipo de ensayo realizado, las células pueden o no recibir un pre-tratamiento. El objetivo de los mismos es bloquear la actividad de moléculas que participan en los efectos iniciados por las HTs, por lo tanto, se logra de forma indirecta la inhibición del estímulo hormonal.

Estos inhibidores fueron adicionados entre los 30 y 60 minutos previos a la estimulación hormonal.

Para evaluar la inhibición de las integrinas se realizó una pre-incubación con un péptido cuya secuencia aminoacídica es Arginina-Glicina-Aspartato (RGD, Sigma-Aldrich, Switzerland). Esta molécula es un péptido capaz de bloquear físicamente la unión entre las integrinas y sus ligandos. En los ensayos realizados fue utilizado a una concentración final 10⁻⁶ M.

También se evaluó el efecto de la inhibición de las esfingomielinasas neutras, en este caso el inhibidor utilizado fue GW4869 (3,3'-(1,4-fenileno) bis [N-[4-(4,5-dihidro-1H-imidazol-2-il) fenil]-dihydrochloride-2-propenamida, Sigma-Aldrich), esta molécula es permeable a la

membrana celular y capaz de inhibir de manera no competitiva la actividad enzimática. Fue utilizado a una concentración final de 10^{-7} M.

Se utilizaron también los inhibidores denominados TyrphostinAG490 (*Tirfostina B42*, Sigma-Aldrich), y BAY ((*E*)-3-[(4-metilfenilsulfonyl)-2-propenonitrilo, Sigma-Aldrich), estas moléculas actúan como inhibidores farmacológicos de la vía de señalización JAK/STAT y del factor de transcripción NF- κ B, respectivamente. Todos los inhibidores se utilizaron a una concentración final 5 μ M.

4.1.3 Transfecciones con ARN de interferencia (siARN)

Para cada transfección realizada se utilizaron aproximadamente 10^6 células en 400 μ l de medio DMEM, estas fueron mezcladas con 1 μ l de la solución que contiene siARN a una concentración final de 50nM. Se utilizaron siARNs contra la secuencia que codifica para la proteína α v y para la proteína β 3, además contra la secuencia que codifica para la proteína STAT1 y contra una secuencia no codificante utilizada como control.

Luego las células Jurkat fueron electroporadas a 250 V por 15 milisegundos en el electroporador BTX ECM (Liu *et al*, 2007). Posteriormente, fueron cultivadas en medio DMEM suplementado con 10% SFB por 36 horas. Seguidamente se realizaron los tratamientos correspondientes a cada ensayo.

4.1.4 Extracción de ARN total

El ARN total fue extraído de células Jurkat tratadas según los protocolos descriptos previamente y de tejido murino, tanto hepático como tumoral (ver sección 4.2.4), usando el kit Tri-Reagent (Genbiotech SRL) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, las células provenientes de distintas condiciones, o el tejido disgregado fueron homogeneizados a temperatura ambiente en 1 ml del reactivo Tri-Reagent. El homogenato fue separado en fase

acuosa y orgánica por adición de cloroformo y posterior centrifugación. El ARN permanece exclusivamente en la fase acuosa, por lo tanto la fase orgánica es descartada. Luego el ARN es precipitado por el agregado de isopropanol, lavado con etanol 70% y finalmente solubilizado en agua libre de enzimas capaces de degradar ARN y guardado a -80°C .

La concentración de ARN total fue cuantificada midiendo por espectrometría la absorbancia a 260 nm. La pureza de las preparaciones de ARN se determinó midiendo la relación de absorbancias 260/280 nm.

4.1.5 Ensayo de transcriptasa reversa (RT)

La RT fue realizada utilizando el kit Omniscript (QIAGEN) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente 1 μg de ARN total fue añadido a una mezcla que contiene 1 μM de oligodeoxitimidina (Biodybamics), 0.5 mM de dNTPs (*Solucion mezcla de deoxinucleótidos*, Promega), 4 unidades de Omniscript Transcriptasa reversa y 2 μl de buffer de RT 10X provisto por el kit cuyo volumen final es de 20 μl . La mezcla fue incubada a 37°C por 60 minutos (Veriti, AppliedBiosystems). El ADN complementario (ADNc) así obtenido fue congelado a -20°C o utilizado inmediatamente para cuantificación por qPCR.

4.1.6 Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real, cuantitativa (qPCR)

A partir de ADN molde (ADNc) obtenido por RT, como se explica anteriormente, se realizaron las amplificaciones por PCR en tiempo real utilizando la mezcla comercial SYBR Green (AppliedBiosystem). Ésta contiene todos los componentes necesarios para que la reacción sea llevada a cabo: ADN polimerasa, colorante fluorescente SYBR Green, MgCl_2 (*Cloruro de Magnesio*), dNTPs y estabilizadores. El colorante de referencia ROX (necesario para reacciones llevadas a cabo en equipos Applied Biosystems) y el agua libre de ARNasas también son suministrados por el kit. Los primers y el templado (ADNc) utilizado dependen de cada ensayo.

En los experimentos aquí realizados la reacción de qPCR fue llevada a cabo en el equipo Applied Biosystems 7500.

Las secuencias de los primers utilizados para la misma se especifican en la Tabla 5 y se obtuvieron de distintas fuentes bibliográficas dependiendo de si su blanco es una muestra de origen humano o murino (Rodríguez –Antonaet al, 2007 y Martignoni et al, 2006, respectivamente)

GEN	SECUENCIA (5' → 3')	
HUMANOS		
CYP3A4	CATTCCTCATCCCAATTCTTGAAGT	F
	CCACTCGGTGCTTTTGTGTATCT	R
CYP3A5	GCTCGCAGCCCAGTCAATA	F
	AGGTGGTGCCTTATTGGGC	R
CYP3A7	AAGGGCTATTGGACGTTTGACA	F
	ATCCCACTGGCCCCGAAAG	R
CYP3A43	AATACGAACATTGCTATCTCCAGCT	F
	GCTTCTCACCAACATATCTCCACAT	R
MURINOS		
CYP1A1	ATAAGGTCATCACGATTGTTTTGG	F
	GGTACATGAGGCTCCACGAGAT	R
CYP1A2	CGTCAGCAAGCTTCAGAAGG	F
	CGATGTTTCAGCATCTCCTCG	R
CYP2B10	CAGGTGATCGGCTCACACC	F
	TGACTGCATCTGAGTATGGCATT	R
CYP3A11	TCACACACACAGTTGTAGGGAGAA	F
	GTCCATCCCTGCTTGTGTTGTC	R

Tabla 4: Secuencias de primers utilizados para qPCR.

El programa de amplificación utilizado se detalla a continuación en la Tabla 6

PROGRAMA	T (°C)	TIEMPO	N° CICLOS
Holding	95	5 minutos	1
Cycling	95	10 segundos	40
	60	15 segundos	
	95	30 segundos	
Melting	95	15 segundos	1
	60	1 minuto	
	95	30 segundos	
	60	15 segundos	

Tabla 5: Programa de amplificación utilizado en los ensayos de qPCR.

La detección directa de los productos de PCR se monitoreó midiendo el incremento en la fluorescencia resultante de la unión del colorante al ADN doble cadena. Todas las muestras fueron testeadas contra el gen de referencia β 2- microglobulina, usado como control interno para la normalización de datos, procedimiento necesario para la corrección de las variaciones en calidad y cantidad de ADNc.

La cuantificación de la expresión del gen blanco fue realizada mediante un análisis de $\Delta\Delta C_t$ para calcular las diferencias entre tratamientos (Livak y Schmittgen, 2001).

4.1.7 Análisis de expresión de proteínas por Western Blot

Muestras de lisados de 5×10^6 células provenientes de los distintos tratamientos mencionados anteriormente, fueron obtenidos por disolución de los pellets celulares en 100 μ l de buffer de lisis: BME (2- β - mercaptoetanol) 10 mM, EDTA (*Ácido etilendiaminotetraacético*) 2mM, ácido etilenglicolbis (β - aminetileter), EGTA (*N-Ntetraacético*) 2mM, PMSF

(*fenilmetilsulfonil fluoruro*) 1mM, leupeptina 10 µg/ml y HEPES (*ácido 4- (2-hidroxietyl)-1-piperazina etanosulfónico*) 20 mM. pH 7.4; y centrifugados a 30 minutos a 15000g a 4 °C para obtener las fracciones solubles en el sobrenadante.

Los extractos proteicos así obtenidos fueron cuantificados mediante el método Bradford.

Se mezclaron de cada muestra el volumen correspondiente a 25 µg de extracto proteico con la solución de carga: SDS (*Dodecilsulfato sódico*) 2%, glicerol (*propanotriol*) 10%, Tris-HCl (*trisaminometan-Ácido Clorhidrico*) 62.5 mM. pH 6.8; azul de bromofenol (*3,3,5,5 - tetrabromofenol sulfonftaleína*) 0.2 %, con BME 1%, se sembró la mezcla en un gel de poliacrilamida al 10% para separar dichas proteínas por SDS-PAGE (*electroforesis en gel depoliacrilamida con dodecilsulfato sódico*) y luego transferirlas a membranas de nitrocelulosa. El marcador de peso molecular utilizado fue Full-Range Rainbow (GE Healthcare). Para corroborar la eficiencia de la carga y de la transferencia dichas membranas fueron coloreadas con Ponceau S.

Las membranas que contienen las proteínas correctamente separadas fueron bloqueadas con seroalbúmina bovina (BSA, Sigma Aldrich) 5% en PBS-Tween (*Buffer fosfato salino-Polioxietilen(20)sorbitanmonolaurato*) 0.1 % durante toda la noche a 4°C. Luego, se incubaron durante un período de 2 horas a temperatura ambiente y en agitación los anticuerpos primarios. Todos los anticuerpos utilizados se detallan a continuación:

pSTAT1	Reconoce el residuo Tyr 701 fosforilado	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA)
STAT1	Reconoce la secuencia correspondiente a los aminoácidos 84-91 localizado en el extremo C terminal.	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA)
CYP3A4	Reconoce los aminoácidos 204-503 del extremo C terminal del CYP3A4 humano.	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA)

GAPDH	Reconoce toda la secuencia aminoacídica.	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA)
pNF-κB	Reconoce el residuo Ser536 únicamente cuando se encuentra fosforilado.	CellSignalingTechnology (US)
NF-κB	Reconoce la secuencia correspondiente a los aminoácidos 532-551 en el extremo C terminal.	Abcam (UK)

Tabla 6: Anticuerpos utilizados en los ensayos de Western Blot.

Tras realizar tres lavados con PBS-Tween 0.1% las membranas fueron incubadas con un anticuerpo policlonal anti-IgG-HRP de conejo conjugado con peroxidasa (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación.

La quimiolumiscencia fue visualizada utilizando el kit comercial Amersham ECL Western Blotting Analysis System (Amersham Biosciences) y utilizando el documentador de geles ImageQuant (GE). Los análisis densitométricos fueron realizados utilizando el software ImageJ.

4.1.8 Ensayo de la actividad enzimática de CYP3A4

La actividad enzimática de CYP3A4 se midió con el kit P450-Glo Assays (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, las células fueron cultivadas como mencionamos anteriormente y se le realizaron los tratamientos correspondientes por 48 horas. Se preparó la solución de sustrato de CYP3A4 asociado a la luciferina PFBE a la concentración correspondiente. Se centrifugaron las células y se resuspendieron en DMEM a una concentración de 2×10^6 células/ml. El sustrato de CYP3A4 y las células se mezclaron en partes iguales y se incubaron 15 minutos en estufa gaseada a 37°C. Posteriormente se le agregó igual volumen de reactivo de detección de luminiscencia provisto en el kit y se estabilizó a temperatura ambiente

15-20 minutos. Se midió la luminiscencia en el luminómetro NOVOstar (BMG Labtech, Germany) con un tiempo de integración de 0.25-1 segundos.

4.2 Análisis in vivo

Los animales utilizados fueron adquiridos en el Instituto de Investigaciones Biomédicas (BIOMED)-UCA-CONICET. Se emplearon ratones C57B1/6J (C57)(H-2^b) machos de 8 semanas de edad, que fueron tratados como se detalla a continuación. Los protocolos experimentales en animales fueron aprobados por el Comité Institucional para Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CICUAL), Facultad de Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.

4.2.1 Modelo de Hipertiroidismo

Para lograr el estado hipertiroidico se administró T₄ en el agua de bebida de los ratones a tratar, ya que esta hormona sintética constituye el tratamiento estándar de reemplazo hormonal empleado en los pacientes hipotiroideos. Si bien existen evidencias sobre el uso de terapias combinadas de T₃ y T₄, sigue siendo la T₄ la hormona de elección, dada su eficacia y seguridad (Maet *al*, 2009; Okosieme ,2011). Por otra parte, la vida media de la tiroxina es mayor que la de la T₃, lo que permite lograr una potencia constante y una acción prolongada al ser convertida a T₃ en los tejidos periféricos (Mendoza Patino, 2008). Para obtener ratones hipertiroidicos, por lo tanto, se les administró T₄ en una concentración de 12 mg/len el agua de bebida, durante 28 días. Se utilizó la sal sódica de T₄ (Sigma-Aldrich) convenientemente disuelta en 0,1N NaOH (*hidróxido de sodio*), con el agregado inmediato de agua corriente de modo de lograr un pH no mayor a 7,8. Esta concentración de T₄ en el agua de bebida durante 28 días genera un aumento en los valores séricos de T₄, que va de 5,5±0,7 µg/dl en ratones eutiroidicos a 32,7±1,8 µg/dl en los ratones tratados con esta concentración de T₄. También induce un

incremento en los valores séricos de T_3 , pasando de $115 \pm 12,5$ ng/dl en ratones eutiroideos a $423 \pm 47,1$ ng/dl en ratones tratados con T_4 en el agua de bebida.

4.2.2. Modelo de Hipotiroidismo

Para promover bajos niveles de HTs *in vivo* se sometió a los ratones a un tratamiento con el agente PTU (*anti-tiroideopropiltiouracilo*, Sigma-Aldrich). El PTU es una tiourea que interfiere con la oxidación del yodo por interacción con la peroxidasa tiroidea, inhibiendo de esta forma la síntesis de T_3 y T_4 . Adicionalmente, este agente inhibe la deiodinasa involucrada en la conversión periférica de T_4 a T_3 . (Fabris, 1973; Geffner *et al*, 1975). El fármaco se administró disuelto en el agua de bebida en $0,5$ g/l durante 15 días. Es importante destacar que la dosis de PTU empleada está en el rango de la mínima dosis de mantenimiento del estado eutiroideo en pacientes con enfermedad de Graves (Kashiwai *et al*, 2003).

4.2.3 Determinaciones hormonales en sueros

4.2.3.1 Determinaciones de T_3 y T_4

Para el dosaje de los niveles de HTs en sangre, los ratones fueron anestesiados en cámara de CO_2 y posteriormente sangrados a través del seno retro-orbital. La sangre obtenida fue centrifugada y se separó el suero, donde se realizó la determinación de los niveles hormonales de T_3 y T_4 por técnicas radioinmuno-analíticas empleando kits comerciales para HTs humanas (Immunotech, Praga, República Checa), siguiendo las indicaciones del fabricante. Esto es posible gracias a la alta reactividad cruzada con las hormonas murinas por tratarse de hormonas peptídicas. Brevemente, se utilizaron tubos recubiertos con anticuerpos monoclonales anti- T_3 o - T_4 , a los cuales se agregaron las muestras de suero junto con un trazador de T_3 o T_4 marcado con ^{125}I . Se realizó una incubación de 1 hora, con agitación a temperatura ambiente, y luego se aspiró

el contenido de los tubos. Los kits proveen calibradores de concentraciones conocidas de T₃ y T₄, que son procesados de igual manera que los sueros y son utilizados para generar una curva estándar. Posteriormente se determinó la radiactividad de la T₃ o T₄ unida al anticuerpo en contador de centelleo sólido (Alfanuclear). Los resultados de dosis fueron calculados a partir de las curvas de calibración rectificadas por logit-log, con el programa EXCEL. Se realizaron también los correspondientes controles de calidad internos, intra-ensayo y entre-ensayos.

4.2.3.2 Radioinmunoensayo para la determinación cuantitativa de Tirotrófina (TSH)

Los valores de TSH en suero no pudieron ser cuantificados por métodos comerciales por ser ensayos desarrollados con elevada sensibilidad y especificidad para la TSH humana, sin reacción cruzada con la TSH murina. Por este motivo el dosaje de TSH en los sueros de los ratones se realizó con un radioinmunoensayo puesto a punto con los siguientes reactivos provistos por el Dr. Parlow (National Hormone and Pituitary Program, NIH, USA):

- TSH de rata (NIDDK-rTSH-I-9) (AFP-115428): ampollas de 100 g de TSH liofilizado, para radioiodinación.
- Antisuero de cobayo anti-TSH murina (AFP98991) en suero normal de cobayo en PBS, provisto liofilizado para reconstituir a 1 ml. $K_a \approx 1 \times 10^{10}$ a $2 \times 10^{10} M^{-1}$.
- Preparación de referencia de TSH de ratón purificada (AFP51718MP) para la preparación de estándares, provista en ampollas de 100 g.

La radioiodinación directa de la TSH (NIDDK-rTSH-I-9) (AFP-115428) con ¹²⁵I (New England Nuclear) se realizó empleando el método de Iodogen (1, 3, 4, 6 tetracloro 3, 6 difenilglicouril- Sigma Aldrich), desarrollado por Fraker y Speck (1978). Se realizó la titulación del antisuero para determinar la dilución del mismo a emplear en el ensayo. Así se seleccionó la

dilución 1:950.000, tal que en ausencia de antígeno frío fuera capaz de unir el 50% del antígeno marcado agregado en trazas (Ekins, 1974). Los calibradores, en un rango de concentraciones entre 20 y 300 ng/ml, se fabricaron a partir de una solución madre preparada con la TSH de referencia (AFP51718MP) solubilizada en PBS-BSA al 1%. Adicionalmente se prepararon muestras de control de calidad empleando sueros hipertiroideos como matriz, con el agregado de cantidades conocidas de TSH. Para que estas muestras pudieran en efecto ser empleadas como muestras de control de calidad, se realizaron 5 ensayos iniciales para establecer su rango de concentraciones.

Para la realización de los ensayos se siguió el siguiente protocolo: Se agregó a cada tubo 0,2 ml de antisuero, 0,15 ml de trazador y 0,05 ml de hormona fría (calibrador o muestra). Luego de un período de incubación de 16 horas en frío (4°C), se separó la fracción unida de la libre por el agregado de un segundo anticuerpo anti-gamma globulina de cobayo, obtenido en cabra (Antibodies Incorporated, California, USA). Se realizó una segunda incubación de media hora y luego se procedió a centrifugar durante 20 minutos a 600g. En cada tubo, la fracción libre presente en el sobrenadante se eliminó por aspiración y se conservó el precipitado para su medición en un contador gamma (Alfanuclear).

Los resultados de dosis fueron calculados a partir de las curvas de calibración rectificadas por logit-log, con el programa EXCEL y posteriormente se realizaron los correspondientes controles intra- y entre-ensayos.

4.2.4 Obtención de tumores sólidos

Se utilizó un modelo de trasplante tumoral singéneo en ratones C57 con diferentes estados tiroideos, empleando la línea celular proveniente de estos mismos ratones, el linfoma EL-4.

Las células EL-4 fueron mantenidas en cultivo, tal como se mencionó previamente (Sección 4.1.1), y antes de la inoculación, fueron lavadas con PBS estéril, contadas usando el

colorante de exclusión Azul Tripán (SigmaAldrich) y resuspendidas a una concentración de $1,5 \times 10^6$ células/ml en PBS. Posteriormente, 200 μ l de esta suspensión celular fueron inoculados por vía subcutánea en los ratones C57 de manera de generar un tumor sólido.

Trabajos previos de nuestro laboratorio (Sterle *et al*, 2014) muestran que a partir del día 10 luego de la inoculación, existen diferencias significativas en el tamaño de los tumores entre los grupos. Por lo tanto, al día 10, los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical y los tumores generados fueron extraídos en su totalidad, posteriormente el tejido fue dividido para ser utilizado en ensayos de cuantificación de ARNm (ver sección 2.1.4)

4.3 Análisis estadístico

Para todos los experimentos se calcularon las medias, desviaciones estándares y errores estándares de los grupos. Las significancias estadísticas se evaluaron con el software GraphPad PRISM 4.0 Version para Windows (GraphPad Software Inc, La Jolla, California), utilizando la prueba estadística ANOVA de una vía seguido con contraste de Bonferroni o Tukey. Las diferencias entre las medias fueron consideradas significativas cuando $p < 0.05$. Los resultados están expresados como la media \pm error estándar (SEM).

5. Resultados

5.1 Estudio de la regulación de la expresión del citocromo P450 inducida por hormonas tiroideas

5.1.1 Estudio de la regulación de los niveles de ARNm de CYP3A4 inducida por hormonas tiroideas.

En humanos, las principales enzimas involucradas en el metabolismo de drogas quimioterapéuticas pertenecen a la familia del citocromo P450 (Zanger y Schwab, 2013), en particular las que conforman las subfamilias 1, 2 y 3. Trabajos recientes muestran que estas enzimas, que inicialmente se creía que eran expresadas exclusivamente en el hígado, son también sintetizadas en tejido extra-hepático normal o tumoral (Bruno y Njar, 2007). Por estas razones, se decidió estudiar los niveles de expresión de las distintas isoformas de la subfamilia CYP3A (CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7 y CYP3A43) en células de linfomas T estimuladas con hormonas tiroideas.

Con el objetivo de determinar cuál es el tiempo y la concentración hormonal óptima para realizar los estímulos, así como también cuales son las isoenzimas de la familia CYP3A cuyos niveles de ARNm se modulan ante este estímulo, se realizó el siguiente ensayo.

Las células recibieron tratamientos hormonales de 18 y 6 horas. Las HTs fueron adicionadas tanto en forma separada como en simultáneo, a concentraciones fisiológicas T_3 (1 nM) y T_4 (0,1 μ M), y un orden mayor 10nM y 1 μ M respectivamente; luego se realizó la extracción del ARNm y se midieron por qPCR los niveles correspondientes a cada isoenzima.

Como se observa en la figura 10, ante el estímulo hormonal de 18 horas, todas las isoenzimas de la familia CYP3A se ven reguladas positiva o negativamente por las HTs. En particular, se observa una tendencia al aumento en los niveles de mensajero de CYP3A4 y

CYP3A5 (figura 10 A y B respectivamente), mientras que para CYP3A7 y CYP3A43 (figura 10 C y D respectivamente) los resultados obtenidos muestran el comportamiento opuesto.

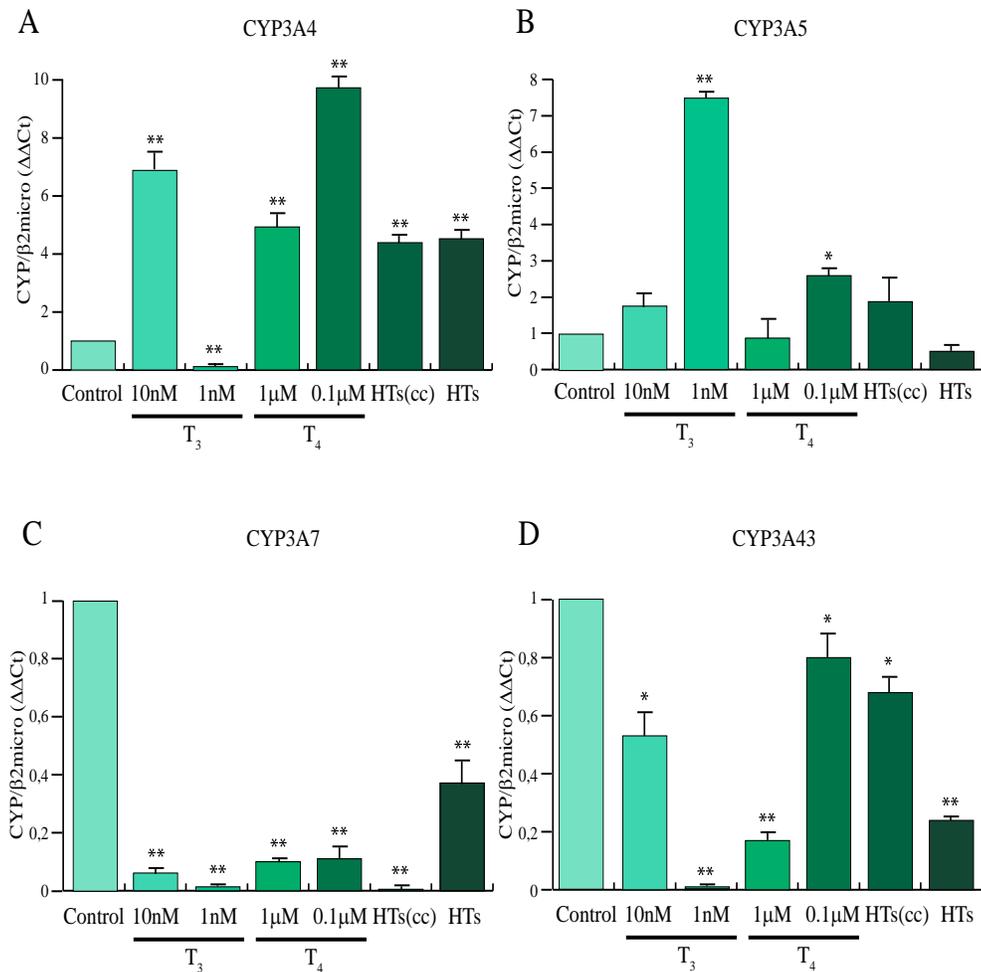


Figura 10: Análisis de la expresión de isoenzimas de la familia CYP3A inducido por HTs. Las células Jurkat fueron arrestadas por privación de SFB durante 24 hs y posteriormente incubadas **18 horas**, como se indica (HTs (cc) corresponde a T₃10nM+T₄1μM y HTs a T₃1nM+T₄0,1μM). El control corresponde a células que no recibieron estímulo hormonal. Posteriormente se extrajo el ARN total a partir del cual se sintetizó el ADNc. Se grafican los resultados obtenidos por qRT-PCR, con primers específicos para las isoenzimas CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7 y CYP3A43, mediante el análisis de ΔΔCt de n=3 ensayos y utilizando como gen normalizador la β2- microglobulina. * Difieren significativamente del control con p<0,05; **p<0,01.

En la figura 11 se observan los resultados obtenidos para las células que recibieron estímulos de 6 horas. Al igual que para el tratamiento de 18 horas, todas las isoenzimas modulan sus niveles de ARNm ante la presencia de HTs; sin embargo en esta condición, el comportamiento observado en casi todos los casos, tiende a la modulación positiva del mensajero. Evaluando particularmente los resultados obtenidos cuando las células son estimuladas con concentraciones fisiológicas de T₃ + T₄, durante 6 horas, todas las isoenzimas registran aumentos en sus niveles de ARNm.

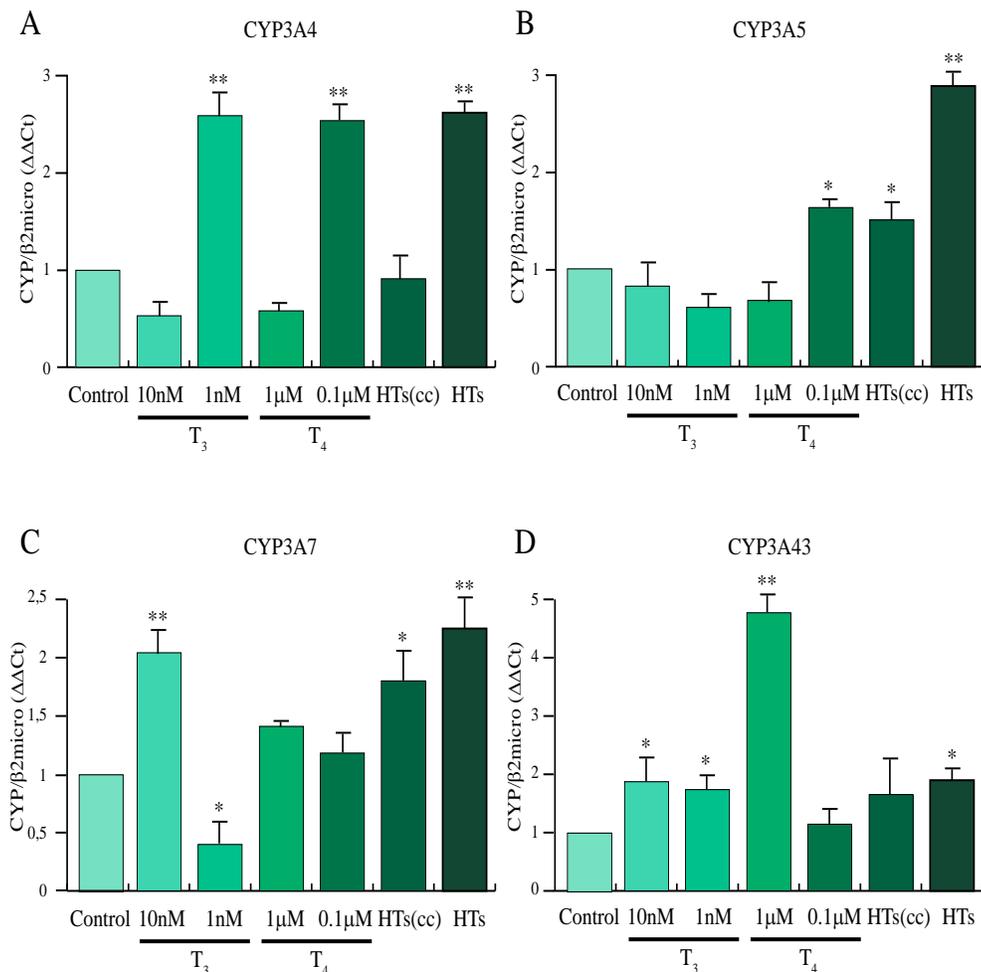


Figura 11: Analisis de la expresión de isoenzimas de la familia CYP3A inducido por HTs. Las células Jurkat fueron arrestadas tal como se señaló en la figura anterior y posteriormente fueron incubadas con las hormonas indicadas (HTs (cc) corresponde a T_3 10nm+ T_4 1 μ M y HTs a T_3 1nM+ T_4 0,1 μ M) durante **6 horas**. El control corresponde a células que no recibieron estímulo hormonal. Posteriormente se extrajo el ARN total a partir del cual se sintetizó el ADNc. Se grafican los resultados obtenidos por qRT-PCR, con primers específicos para las isoenzimas CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7 y CYP3A43, mediante el análisis de $\Delta\Delta C_t$ de n=3 ensayos y utilizando como gen normalizador la β 2- microglobulina. * Difieren significativamente del control con $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Considerando que en el ambiente celular se encuentran ambas hormonas y que, según los estudios realizados, estas actúan sinérgicamente, es que se decidió realizar los ensayos subsiguientes utilizando concentraciones fisiológicas de ambos tipos de hormona en forma simultánea.

De las cuatro isoenzimas que forman la subfamilia CYP3A en humanos, CYP3A4 es la responsable del metabolismo de aproximadamente el 50% de los fármacos actualmente utilizados (Molina Ortiz *et al*, 2012), además de ser la isoforma que se encuentra mayormente expresada en hígado (Zanger y Schwab, 2013). Los resultados obtenidos en los experimentos hasta aquí realizados, nos muestran que recibiendo estímulos de HTs a concentraciones fisiológicas, los LCT responden aumentando los niveles deARNm de CYP3A4; por lo tanto, los ensayos siguientes se centraran en el estudio de esta enzima en particular.

5.1.2 Estudio de la regulación de los niveles de ARNm de CYP3A4 inducida por hormonas tiroideas unidas a agarosa.

Trabajos anteriores muestran que las HTs son capaces de actuar a través de receptores localizados en la membrana plasmática (Basselt *et al*, 2013). Con el objetivo de evaluar si mediante acciones iniciadas en la membrana plasmática las HTs son capaces de inducir variaciones en los niveles de ARNm de CYP3A4, se utilizaron HTs unidas a agarosa (HTs-ag); este sistema impide el paso de las hormonas a través de la membrana.

Como puede observarse en la figura 12 A, el tratamiento de las células Jurkat con HTs-ag durante 18 horas, disminuye los niveles de ARNm de CYP3A4; mientras que el tratamiento durante 6 horas los aumenta (Fig. 12 B). Estos resultados muestran que el tratamiento hormonal con el sistema HTs-ag, realizado a distintos tiempos tiene un efecto diferencial sobre la síntesis de ARNm de CYP3A4.

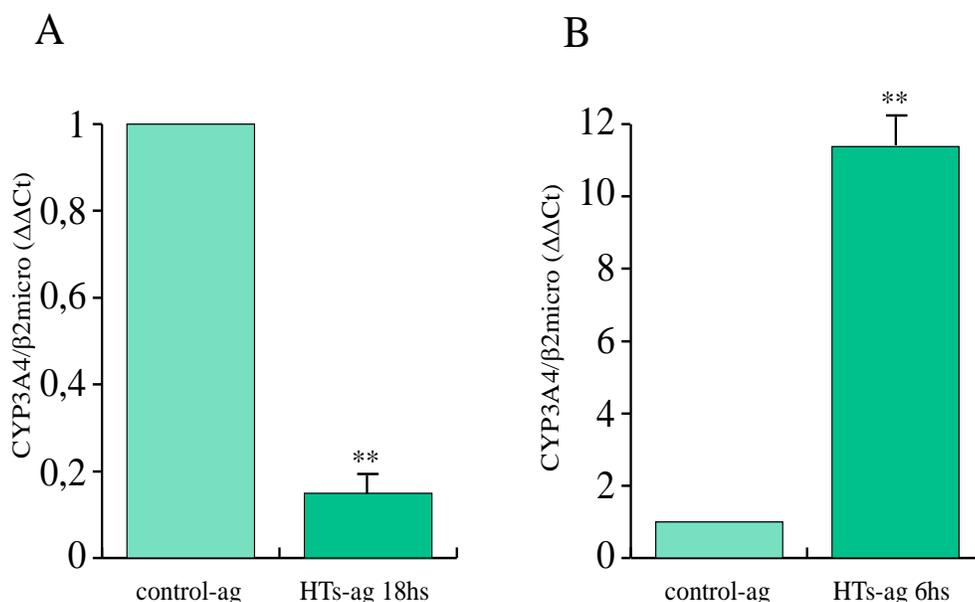


Figura 12: Análisis de la expresión de ARNm de CYP3A4 inducido por HTs a nivel de su receptor de membrana. Las células Jurkat fueron arrestadas por privación de SFB durante 24 hs y posteriormente incubadas durante 18hs (A) o 6 hs (B), con HTs-ag. El tratamiento control-ag, corresponde a células que recibieron estímulos con esferas de agarosa. Se grafican los resultados obtenidos por el análisis de $\Delta\Delta Ct$ de n=3 ensayos, utilizando como gen normalizador la $\beta 2$ -microglobulina. * Difieren significativamente con $**p < 0,01$.

Considerando que las HTs a concentraciones fisiológicas y actuando durante 6 horas, tanto en su forma libre como unida a agarosa, son capaces de inducir aumentos en los niveles de ARNm de CYP3A4, los ensayos siguientes en los cuales se cuantificó ARNm del citocromo 3A4 se realizaron en estas condiciones.

5.1.3 Estudio de la regulación de los niveles expresión de CYP3A4 inducida por hormonas tiroideas libres y unidas a agarosa.

Los estudios hasta aquí realizados muestran que las HTs tanto en su forma libre como unida a agarosa, son capaces de modular los niveles de ARNm de CYP3A4.

Por lo tanto, decidimos evaluar si la inducción en los niveles de ARNm se veía reflejada en el aumento proteico de CYP3A4.

Las células Jurkat fueron estimuladas durante 24 horas con concentraciones fisiológicas de HTs libres y con HTs-ag y luego, se obtuvieron extractos proteicos con los que se realizaron ensayos de Western Blot. Como se muestra en la figura 13 el estímulo hormonal induce mediante sus mecanismos clásico y no clásico el aumento de los niveles proteicos de CYP3A4. Estos resultados coinciden con los obtenidos para el ARNm, por lo tanto podemos decir que las HTs inducen la modulación a nivel tanto genómico como proteico del CYP3A4.

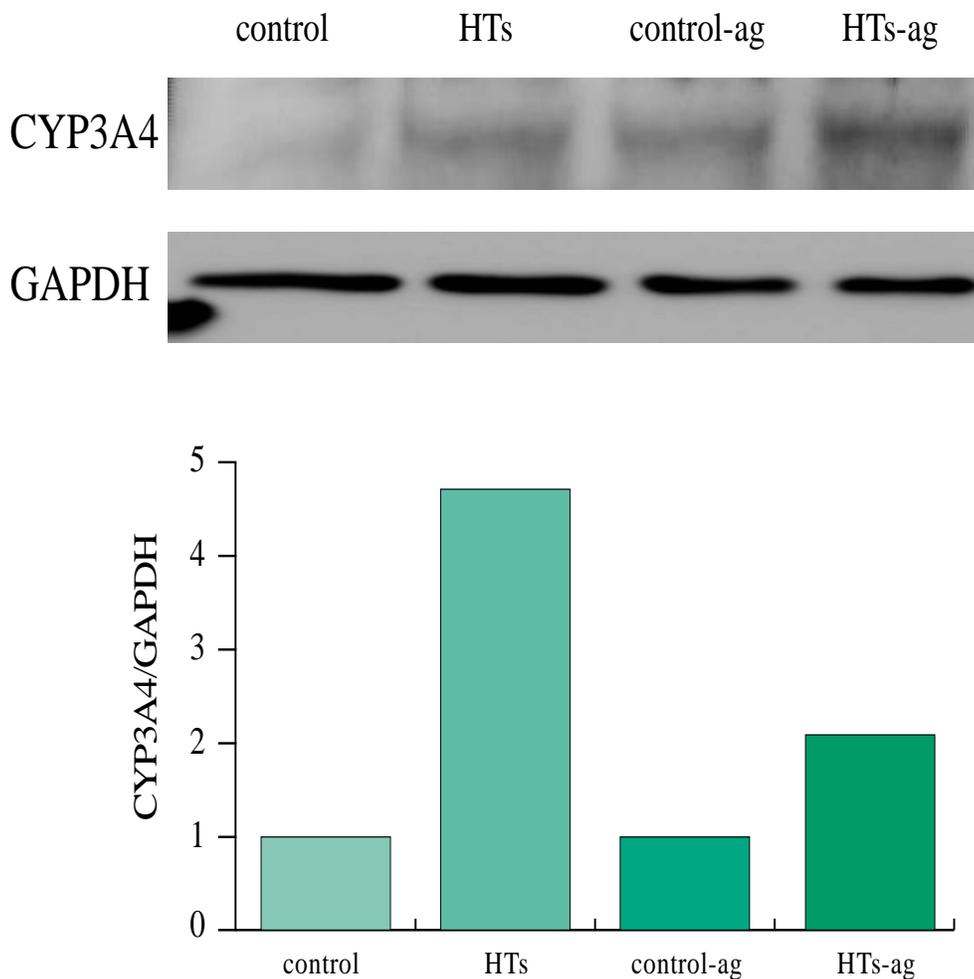


Figura 13: Análisis de la expresión proteica de CYP3A4 inducido por HTs. Las células Jurkat fueron mantenidas durante 24 horas en medio DMEM, privado de SFB, posteriormente fueron estimuladas durante 24 horas, con HTs libres y HTs unidas a agarosa a concentraciones fisiológicas; el tratamiento denominado control, corresponde a células que no recibieron estímulo hormonal, mientras que el control-ag se refiere a células a las cuales se les adiciono esferas de agarosa sin hormona. A partir de estas células, se obtuvieron las proteínas totales, se cuantificaron mediante el método de Bradford y luego se evaluaron los niveles proteicos de la isoenzima CYP3A4 por Western Blot. La proteína GAPDH fue utilizada como gen normalizador. Se muestra un experimento representativo de n=3 y el análisis densitométrico correspondiente a dicho experimento.

5.1.4 Estudio de la actividad de CYP3A4 inducida por hormonas tiroideas libres y unidas a agarosa.

Hasta el momento hemos demostrado que la estimulación hormonal con T₃ y T₄, a concentraciones fisiológicas, tanto en su forma libre como unida a agarosa, modula de forma positiva la isoenzima CYP3A4 en LCT. Los aumentos observados se producen tanto a nivel de ARNm como de proteína.

Con el objetivo de evaluar si esta modulación tiene como efecto final un cambio en la actividad enzimática de CYP3A4 se diseñó el siguiente ensayo. La actividad del CYP3A4 fue medida utilizando el kit P450-Glo Assays (ver Materiales y Métodos). En el mismo, las células fueron estimuladas con HTs libres, HTs-ag y dexametasona, esta última es un glucocorticoide sintético que actúa como inductor de la actividad enzimática de CYP3A4, y en este ensayo, es utilizada como control positivo.

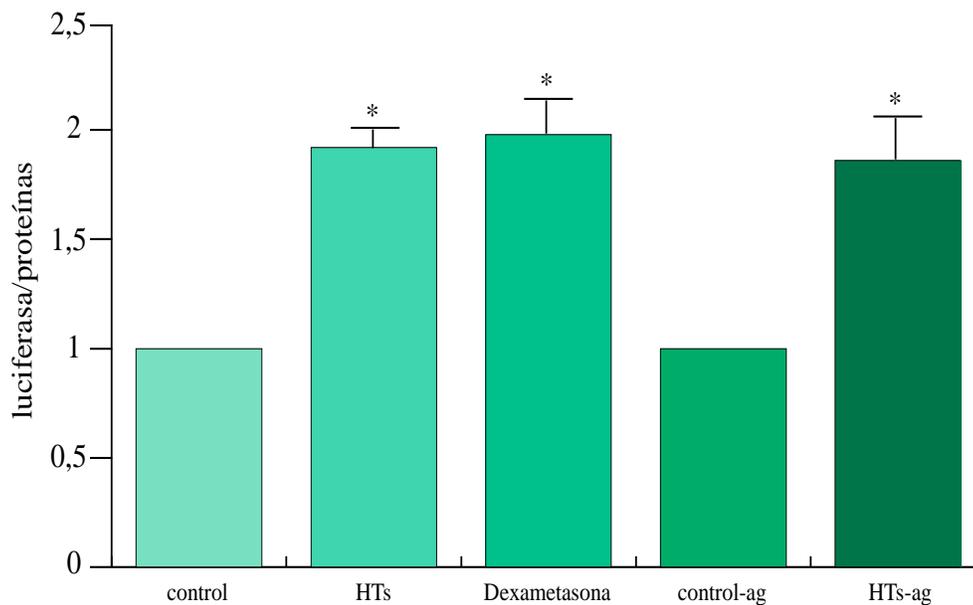


Figura 14: Estudio de la actividad enzimática de CYP3A4 inducido por HTs. Las células Jurkat fueron arrestadas por privación de SFB durante 24 horas, luego se realizaron los siguientes estímulos durante 48 horas: HTs libres y unidas a agarosa a concentraciones fisiológicas; los controles negativos corresponden a células sin estímulo y aquellas que recibieron tratamientos con esferas unidas a agarosa, el control positivo corresponde a células que recibieron dexametasona, que actúa como inductor de la actividad del CYP3A4. Luego se mezclaron 2×10^6 células de cada tratamiento con el sustrato de CYP3A4, se adiciono el reactivo de detección y se midió la luminiscencia. * Diferencia significativa entre tratamientos con $p < 0.05$.

Como se muestra en la figura 14, las HTs, tanto en su forma libre como unida a agarosa, inducen la activación metabólica de CYP3A4 respecto al tratamiento control, alcanzando niveles similares a los inducidos por dexametasona, compuesto utilizado en este ensayo como control positivo.

Hasta aquí, hemos demostrado que las HTs actuando a concentraciones fisiológicas, son capaces de inducir aumentos en los niveles de ARNm, proteicos y de actividad del citocromo 3A4.

5.2 Identificación del receptor involucrado en los efectos iniciados en la membrana plasmática por las HTs en células de linfoma T humano.

Hemos demostrado previamente que T₃ y T₄, tanto en su forma libre como unida a agarosa, actuando de manera conjunta y a concentraciones fisiológicas son capaces de producir un aumento en los niveles de CYP3A4 en LCT humanos.

Trabajos anteriores muestran que las HTs son capaces de ejercer efectos mediados tanto por su receptor nuclear (acciones clásicas), como por receptores de membrana plasmática (acciones no clásicas) (Cayrol *et al*, 2015).

En base a estos antecedentes y a los resultados que hemos obtenido previamente utilizando el sistema HTs-ag, decidimos identificar cual es la molécula de membrana que actúa como receptor para las mismas modulando la expresión y activación de CYP3A4.

Para ello se estudiaron como principales candidatas a las integrinas. Estas moléculas son proteínas de la membrana plasmática capaces de actuar como transductores de señales hacia el interior celular (Lin *et al*, 2013). Muchas integrinas contienen un sitio de reconocimiento para el péptido RGD, que contienen algunas proteínas de la matriz extracelular (Berh *et al*, 2005); mas aun, trabajos anteriores muestran que el sitio de unión de las HTs a la integrina se encuentra

cercano al sitio de unión a RGD (Hoffman SJ *et al*, 2002). Para determinar si las integrinas actúan como receptores de membrana para las HTs en LCT humanos, se bloqueó el sitio RGD mediante una pre-incubación de las células con este péptido. Luego, se realizó el estímulo hormonal con HTs y se evaluaron los niveles de CYP3A4.

Como se muestra en la figura 15, el pre-tratamiento con RGD durante 30 minutos, inhibe el aumento de la síntesis de ARNm de CYP3A4 inducido por las HTs libres.

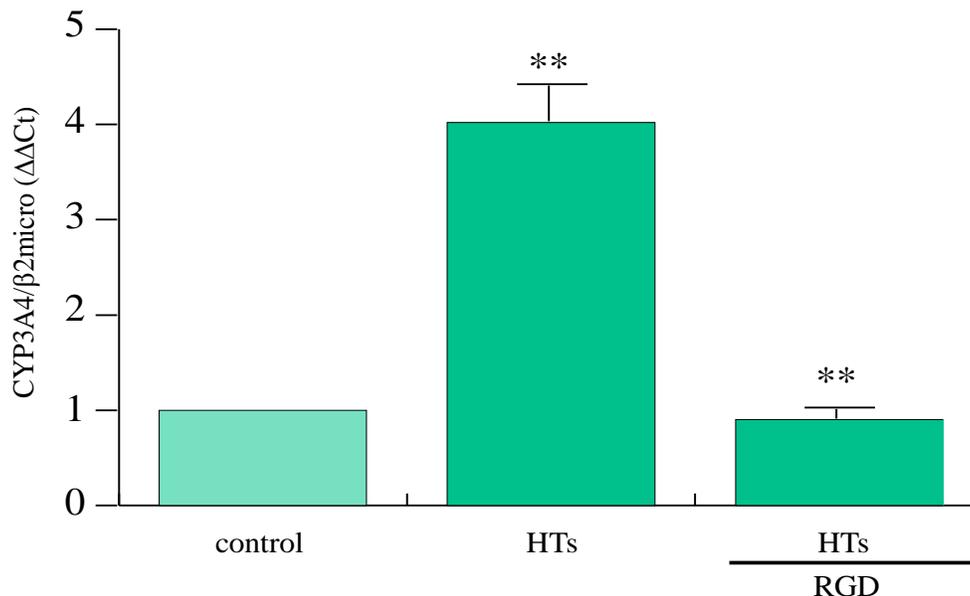


Figura 15: **Análisis de la expresión de ARNm de CYP3A4 inducido por la unión de HTs a integrinas.** Las células Jurkat fueron arrestadas por privación de SFB durante 24 horas, posteriormente pre-incubadas o no con RGD y luego incubadas 6 horas con HTs. El tratamiento control, corresponde a células que no recibieron estímulo hormonal. Se grafican los resultados obtenidos por el análisis de $\Delta\Delta Ct$ de $n=3$ ensayos \pm ES, utilizando como gen normalizador la $\beta 2$ -microglobulina. * Difieren significativamente con ** $p < 0,01$.

Con el objetivo de corroborar que el bloqueo de la integrina con el péptido RGD inhibe la activación inducida por las HTs a nivel de la membrana, se realizó la pre-incubación con el péptido RGD durante 30 minutos y luego el estímulo hormonal con HTs-ag. En este caso,

también, la presencia del péptido RGD revierte el aumento de CYP3A4 provocado por las HTs (Figura 16).

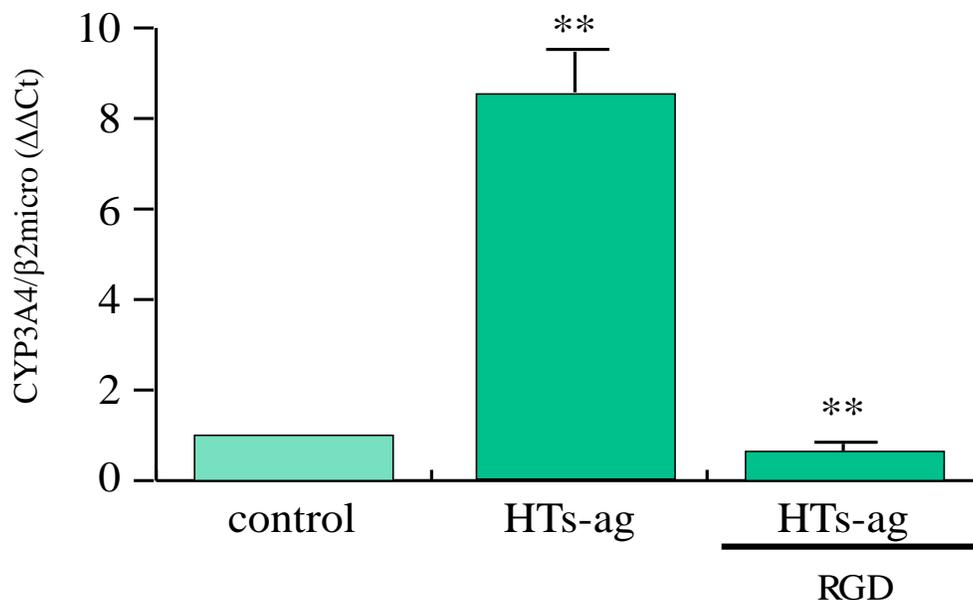


Figura 16: Análisis de la expresión de ARNm de CYP3A4 inducido por la unión de HTs a integrinas. Lascélulas Jurkat fueron arrestadas por privación de SFB durante 24 hs y posteriormente pre-incubadas o no 30 minutos, con RGD y luego incubadas 6 horas con HTs-ag. El tratamiento control, corresponde a células que recibieron tratamientos con esferas unidas a agarosa. Se grafican los resultados obtenidos por el análisis de $\Delta\Delta Ct$ de $n=3$ ensayos \pm ES, utilizando como gen normalizador la $\beta 2$ -microglobulina. * Difieren significativamente con $**p<0,01$.

Estos resultados indican que los efectos no clásicos iniciados por las HTs en la membrana plasmática, involucran la participación de integrinas capaces de unirse al péptido RGD y que son capaces de regular los niveles de ARNm de CYP3A4.

Resultados similares se encontraron cuando se evaluaron los niveles proteicos de CYP3A4. Las células de linfoma T fueron incubadas con el péptido RGD durante 30 minutos y luego, estimuladas tanto con HTs libres como unidas a agarosa. Finalmente se obtuvieron los

extractos proteicos y se realizaron ensayos de Western Blot para cuantificar los efectos inducidos tanto por RGD como por las HTs. En la figura 17 se observan los resultados obtenidos para este ensayo.

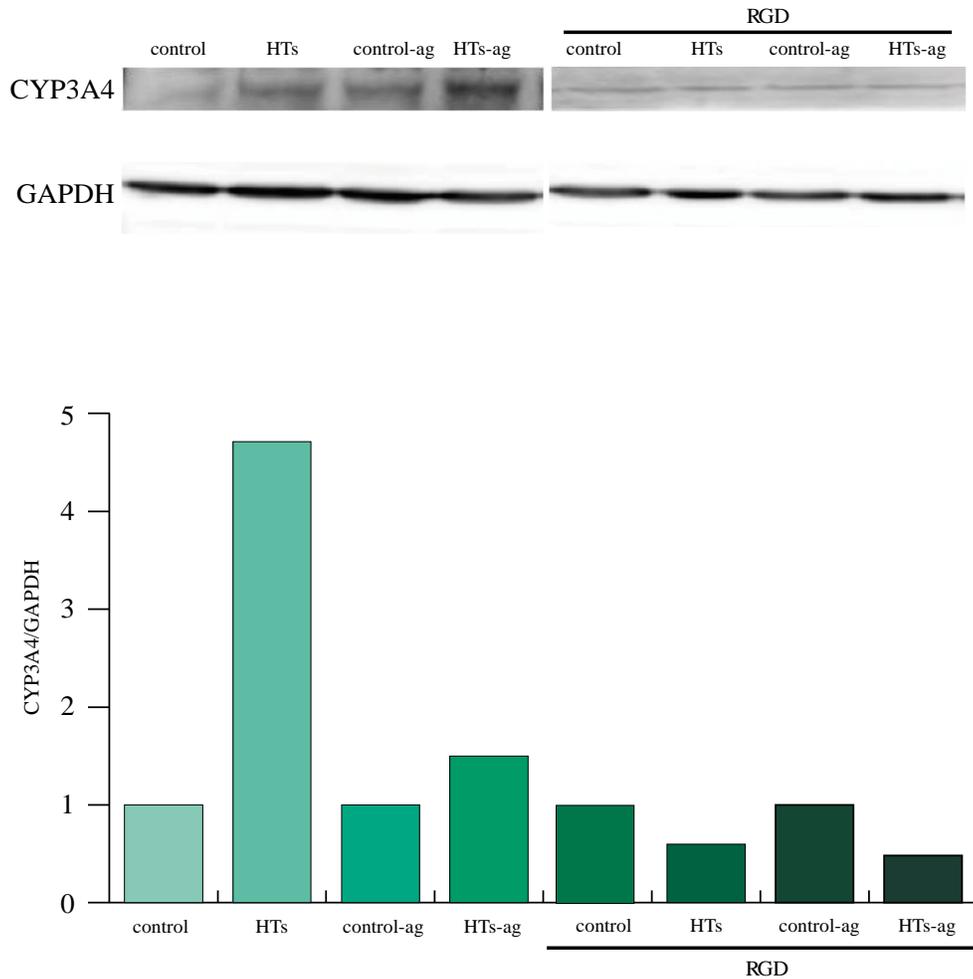


Figura 17: Análisis de la expresión proteica de CYP3A4 inducido por HTs. Las células Jurkat fueron mantenidas durante 24 horas en medio DMEM, privado de SFB, posteriormente fueron pre-tratadas o no por 30 minutos con RGD y tratadas durante 24 horas con HTs libres y HTs unidas a agarosa a concentraciones fisiológicas; el tratamiento denominado control, corresponde a células que no recibieron estímulo hormonal, mientras que el control-ag se refiere a células a las cuales se les adiciono esferas de agarosa. A partir de estas células, se obtuvieron las proteínas totales, se cuantificaron mediante el método de Bradford y luego se evaluaron los niveles proteicos de la isoenzima CYP3A4 por Western Blot. La proteína GAPDH fue utilizada como gen normalizador. Se muestra un experimento representativo de n=3 y el análisis densitométrico correspondiente a dicho experimento.

Estos resultados muestran que la presencia del péptido RGD revierte los efectos inducidos por las HTs, actuando estas en su forma libre como unida agarosa, lo que sugiere que la modulación de los niveles de CYP3A4 ocurre principalmente por mecanismos no clásicos.

Trabajos anteriores han demostrado que la integrina $\alpha\beta3$ es expresada en células tumorales, osteoclastos y células endoteliales en división (Sloan EK, *et al*, 2006); resultados obtenidos en nuestro laboratorio (Cayrol *et al*, 2015) muestran que las HTs son capaces de modular genes relacionados con la proliferación y la angiogénesis mediante la integrina $\alpha\beta3$ localizada en la membrana plasmática. Basándonos en esta información y considerando que los resultados obtenidos hasta aquí, indicarían la participación de una integrina con sitio de unión al péptido RGD en los efectos iniciados en la membrana plasmática por HTs, decidimos estudiar la participación de la integrina $\alpha\beta3$, como posible receptor de membrana para las HTs, a través del cual se activan las vías de señalización que modulan la expresión de CYP3A4. Para ello se utilizó una estrategia que permite regular de manera negativa la síntesis proteica de la integrina: transfecciones con ARN corto de interferencia (siARN) dirigidos contra el ARNm que codifica para la integrina α y para la proteína $\beta3$, respectivamente. Luego se realizaron los estímulos hormonales con HTs-ag, finalmente se midieron los niveles de ARNm de CYP3A4.

Como se observa en la figura 18, el bloqueo de la expresión de la integrina $\alpha\beta3$ utilizando siARN, inhibe el aumento del ARNm de CYP3A4 inducido por las HTs-ag.

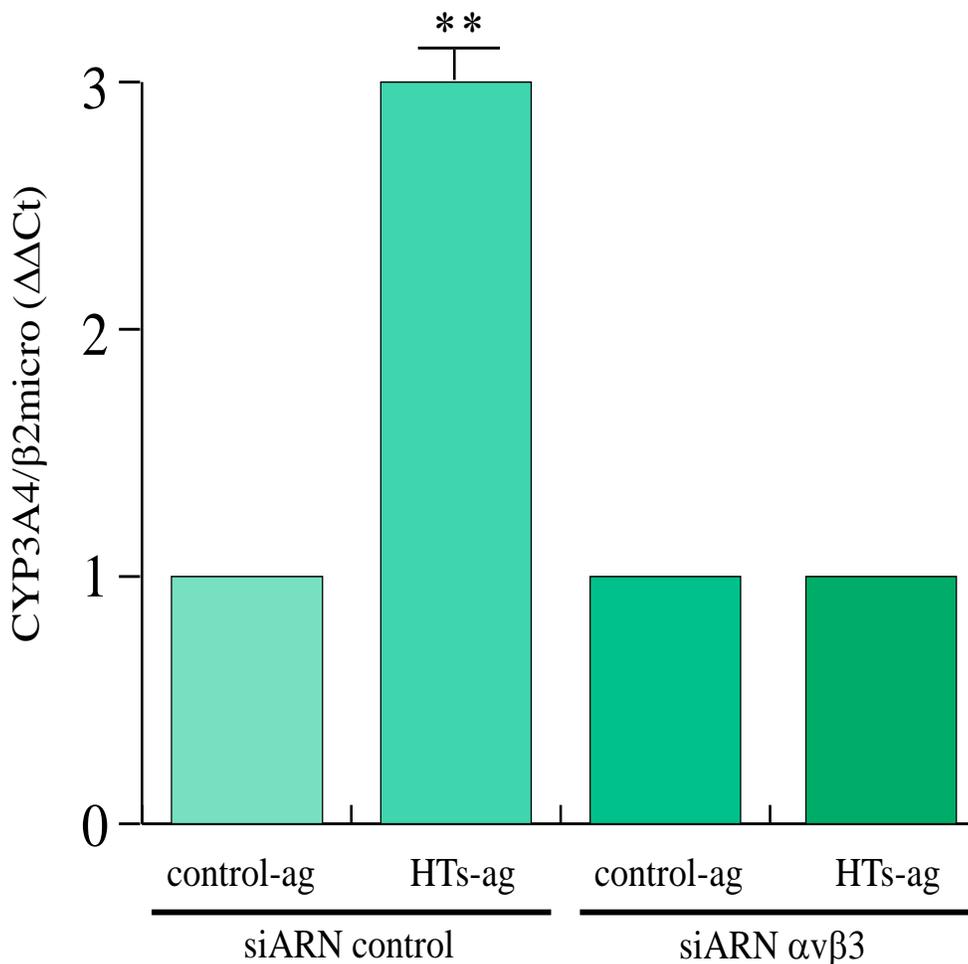


Figura 18: Análisis de la expresión de ARNm de CYP3A4 inducido por la unión de HTs a integrinas en células transfectadas. Las células Jurkat fueron transfectadas con siARN contra la secuencia que codifica para la proteína αv y el siARN contra β3 (siARN αvβ3); en el caso del control, se utiliza siARN contra una secuencia no codificante en humanos. Luego fueron arrestadas por privación de SFB durante 24 horas y posteriormente incubadas 6 horas con HTs-ag. El tratamiento control, corresponde a células que recibieron tratamientos con esferas unidas a agarosa. Se grafican los resultados obtenidos por el análisis de ΔΔCt de n=3 ensayos ± ES, utilizando como gen normalizador la β2-microglobulina. * Difieren significativamente con **p<0,01.

Para determinar si el bloqueo de la expresión de la integrina, además de revertir el efecto de las HTs de inducir aumentos en los niveles de ARNm de CY3A4, revierten su capacidad de aumentar los niveles proteicos de dicha isoenzima, se realizó un ensayo de Western Blot con células de linfoma T transfectadas con siARN contra las secuencias codificantes para αv

y para $\beta 3$. La figura 19 muestra los resultados obtenidos para este ensayo, en la misma se observa que las HTs aumentan los niveles proteicos de CYP3A4 a través de su receptor de membrana, la integrina $\alpha\beta 3$, ya que al estar esta ausente, se revierte el efecto inducido por las HTs.

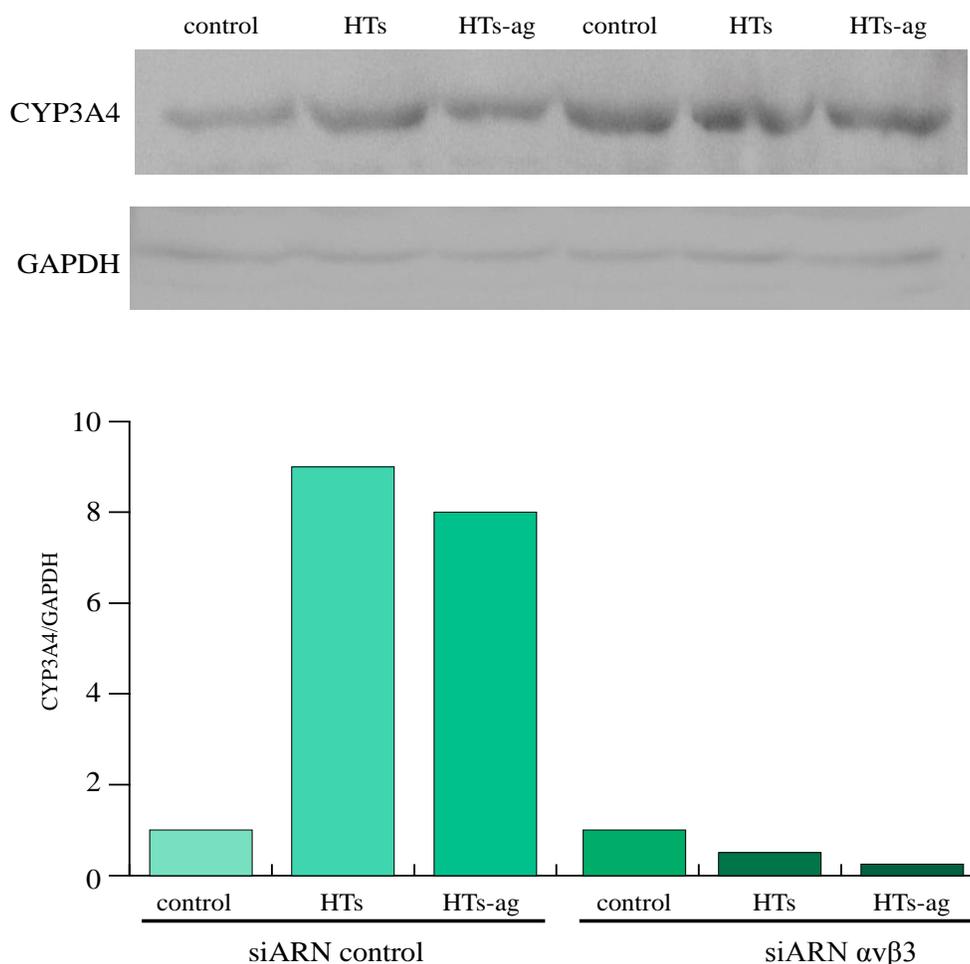


Figura 19: Análisis de la expresión proteica de CYP3A4 inducido por HTs en células transfectadas. Las células Jurkat fueron transfectadas con los siARN contra las secuencias que codifican para las proteínas α y $\beta 3$; en el caso del control, se utiliza siARN contra una secuencia no codificante en humanos. Luego fueron arrestadas por privación de SFB durante 24 horas y posteriormente incubadas 24 horas con HTs libres y HTs-ag. El tratamiento control, corresponde a células que no recibieron tratamiento. A partir de estas células, se obtuvieron las proteínas totales, se cuantificaron mediante el método Bradford y luego se evaluaron los niveles proteicos de la isoenzima CYP3A4 por

Western Blot. La proteína GAPDH fue utilizada como gen normalizador. Se muestra un experimento representativo de n=3 y el análisis densitométrico correspondiente a dicho experimento.

Los resultados hasta aquí obtenidos nos indican que las HTs son capaces de regular los niveles CYP3A4; y que para ello, requieren la presencia de su receptor de membrana plasmática, la integrina $\alpha\beta3$, lo que confirmaría que dicha modulación es efectuada principalmente, por las HTs mediante sus mecanismos no genómicos.

5.3 Análisis de las vías de señalización activadas a través del receptor de membrana para hormonas tiroideas.

En base a los resultados obtenidos anteriormente, en los cuales se demuestra que las HTs pueden ejercer acciones en LCT humanos mediante su receptor de membrana plasmática, resulta importante conocer cuáles son los mecanismos moleculares y los factores de transcripción que participan en dichos efectos.

Trabajos realizados en nuestro laboratorio (Barreiro Arcos *et al*, 2011; Cayrol *et al*, 2015) demuestran en LCT tanto murinos como humanos, que las HTs activan factores de transcripción, como por ejemplo NF- κ B y proteínas de señalización capaces de activar a estos últimos, como ERK1/2. Estas proteínas participan en la regulación de la expresión de genes vinculados a la proliferación y angiogénesis entre otros.

La proteína STAT1, es una molécula activa en células del sistema inmune, que participa en vías de señalización iniciadas, generalmente, por hormonas y citoquinas a través de receptores con actividad intrínsecatirosina-quinasa (Darnell JE Jr, 1997).

Con el objetivo de determinar qué moléculas participan en las vías de señalización iniciadas por HTs, decidimos estudiar la activación de los factores de transcripción STAT1 y NF- κ B en LCT humanos. Para ello, evaluamos los niveles de proteína fosforilada mediante la técnica de Western Blot.

Para evaluar en qué período de tiempo se produce la máxima activación por fosforilación de los factores de transcripción, se realizó una curva de estimulación hormonal a distintos tiempos. En la figura 20 se muestran los resultados obtenidos en el ensayo realizado para evaluar la activación de STAT1. En la misma se observa que a partir de cinco minutos de exposición al estímulo con hormonas libres se induce la fosforilación de STAT1. Esta activación alcanza su máximo entre los quince minutos y una hora

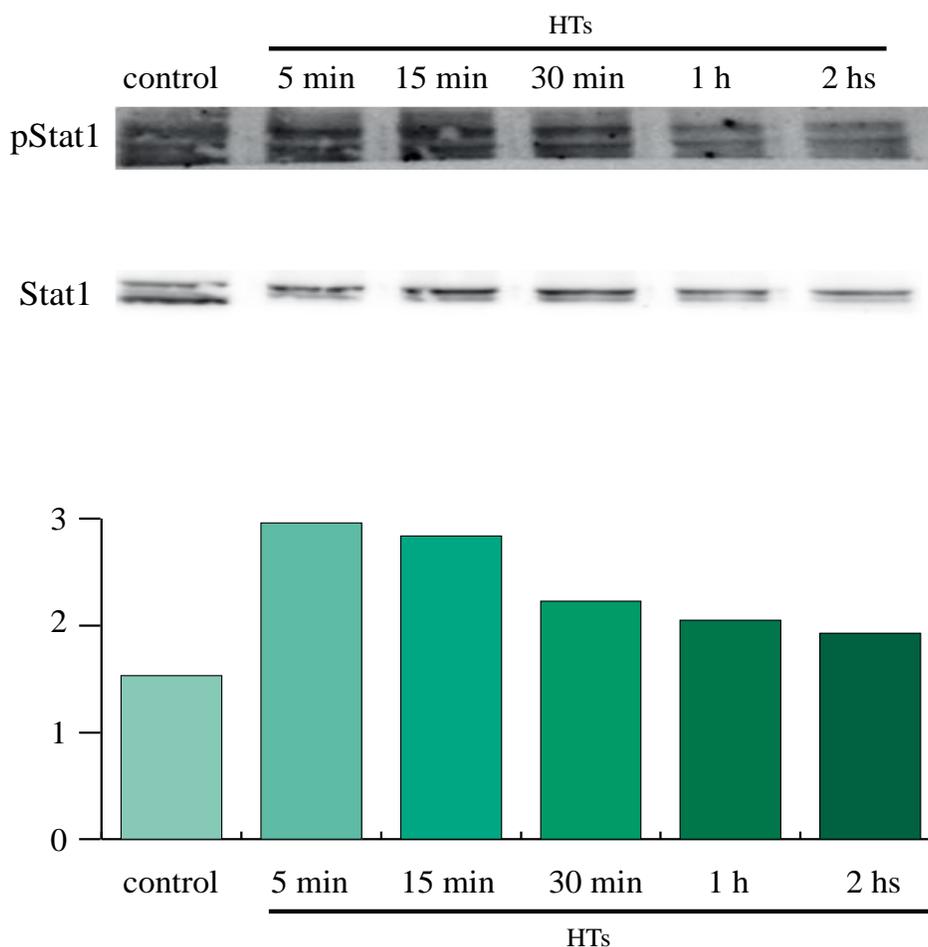


Figura 20: Análisis de la fosforilación de STAT1 inducido por HTs. Las células Jurkat fueron mantenidas durante 24 horas en medio DMEM, privado de SFB, posteriormente fueron estimuladas durante distintos periodos de tiempo con HTs a concentraciones fisiológicas; el tratamiento denominado control, corresponde a células que no recibieron estímulo hormonal. A partir de estas células, se obtuvieron las proteínas totales, se cuantificaron mediante el método

de Bradford y luego se evaluaron los niveles proteicos de la proteína fosforilada y la proteína total STAT1 por Western Blot. Se muestra un experimento representativo de $n=3$ y el análisis densitométrico correspondiente a dicho experimento.

Resultados previos obtenidos por nuestro laboratorio (Barreiros Arcos *et al*, 2011) indican que la activación del factor de transcripción NF- κ B en LCT murinos se produce en un intervalo de tiempo similar a STAT1, específicamente, entre 5 y 30 minutos de exposición al estímulo hormonal. Basándonos en estos resultados, decidimos realizar los ensayos siguientes en este intervalo de tiempo.

Si bien la integrina $\alpha\beta3$ que actúa como receptor de membrana para HTs no pertenece a la familia de receptores tirosina-quinasa, es capaz de activar vías de señalización que llevan a la activación de factores de transcripción (Barreiro Arcos *et al*, 2011; Cayrol *et al*, 2015). Por lo tanto es importante evaluar su participación en la activación de STAT1 y NF- κ B.

Con este objetivo, se realizó una curva de tiempo de estimulaciones hormonales, al igual que en el ensayo anterior, pero en este caso con el sistema HTs-ag. Luego se evaluó la fosforilación tanto de STAT1 como de y NF- κ B.

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 21

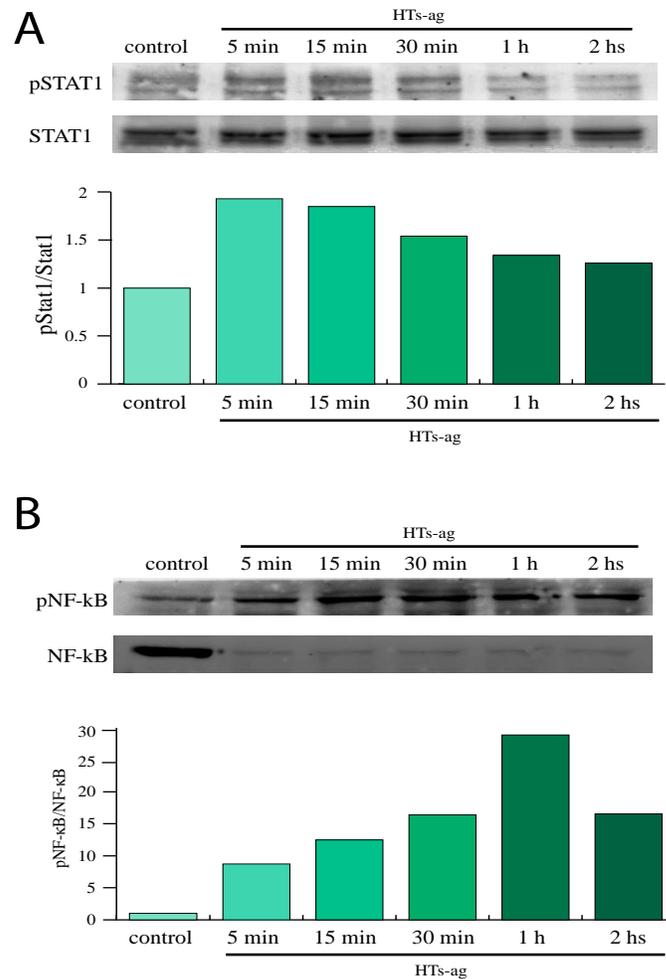


Figura 21: Análisis de la fosforilación de STAT1 y NF-κB inducido por HTs mediante su receptor de membrana plasmática. Las células Jurkat fueron mantenidas durante 24 horas en medio DMEM, privado de SFB, posteriormente fueron estimuladas durante distintos periodos de tiempo con HTs-ag a concentraciones fisiológicas; el tratamiento denominado control, corresponde a células que recibieron estímulos con esferas de agarosa. A partir de estas células, se obtuvieron las proteínas totales, se cuantificaron mediante el método de Bradford y luego se evaluaron los niveles proteicos de la proteína fosforilada y la proteína total por Western Blot. Se muestra un experimento representativo de n=3 y el análisis densitométrico correspondiente a dicho experimento. La parte A de la figura corresponde al estudio de la fosforilación de STAT1; mientras que la B, a los resultados obtenidos para NF-κB.

En la misma se observa que las HTs-ag inducen la activación por fosforilación tanto de STAT1 como de NF-κB, ya que en ambos casos hay aumento en los niveles de proteína

fosforilada respecto al tratamiento control. En la parte A de la figura 21, que muestra el ensayo para STAT1, la fosforilación se produce a partir de los cinco minutos de realizado el estímulo hormonal. En la parte B, se muestra el ensayo para NF- κ B, si bien a partir de 5 minutos de exposición a las HTs hay proteína fosforilada, el máximo se alcanza luego de una hora.

Los resultados obtenidos hasta el momento nos permiten identificar a STAT1 y NF- κ B como factores de transcripción activos que participan en las vías de señalización iniciadas por las HTs en la membrana plasmática. Con el objetivo de identificar las moléculas involucradas en la activación de STAT1 por HTs, decidimos utilizar inhibidores que bloquean la acción de distintas vías de señalización.

Para ello se evaluaron mediante Western Blot los niveles de STAT1 fosforilado y total, en LCT pre-tratadas con inhibidores y estimuladas hormonalmente.

En primer lugar se evaluó la participación de la integrina $\alpha\beta 3$ como receptor localizado en la membrana plasmática capaz de unirse a las HTs e iniciar vías de señalización que activen STAT1; para ello, se utilizó como inhibidor el péptido RGD, que como ya se mencionó, es una molécula capaz de inhibir la unión entre las HTs y su receptor de membrana. En segundo lugar, se evaluó la participación de las esfingomielinasas en vías de señalización que activan STAT1, ya que resultados previos de nuestro laboratorio (Barreiro Arcos *et al*, 2011) demuestran la participación de estas enzimas en cascadas de señalización iniciadas por HTs que activan NF- κ B y ERK1/2 en LCT murinos; para ello se utilizó el inhibidor GW4869, molécula capaz de inhibir la acción de las esfingomielinasas.

Como se observa en la figura 22 el bloqueo del sitio de unión de las HTs a la integrina utilizando el péptido RGD inhibe la fosforilación del factor de transcripción STAT1; por otro lado, la inhibición de las esfingomielinasas utilizando GW4869 también produce una disminución en los niveles de STAT1 fosforilado respecto al tratamiento con HTs.

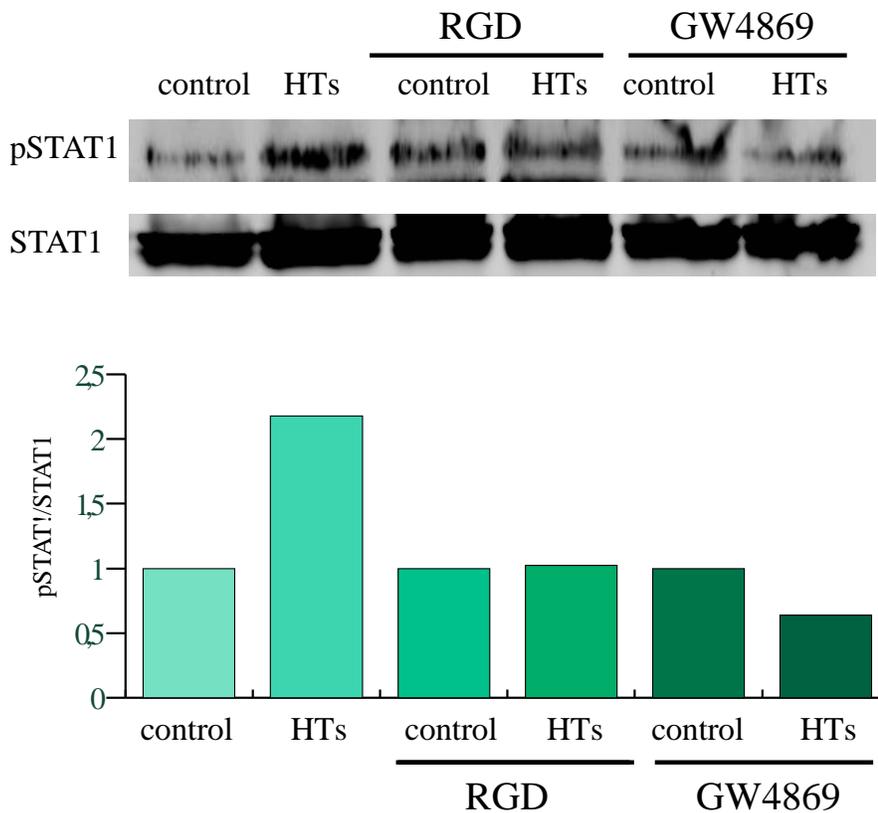


Figura 22: Análisis de la fosforilación de STAT1 inducido por HTs. Las células Jurkat fueron mantenidas durante 24 horas en medio DMEM, privado de SFB, posteriormente fueron pre-tratadas o no, por 30 minutos con RGD y GW4869 y tratadas con HTs libres a concentraciones fisiológicas, durante 15 minutos; el tratamiento denominado control, corresponde a células que no recibieron estímulo hormonal. A partir de estas células, se obtuvieron las proteínas totales, se cuantificaron mediante el método Bradford y luego se evaluaron los niveles de proteína fosforilada y de proteína total STAT1 por Western Blot. Se muestra un experimento representativo de n=3 y el análisis densitométrico correspondiente a dicho experimento.

Los resultados obtenidos, muestran que mediante la presencia de inhibidores de las integrinas y las esfingomielinasas se revierte la activación de STAT1 inducida por las HTs. Estos ensayos fueron realizados con HTs en su conformación libre, por lo tanto, son capaces de actuar a nivel de membrana o ingresar a la célula y ejercer acciones mediante sus mecanismos clásicos que involucran a los TR. Al inhibirse el efecto de las HTs cuando se bloquea la acción de

moléculas que actúan río arriba de los TR, podemos deducir que la activación de estos factores de transcripción se produce principalmente por acciones no genómicas.

De este modo, podemos concluir que las HTs son capaces de actuar en LCT humanos a través de vías de señalización que involucran como receptor a la integrina $\alpha v\beta 3$, a las esfingomielinasas como enzimas participes, y a STAT1 y NF- κ B como factores de transcripción; y que este mecanismo de acción no genómico podría estar involucrado en la regulación de la expresión de CYP3A4.

5.4 Evaluación de la participación de las vías de señalización descriptas en la regulación de la expresión de CYP3A4.

Con el objetivo de determinar si la activación de STAT1 por acción de las HTs es responsable de la regulación del citocromo 3A4, las células fueron pre-tratadas con AG490, que actúa como inhibidor farmacológico de la vía de señalización JAK/STAT, responsable de la activación de STATs. Luego fueron estimuladas con HTs tanto libres como unidas a agarosa, a concentraciones fisiológicas. Finalmente, se evaluaron los niveles de ARNm de CYP3A4.

Como se observa en la figura 23, la inhibición de la vía de señalización JAK/STAT, revierte el aumento inducido por las HTs de los niveles del ARNm de CYP3A4. Resultados similares se observan cuando las células Jurkat son tratadas con HTs-ag.

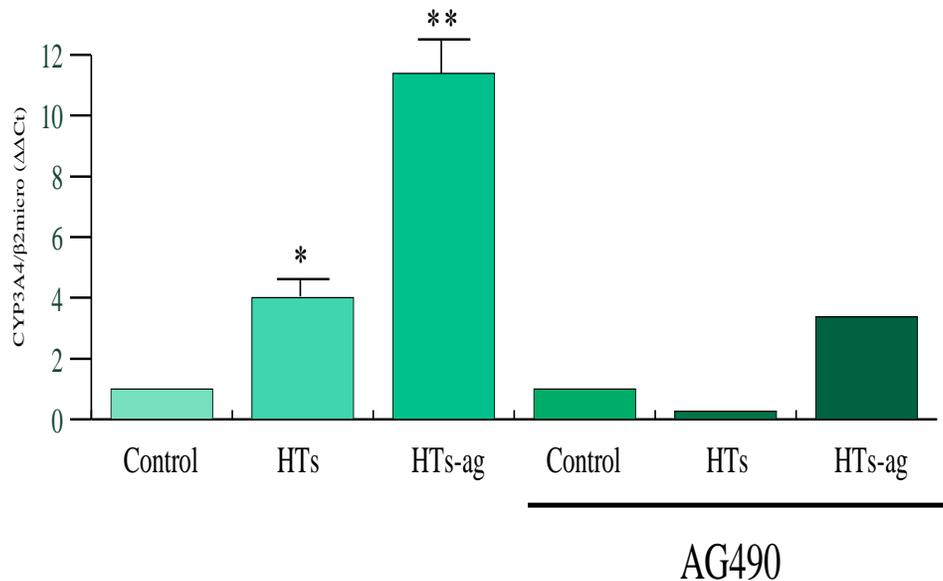


Figura 23: Análisis de la expresión de ARNm de CYP3A4 inducido por HTs. Las células Jurkat fueron arrestadas por privación de SFB durante 24 horas y pre-tratadas o no con AG490 durante 30 minutos. Luego fueron incubadas 6 horas con HTs. El tratamiento control, corresponde a células que no recibieron estímulo hormonal. A partir de estas células se aisló ARN total, se sintetizó ADNc y se cuantificó por qRT-PCR. Se grafican los resultados obtenidos por el análisis de $\Delta\Delta Ct$ de $n=3$ ensayos \pm ES, utilizando como gen normalizador la $\beta 2$ -microglobulina. * Difieren significativamente con $**p<0,01$.

Hemos demostrado que la vía JAK/STAT, que es responsable de la activación de STATs, participa de las acciones iniciadas en membrana plasmática por las HTs y en la regulación del citocromo 3A4. Para corroborar que el factor de transcripción activado por JAK/STAT que participa en la regulación de la expresión de CYP3A4 es STAT1, utilizamos un siARN contra este factor de transcripción, de esta manera se inhibe su síntesis proteica. Luego de ser transfectadas con siARN contra STAT1 y control, las células fueron estimuladas con HTs-ag, y se cuantificaron los niveles del ARNm de CYP3A4. Como se muestra la figura 24, la inhibición de la síntesis proteica de STAT1 impide que las HTs unidas a agarosa induzcan aumentos en los niveles de ARNm de CYP3A4. Por lo tanto, podemos concluir que la proteína

STAT1 es necesaria para las acciones de las HTs, iniciadas en membrana plasmática, que regulan la expresión del CYP3A4.

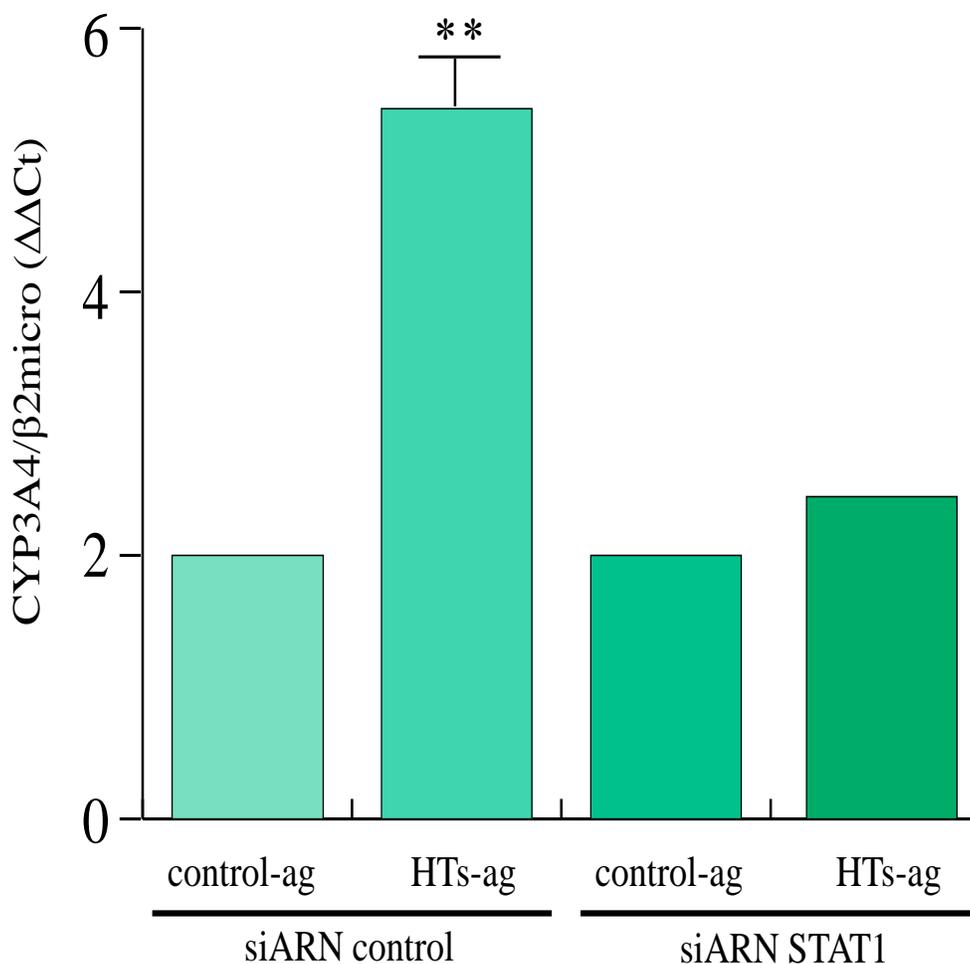


Figura 24: Análisis de la expresión de ARNm de CYP3A4 inducido por HTs células transfectadas. Las células Jurkat fueron transfectadas con siARN contra la secuencia que codifica para la proteína STAT1; en el caso del control, se utiliza siARN contra una secuencia no codificante en humanos. Luego fueron arrestadas por privación de SFB durante 24 horas y posteriormente incubadas 6 horas con HTs-ag- El tratamiento control, corresponde a células que recibieron tratamientos con esferas unidas a agarosa. Se grafican los resultados obtenidos por el análisis de $\Delta\Delta Ct$ de n=3 ensayos \pm ES, utilizando como gen normalizador la $\beta 2$ -microglobulina. * Difieren significativamente con **p<0,01.

Resultados obtenidos previamente, muestran que el factor de transcripción NF-κB es activado por acción de las HTs. Con el objetivo de determinar si este factor de transcripción cuando es activado por las HTs participa en la regulación del CYP3A4, se utilizó el inhibidor farmacológico BAY, que inhibe la activación de NF-κB. Luego del pre-tratamiento con el inhibidor, los LCT humanos fueron estimulados hormonalmente, y se midieron los niveles del ARNm de CYP3A4.

Como se muestra en la figura 25, la presencia del inhibidor de NF-κB es capaz de revertir el aumento en los niveles de CYP3A4 inducido por las HTs. De esta manera podemos concluir que este factor de transcripción, participa en la modulación de los niveles CYP3A4 iniciada por HTs en la membrana plasmática.

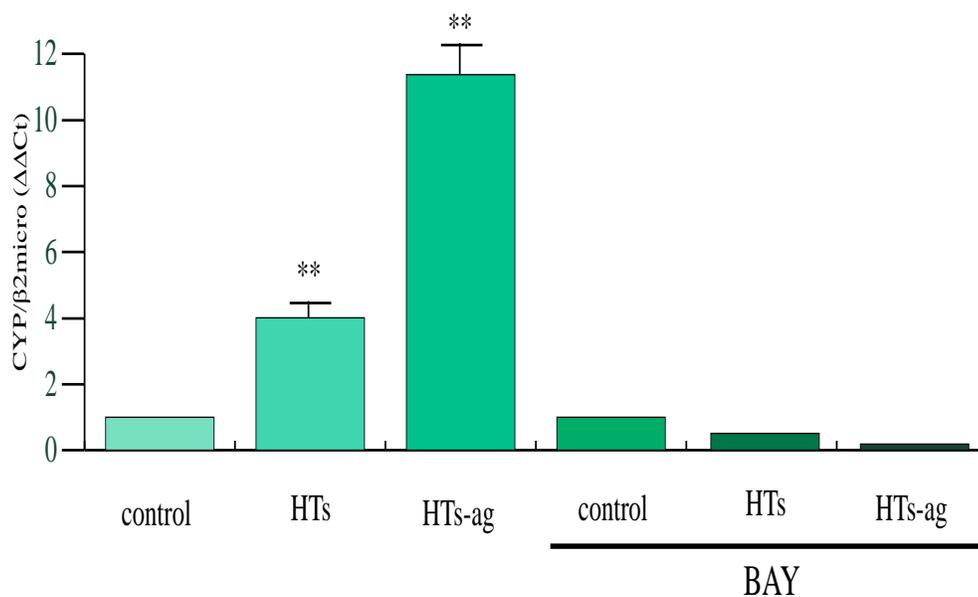


Figura 25: Análisis de la expresión de ARNm de CYP3A4 inducido por HTs. Las células Jurkat fueron arrestadas por privación de SFB durante 24 horas y pre-tratadas o no con BAY durante 30 minutos. Luego fueron incubadas 6 horas con HTs. El tratamiento control, corresponde a células que no recibieron. A partir de estas células se aisló ARN total, se sintetizó ADNc y se cuantificó por qRT-PCR. Se grafican los resultados obtenidos por el análisis de $\Delta\Delta C_t$ de $n=3$ ensayos \pm ES, utilizando como gen normalizador la $\beta 2$ -microglobulina. * Difieren significativamente con $**p<0,01$.

Los resultados hasta aquí obtenidos, nos permiten dilucidar la vía de señalización iniciada por HTs, que involucra la participación de la integrina $\alpha\beta3$ como receptor de membrana plasmática, la activación de esfingomielinasas como enzimas participes de la vía de señalización, la activación de los factores de transcripción STAT1 y NF- κ B, y como efecto final, el aumento de los niveles de ARNm, de proteína y de actividad del citocromo 3A4, responsable del metabolismo de la mayoría de las drogas quimioterapéuticas actuales.

5.5 Estudio de la regulación de CYP3A en tejido hepático y tumoral de ratones eu-hipo- e hipertiroideos.

En las secciones anteriores se describió como la acción de las HTs induce *in vitro* la regulación del citocromo 3A4 en LCT humanos. Esta regulación depende de la activación de vías de señalización que involucran la integrina $\alpha\beta3$, esfingomielinasas y los factores de transcripción STAT1 y NF- κ B.

Trabajos previos de nuestro laboratorio (Sterle *et al*, 2014) demostraron que las HTs son capaces de modular *in vivo* el desarrollo y evolución de linfomas T. En particular, se vió que a partir de los 10 días posteriores a la inoculación de las células EL-4, los tumores generados en ratones hipertiroideos tenían aumentada su velocidad de crecimiento y su tamaño, efecto que se encontró relacionado con la regulación de proteínas del ciclo celular y con la estimulación de la angiogénesis (Sterle *et al*, 2014).

Con el objetivo de evaluar si en los modelos murinos también existe regulación, por parte de las HTs de las enzimas responsables del metabolismo de xenobióticos, decidimos evaluar los niveles de ARNm de dichas enzimas en tejido hepático y tumoral.

En ratones se han descripto a las isoenzimas CYP1A1, CYP1A2, CYP2b10 y CYP3A11 como las responsables del metabolismo de compuestos xenobióticos (Martignoni *et al*, 2006).

El ARNm proveniente de tejido tanto hepático como tumoral se extrajo de ratones con diferentes estados tiroideos a fin de evaluar si los niveles circulantes de HTs pueden influenciar la expresión de CYP. La obtención de animales hipertiroideos se realizó mediante el tratamiento de los ratones con T₄ a una concentración final de 12 mg/litro en el agua de bebida, durante 28 días, mientras que el estado de hipotiroidismo se logró por el tratamiento con un agente anti-tiroideo, PTU, suministrado a una concentración final de 0.5 g/litro en el agua de bebida durante 14 días. El estado tiroideo de los ratones se corroboró mediante análisis en suero de las hormonas T₃, T₄ y TSH. Luego se cuantificó mediante qPCR la cantidad de ARNm de cada isoenzima en particular.

Como se observa en la figura 26, tanto el hipo- como el hipertiroidismo modulan los niveles de ARNm de las isoenzimas analizadas con respecto al estado eutiroideo, tanto en tejido hepático (Figura 26A) como tumoral (Figura 26 B). En el hígado, se observa, una disminución de los niveles de ARNm de las isoformas CYP1A1, CYP1A2 y CYP2b10 tanto para ratones hipotiroides como para hipertiroideos, excepto para la isoforma CYP3A11 que tiene un incremento significativo en el hipertiroidismo y disminuye en el estado hipotiroides con respecto al eutiroideo (figura 26 A). Por otro lado, en el tejido tumoral la modulación por HTs de los niveles de ARNm de las enzimas capaces de metabolizar compuestos xenobióticos no presenta el mismo patrón que en tejido hepático. Como se observa en la figura 26 B, el estado hipertiroideo genera respecto al eutiroideo, una disminución en los niveles de mensajero de las isoenzimas CYP1A1, CYP1A2 y CYP3A11, particularmente la isoenzima CYP2b10 no presenta variaciones. Por su parte, el estado hipotiroides produce aumentos en los niveles de todas las isoenzimas, ya sea respecto al estado eutiroideo en tejido tumoral, como a la modulación ejercida por este estado en tejido hepático.

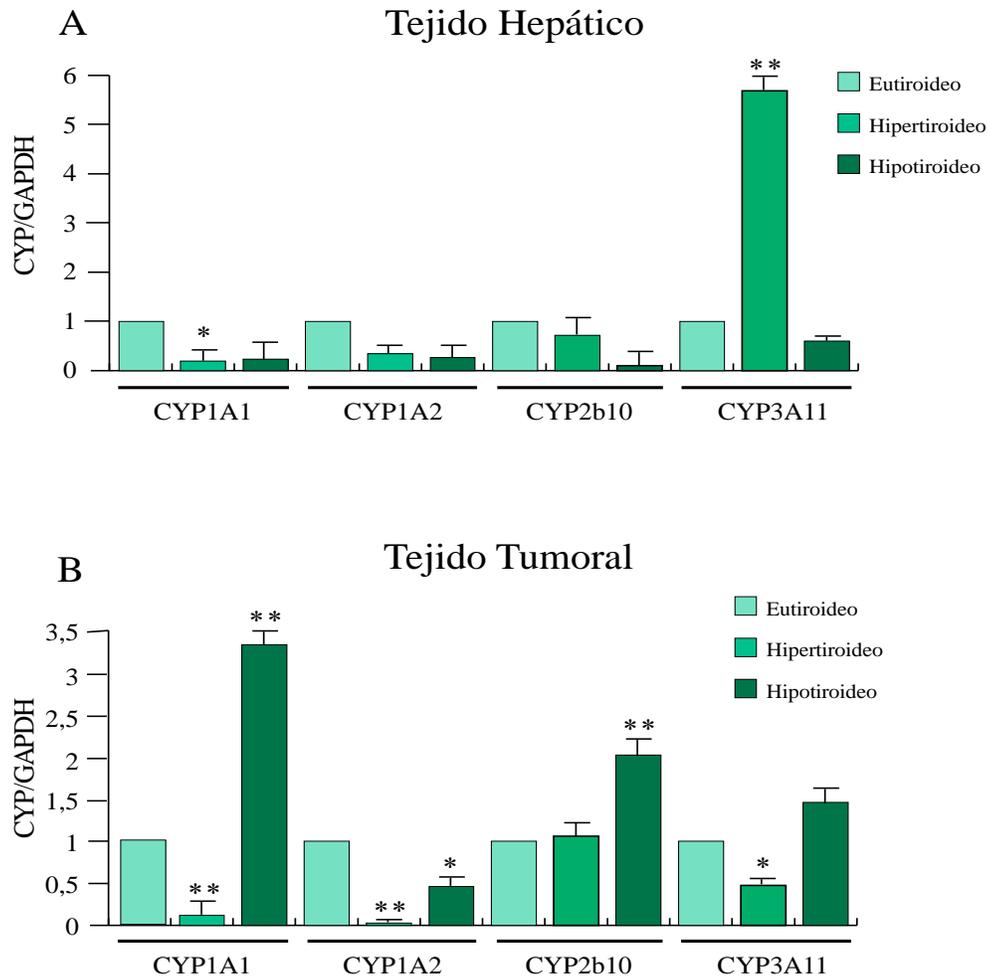


Figura 26: Análisis de la expresión de CYP3A4 en tejido hepático y tumoral de ratones C57 con diferentes estados tiroideos. Se obtuvieron los tumores y tejido hepático de ratones eutiroideos hipertiroideos e hipotiroideos, a los 10 días luego de la inoculación subcutánea de las células EL-4. En estos tejidos se realizó la extracción de su ARN total y a partir de este se sintetizó el ADNc con el que se realizó una qRT-PCR con primers específicos para las isoenzimas murinas. Se grafican los resultados obtenidos mediante el análisis de $\Delta\Delta Ct$ de n=3 ensayos y utilizando como gen normalizador la $\beta 2$ -microglobulina.

Los resultados obtenidos nos muestran la importancia del conocimiento del estado del eje tiroideo. Las HTs son capaces de regular los niveles de ARNm de las isoenzimas metabolizadoras de compuestos xenobióticos, es decir, que en última instancia son capaces de



ACCIÓN DE LAS HORMONAS TIROIDEAS SOBRE LA EXPRESIÓN DE ENZIMAS INVOLUCRADAS EN EL METABOLISMO DE DROGAS QUIMIOTERAPÉUTICAS. Aschero, María del Rosario.

regular el metabolismo de los fármacos quimioterapéuticos actualmente utilizados. Esta modulación ocurre no solo en el hígado, sino también en el tejido tumoral.

6. Discusión de resultados

Las HTs modulan distintos procesos fisiológicos y son críticas para el crecimiento, desarrollo, diferenciación y mantenimiento de la homeostasis metabólica (Oetting y Yen, 2007). Si bien las enfermedades relacionadas a las HTs son generalmente por falta o exceso de las mismas (hipo-e hipertiroidismo), estas también pueden influenciar el desarrollo de otras patologías (Reiche *et al*, 2004; Hammacher *et al*, 2005).

Las células del organismo, incluyendo las que desarrollan fenotipos tumorales, se encuentran expuestas a un microambiente compuesto por una amplia variedad de factores de crecimiento y hormonas producidos tanto por células vecinas, como distales (Singh y Singh, 2009).

Los linfomas de células T no son la excepción, también están influenciados por el entorno celular. Recientemente nuestro grupo de trabajo describió que las HTs se encuentran entre los factores que influyen, *in vitro*, la proliferación de células murinas de linfomas T (Barreiro Arcos *et al*, 2006; 2011 y 2013). Más aún, también se describió que el estado tiroideo afecta el crecimiento tumoral *in vivo* de la línea de linfoma T murino EL-4 creciendo en ratones singéneos (Sterle *et al*, 2014). Adicionalmente, se demostró que las HTs son capaces de inducir a través de sus receptores nucleares y de membrana plasmática, la proliferación, el metabolismo, el ciclo celular y la progresión de LCT humanos (Cayrol *et al*, 2015).

La influencia de las HTs podría no sólo afectar directamente al crecimiento y diseminación tumoral sino además alterar la sensibilidad de los mismos a la quimioterapia, a través de la regulación de los sistemas enzimáticos encargados de la metabolización de dichos fármacos. En este trabajo, se evaluaron las acciones que ejercen las HTs en LCT humanos, estudiando las vías de señalización que son capaces de activar, así como también la regulación de genes blanco implicados en el metabolismo de compuestos xenobióticos.

Por otro lado se realizaron estudios en modelos animales para evaluar la modulación *in vivo* de las enzimas metabolizadoras de xenobióticos por acción de las HTs.

6.1 Estudio de la regulación de la expresión del citocromo P450 inducida por hormonas tiroideas.

El citocromo P450 es una gran y diversa superfamilia de hemoproteínas que utilizan un amplio rango de compuestos exógenos y endógenos como sustratos de sus reacciones enzimáticas y que, por lo general, participan en cadenas de transferencia de electrones con multicomponentes. Sin embargo, sólo las enzimas pertenecientes a las familias CYP1, CYP2 y CYP3 son las responsables del metabolismo de drogas, participando en la activación y desintoxicación de un gran número de compuestos xenobióticos (Wrighton *et al*, 1996). Entre ellas hemos resaltado la importancia de la subfamilia CYP3A, compuesta por las isoenzimas CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7 y CYP3A43, que es la encargada del metabolismo de aproximadamente el 50% de los fármacos actualmente utilizados (Murray *et al*, 2007; Rodríguez-Antona *et al*, 2007). Se han observado diferencias en la expresión de algunas subfamilias de P450 entre individuos, y se ha demostrado que esta variación inter-individual produce diferencias en el metabolismo de los fármacos haciendo que algunos individuos respondan mejor al tratamiento antitumoral dependiendo de la mayor o menor cantidad de enzimas CYP450 y del mecanismo de acción de la droga. La causa de la expresión diferencial de estas enzimas radica en que son enzimas inducibles y, por lo tanto, su expresión y actividad depende de factores como la edad, el género, el estado nutricional, la producción de citoquinas, las condiciones ambientales, entre otros. Además, su secuencia contiene polimorfismos genéticos (Quiñones *et al*, 2008).

Evidencias experimentales muestran que los niveles de expresión de las enzimas del CYP450, particularmente de las familias 1-3 son inducibles por la presencia de distintas moléculas en el medio celular. Específicamente, se demostró que la interleuquina-6 (IL-6) es capaz de modular negativamente los niveles del ARNm de CYP3A4 en células de hepatoma humano BC2 (Jover *et al*, 2002). Adicionalmente, Liddle y col (1998) demostraron en hepatocitos humanos, que actuando de manera directa y a concentraciones fisiológicas, la hormona de crecimiento y los glucocorticoides son capaces de inducir aumentos en los niveles de

actividad de CYP3A4, mientras que la hormona T₃ reduce los niveles de actividad de esta enzima.

En base a lo expuesto, resulta importante conocer si el entorno al cual se encuentran expuestos los LCT, es capaz de modular la expresión y actividad de las enzimas de la subfamilia CYP3A; particularmente enfocamos nuestros estudios en evaluar el papel que ejercen las HTs sobre la regulación de estos genes.

Los resultados obtenidos muestran que las HTs son capaces de inducir variaciones en los niveles de ARNm de las isoenzimas de CYP3A en LCT humanos. Los estímulos hormonales realizados fueron de 6 y 18 horas, y se utilizaron en primera instancia HTs libres. Cuando la estimulación con HTs libres se realiza durante 18 horas, hay una disminución en los niveles de ARNm de CYP3A7 y CYP3A43 en todos los tratamientos, mientras que para las isoformas CYP3A4 y CYP3A5 disminuyen sus niveles de mensajero dependiendo de la concentración hormonal utilizada (Figura 10). En el caso de los tratamientos realizados a 6 horas, se observa en todos los casos un aumento de los niveles ARNm de todas las isoenzimas estimuladas con HTs a concentraciones fisiológicas (Figura 11).

Varios de los efectos de las HTs observados en LCT tanto murinas (Barreiro Arcos *et al*, 2011) como humanas involucraron la activación de un receptor de membrana, que en estas últimas, es la integrina $\alpha\beta3$ (Cayrol *et al*, 2015). Empleando hormonas acopladas a agarosa e impermeables a la membrana celular, encontramos también un aumento de los niveles de ARNm de CYP3A4 a las 6 horas de estímulo (Figura 12 B), mientras que disminuyen cuando la duración del mismo alcanza las 18 horas (Figura 12 A).

Similarmente, estos resultados coinciden con hallazgos previos de nuestro laboratorio (Barreiro Arcos *et al*, 2011) en los que se encontró también un aumento máximo a las 6 horas de los niveles de ARNm de TR α , inducidos en células de linfoma T murinas tanto por HTs libres como por aquellas unidas a agarosa. Del mismo modo, no se encontraron diferencias significativas cuando la duración del estímulo hormonal fue de 3, 12 o 24 horas.

Estos resultados indican que las HTs son capaces de regular los niveles de ARNm de determinados genes blanco, y que el período de tiempo del estímulo hormonal en el cual logran los máximos niveles de inducción es de 6 horas. Además como fueron observados tanto con hormonas libres como con HTs-ag, podrían indicar la participación de mecanismos de acción que involucren tanto a sus receptores tradicionales (TRs) como a receptores de membrana plasmática. En el caso de las hormonas impermeables a la membrana plasmática (HTs-ag), al no poder ingresar al interior celular, se localizan únicamente en el espacio extracelular y allí, solo tienen una vía de acción posible que es a través del receptor de membrana plasmática, mediante el cual activarían vías de señalización que tengan como fin último la regulación de genes blanco (Barreiro Arcos *et al*, 2011; Cayrol *et al*, 2015). Por su parte, las hormonas libres, además de unirse al receptor de membrana, actúan en el interior celular por unión de la T₃ a sus receptores nucleares los que podrían ser los responsables de la transcripción de los genes de CYP. En este último caso, las HTs deben ingresar al citoplasma celular donde son metabolizadas antes de ejercer sus acciones biológicas, por ende una fracción de estas puede ser inactivada en el citoplasma. Esto podría explicar el hecho de que los efectos sobre la expresión del CYP3A4 producidos por las HTs-ag, sean mucho mayores que el de las HTs libres. Pero también podría ser que los efectos sean derivados exclusivamente del receptor de membrana y por ende las hormonas acopladas a agarosa darían efectos mayores que las HTs capaces de internalizarse.

Adicionalmente, se evaluó si el efecto que inducen las HTs en los niveles de ARNm de CYP3A4 en LCT humanos, se traduce a un aumento de los niveles de proteína y de actividad de esta enzima. Los resultados obtenidos para estos ensayos, muestran que las HTs actúan aumentando los niveles de ARNm, de proteína (Figura 13) y de actividad (Figura 14) de CYP3A4. Nuevamente esta inducción podría ser consecuencia no solo de las acciones clásicas de las HTs, sino también de los efectos no genómicos, iniciados en la membrana plasmática celular. Los resultados concuerdan con los obtenidos por Liddle y col (1998), quienes demostraron que en hepatocitos humanos los glucocorticoides y la hormona de crecimiento inducen un aumento en los niveles de ARNm, de proteína y de actividad de CYP3A4, mientras que la T₃ los disminuye.

Estos autores sugieren que el efecto inducido por las distintas hormonas opera a nivel pre-traduccional, debido a la alta concordancia entre los niveles de ARNm, los proteicos y los de actividad.

6.2 Identificación del receptor involucrado en los efectos iniciados en la membrana plasmática por las HTs en células de linfoma T humano.

Los mecanismos moleculares de las numerosas acciones celulares de las HTs han sido ampliamente estudiados. En estos mecanismos, la acción hormonal es capaz de regular distintos genes, produciendo cambios en su transcripción y la síntesis de sus proteínas. Los receptores de HTs (TR) actúan como factores de transcripción, uniendo con mayor afinidad T_3 que T_4 (Bianco *et al*, 2002; Bassett *et al*, 2003).

En el año 2005, se demostró por primera vez en células fibroblásticas CV-1 que ambos tipos de HTs, T_3 y T_4 , eran capaces de unirse a proteínas localizadas en la membrana plasmática y desde allí, inducir efectos denominados no genómicos, ya que no requieren la participación del receptor nuclear (TR) (Bergh *et al*, 2005). Sin embargo a través de estos receptores se activan vías rápidas de señalización que culminan en la activación de factores de transcripción llevando también a la regulación génica.

Las integrinas son proteínas estructurales heterodiméricas que participan principalmente en interacciones célula-célula y célula-matriz extra-celular (Arnaout *et al*, 2005). Estas proteínas de membrana plasmática, actúan como receptores para proteínas específicas del ambiente celular y son capaces de transducir señales desde el exterior hacia el interior celular, que resultan en cambios en la actina (Havaki *et al*, 2007; Saltel *et al*, 2008), en la movilidad celular (Koutsoumpa *et al*, 2013), en la modulación de la endocitosis (Colin *et al*, 2011) y en la transcripción de genes específicos (Reunin, 2011; Umemoto *et al*, 2012; Roth *et al*, 2013).

Muchas integrinas contienen un sitio de reconocimiento para el péptido RGD, que es importante para la unión a proteínas presentes en el ambiente celular (Plow *et al*, 2000).

Hoffman y col, demostraron que bloqueando el sitio RGD presente en la integrina, se revierte la resorción ósea, efecto inducido por la hormona T₄. Este resultado, planteó la posibilidad de que el receptor para HTs en la membrana plasmática se encuentre localizado en una integrina con sitio RGD.

Particularmente, la integrina $\alpha v \beta 3$ que contiene un sitio de unión a RGD, es ampliamente expresada en células normales, en células de vasos sanguíneos (Davis *et al*, 2004; Bergh *et al*, 2005), células no cancerosas inmortalizadas, en células embrionarias de riñón y en distintos tipos de células tumorales, tales como cáncer de próstata y carcinomas renales (Kimbro y Simon, 2006). Se demostró que además de participar en uniones con proteínas de la MEC, la integrina $\alpha v \beta 3$, actúa como receptor para pequeñas moléculas (Davis *et al*, 2013), entre estas se incluye a las HTs (Bergh *et al*, 2005; Davis *et al*, 2011), la di-hidrotestosterona (Lin *et al*, 2009) y el resveratrol (Lin *et al*, 2006).

En base a lo expuesto, decidimos evaluar si la integrina $\alpha v \beta 3$ que actúa como receptor de membrana para las HTs en distintos tipos celulares, lo hace también en células de linfoma T humano.

Los resultados obtenidos nos muestran que las HTs ejercen sus efectos no genómicos, a través de la integrina $\alpha v \beta 3$.

En primer lugar, comprobamos que la integrina que actúa como receptor para las HTs contiene un sitio de unión para ligandos con el motivo RGD en su porción extracelular; debido a que se revierte el aumento de los niveles de CYP3A4 mediado tanto por las HTs libres como por las HTs unidas a agarosa, cuando se realiza un pre-tratamiento con el péptido RGD (Figura 15, Figura 16 y Figura 17). Más aun, la regulación negativa de los niveles transcripcionales de las integrinas αv y $\beta 3$ utilizando ARN de interferencia, inhibió el aumento de los niveles del ARNm (Figura 18) y de proteína (Figura 19) de CYP3A4 inducido por las HTs libres y unidas agarosa en LCT humanos. Estos estudios nos permiten identificar a la integrina $\alpha v \beta 3$ como receptor de membrana para las acciones no genómicas ejercidas por las HTs y señalar a estas vías como las involucradas en la modulación de CYP.

6.3 Análisis de vías de señalización activadas a través del receptor de membrana.

El microambiente celular cumple un rol esencial en la patogénesis y progresión de los linfomas, la interacción con ligandos presentes en la membrana extracelular es responsable de la colonización, comportamiento, agresividad y sobrevida de los LCT (Rosenquist *et al*, 2014; Gaulard y de Leval, 2014). Las HTs, se encuentran presente en el ambiente celular y son capaces de ejercer acciones no genómicas en un corto período de tiempo (Cheng *et al*, 2010). Las HTs inician sus acciones no clásicas a través de la integrina $\alpha\beta3$ en los LCT asi como se describió en otros tipos celulares.

El mecanismo de acción no genómico de las HTs fue reportado por primera vez en glóbulos rojos, y luego se extendió a varios tipos celulares (Farias *et al*, 2006). Estas acciones son generalmente mediadas por vías de señalización que incluyen entre otros, la activación de la proteína quinasa C (PKC), proteína quinasa A (PKA), fosfoinositol 3-quinasa (PI3K), de la proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK) y la activación de la fosfolipasa C (Shih *et al*, 2004; Hiroi *et al*, 2006). Adicionalmente, las HTs a través de la integrina $\alpha\beta3$ pueden alterar el tráfico intracelular y el estado de fosforilación de las serinas de los TRs, del receptor de estrógeno- α (ER α), del transductor de señal y activador de la transcripción 1 (STAT1) y de p53. Estos efectos dependen de la activación de la vía MAPK,ERK1/2 (Davis *et al*, 2011). Adicionalmente, las HTs pueden regular la actividad de varios sistemas de transporte localizados en la membrana plasmática, incluyendo el intercambiador Na⁺/H⁺ (NHE1) (Incerpi *et al*, 1999; D`Arezzo *et al*, 2004;), Na⁺- K⁺- ATPasa (Lei *et al*, 2008; Lei *et al*, 2011) y el sistema transportador de glucosa (Incerpi *et al*, 2014).

Trabajos previos realizados por nuestro laboratorio muestran que las HTs son capaces de estimular la proliferación de LCT murinos. La unión de las HTs a su receptor de membrana, provoca la activación de la vía de señalización PKC ζ que incluye la participación de esfingomielinasas, y la activación de NF- κ B como factor de transcripción, esta ultima proteína

también puede ser activada por ERK1/2 en el caso de que éste sea fosforilado por la isoenzima PKC ζ (Barreiro Arcos *et al*, 2011). Más aun, se demostró que las HTs actuando a concentraciones fisiológicas, son capaces de inducir angiogénesis y proliferación de LCT humanos, maduros e inmaduros. Estos efectos son mediados por la participación de la integrina $\alpha\beta3$ como receptor y de NF- κ B como factor de transcripción (Cayrol *et al*, 2015)

En este trabajo se observó, en primer lugar, que las HTs actuando mediante su receptor de membrana plasmática son capaces de activar los factores de transcripción STAT1 y NF- κ B (Figura 20 y Figura 21). En segundo lugar se demostró, que la integrina $\alpha\beta3$ y las enzimas esfingomielinasas son proteínas participes de esta vía de señalización activada por HTs en LCT humanos. Estos efectos inducidos por las HTs, se revierten cuando se realizan pre-tratamientos con inhibidores específicos, sean estos de la integrina $\alpha\beta3$ (péptido RGD) o de las esfingomielinasas (GW4869) (Figura 22).

Por lo tanto, estos resultados confirman la capacidad de las HTs de activar vías de señalización en LCT humanos. Los efectos son iniciados en la membrana plasmática a través de la integrina $\alpha\beta3$, e incluyen a las esfingomielinasas como enzimas que actúan río arriba de los factores de transcripción STAT1 y NF- κ B.

6.4 Análisis de vías de señalización activadas por HTs que participan en la regulación de CYP3A4.

Trabajos previos realizados en nuestro laboratorio muestran que las HTs son capaces de activar mediante el receptor de membrana plasmática, vías de señalización que tienen como efecto ultimo la regulación de genes relacionados con la proliferación y angiogénesis. Particularmente se demostró en LCT murinos, que las HTs pueden aumentar los niveles de expresión y actividad iNOS, que participan en mecanismos de proliferación celular. Esta inducción de los niveles de iNOS se produce mediante acciones clásicas en las cuales participa el

TR y también mediante las acciones no clásicas que involucran la activación de vías de señalización, el aumento de los niveles de TR α , llevando finalmente a un aumento de iNOS (Barreiro Arcos et al, 2011). Más aun, se identificaron en LCT humanos los genes regulados diferencialmente por acción de las HTs a través de la integrina $\alpha\beta3$ y entre estos, se encontraron genes relacionados con la traducción proteica (RPL13, RPL27A, RPL36), con la cadena respiratoria oxidativa (NUDFB1/2, NDUFA13, UQCR11), con la angiogénesis (VEGFB), con la proliferación/diferenciación de linfocitos y con la replicación del ADN (IL4, EDF1, DOK2).

Teniendo en cuenta estos antecedentes, en los cuales, las HTs actúan a través de mecanismos no genómicos que tienen como consecuencia última la regulación de genes específicos, decidimos evaluar si el aumento de los niveles CYP3A4 inducidos por HTs es consecuencia de la activación de vías de señalización iniciadas por estas hormonas. Mediante el uso de inhibidores farmacológicos para la vía de señalización JAK/STAT (Figura 23), para el factor de transcripción NF- κ B (Figura 25) y a través de la regulación negativa de la transcripción de STAT1 (Figura 24), demostramos que las HTs son capaces de activar, a través de la integrina $\alpha\beta3$, vías de señalización, que involucran la participación de esfingomielinasas llevando a la activación de STAT1 y NF- κ B como factores de transcripción responsables del aumento de los niveles de expresión, de proteína y de actividad de CYP3A4 como efecto último de esta acción.

6.5 Estudio de la regulación de CYP3A en tejido hepático y tumoral de ratones eu-, hipo- e hipertiroideos.

Las enzimas pertenecientes a la subfamilia CYP450 son expresadas principalmente en hígado (Rodríguez-Antona *et al*, 2007). Sin embargo algunas isoformas específicas son expresadas adicionalmente en tejido extrahepático, incluyendo intestino delgado, riñón y pulmón (Kaminsky y Franco, 1992; Schuetz *et al*, 1992; Murray y Burke, 1995).

Varias isoformas de CYP450, particularmente las pertenecientes a subfamilias CYP1, CYP2 y CYP3, tienen un rol importante en el desarrollo de tumores y su respuesta a la terapia, debido a su capacidad de metabolizar compuestos xenobióticos. Por lo tanto, la actividad de dichas isoenzimas es capaz de influenciar el comportamiento de los tumores en respuesta a distintas drogas (Li y Rasmussen, 1995; Bertz, 1997; Williams *et al*, 2002). La presencia de enzimas CYP3A ha sido previamente estudiada en distintos tipos de cáncer, incluyendo tumores de mama, pulmón, colon y de cabeza y cuello. Los resultados obtenidos para estos estudios, muestran la expresión diferencial de los niveles de CYP450 en tejido tumoral respecto al tejido normal (Dhaini *et al*, 2003; Kapucuoglu *et al*, 2003; Bergheim *et al*, 2005; Downie *et al*, 2005; Zhang *et al*, 2006).

Adicionalmente, trabajos previos de nuestro laboratorio muestran que el estado tiroideo es capaz de modular el crecimiento de linfomas T. En particular, el hipertiroidismo induce aumentos en el tamaño de tumores primarios, mientras que el hipotiroidismo lleva a una mayor diseminación metastásica. Estos resultados sugieren la importancia del rol que cumplen las HTs en el ambiente celular, no solo de células normales, sino también de las tumorales.

Por lo tanto, considerando que las enzimas pertenecientes a la subfamilia CYP3A son expresadas en forma diferencial en tejido tumoral respecto al normal y que las HTs son capaces de modular *in vivo* el desarrollo y evolución de linfomas T, decidimos evaluar los niveles de expresión de dichas isoenzimas en tejidos hepático y en tumores de células T de ratones que presentan distintos estados tiroideos. Para ello, se analizaron los niveles de expresión de enzimas murinas capaces de metabolizar compuestos xenobióticos, particularmente CYP1A1, CYP1A2, CYP2b10 y CYP3A11 (Pan *et al*, 2000) dado que son las responsables del metabolismo de compuestos xenobióticos (Martignoni *et al*, 2006).

En este trabajo, se demostró que el estado tiroideo es capaz de modular los niveles de expresión, tanto en tejido hepático como tumoral. Todas las isoenzimas estudiadas, en ambos tejidos, muestran expresión diferencial dependiente del estado tiroideo. Más aun, podemos concluir que en tejido hepático los estados tiroideos patológicos producen disminución en los

niveles de expresión de estas enzimas; mientras que en tejido tumoral, el estado hipotiroideo genera aumentos en los niveles de expresión todas las isoformas, respecto al estado eutiroideo y al tejido hepático. Aunque el aumento de los niveles del ARNm de los genes CYPs no necesariamente se traduce a un aumento en los niveles de actividad de dichas enzimas, generalmente, se encuentra buena concordancia entre los mismos (Meredith *et al*, 2003; Martignoni *et al*, 2006). De ser así la regulación observada en los niveles de CYP por las variaciones en los niveles circulantes de hormonas tiroideas puntualizarían la importancia de evaluar dichos niveles en pacientes con LCT y estudiar si los mismos pueden redundar en la eficacia o el éxito de la terapia.

7. Conclusiones

En este trabajo se estudió la modulación inducida por las HTs en la expresión de enzimas capaces de metabolizar compuestos xenobióticos, tanto *in vitro* como *in vivo*. Los principales hallazgos de estos estudios indican que:

7.1 Las HTs regulan los niveles la isoenzima CYP3A4 en células de linfoma T humano

- En LCT humanos, el estímulo hormonal con concentraciones fisiológicas de T₃ y T₄ por 6 horas, produce aumentos en los niveles de ARNm de la isoenzima CYP3A4.
- El tratamiento con concentraciones fisiológicas de HTs durante 24 horas produce aumento de los niveles proteicos de CYP3A4.
- La exposición a HTs durante 48 horas, produce aumento en los niveles de actividad enzimática de CYP3A4, similares a los inducidos por la dexametasona.
- El estímulo realizado con el sistema HTs-ag produce un efecto mayor que el del tratamiento con HTs libres sobre la regulación de CYP3A4 a nivel ARNm, proteína y actividad; lo que sugiere que la modulación de la isoenzima mediada por HTs, se produce principalmente a través de sus efectos no genómicos iniciados en membrana plasmática.

7.2 La integrina $\alpha v \beta 3$ es el receptor de membrana para la acciones de las HTs sobre la expresión de CYP en células de linfoma T humano

- El aumento de los niveles de ARNm y de proteína de CYP3A4, producido por las HTs, se revierte cuando las células de linfoma T son pre-incubadas con el péptido RGD, lo que sugiere la participación de una integrina con sitio de unión para ligandos con motivo RGD.

- El aumento de los niveles de CYP3A4 inducido por las HTs es inhibido cuando se utilizaron técnicas de ARN de silenciamiento selectivo para la integrina $\alpha\beta3$. Esto identifica y confirma a dicha integrina como el receptor de membrana plasmática para estos efectos en LCT humanos.

7.3 Las HTs activan, a través de su receptor de membrana plasmática, vías de señalización vinculadas a la regulación de los niveles de CYP3A4.

- Las vías de señalización activadas por las HTs involucran la participación del factor de transcripción STAT1, ya que el mismo es fosforilado cuando los LCT humanos son estimulados con HTs a concentraciones fisiológicas.

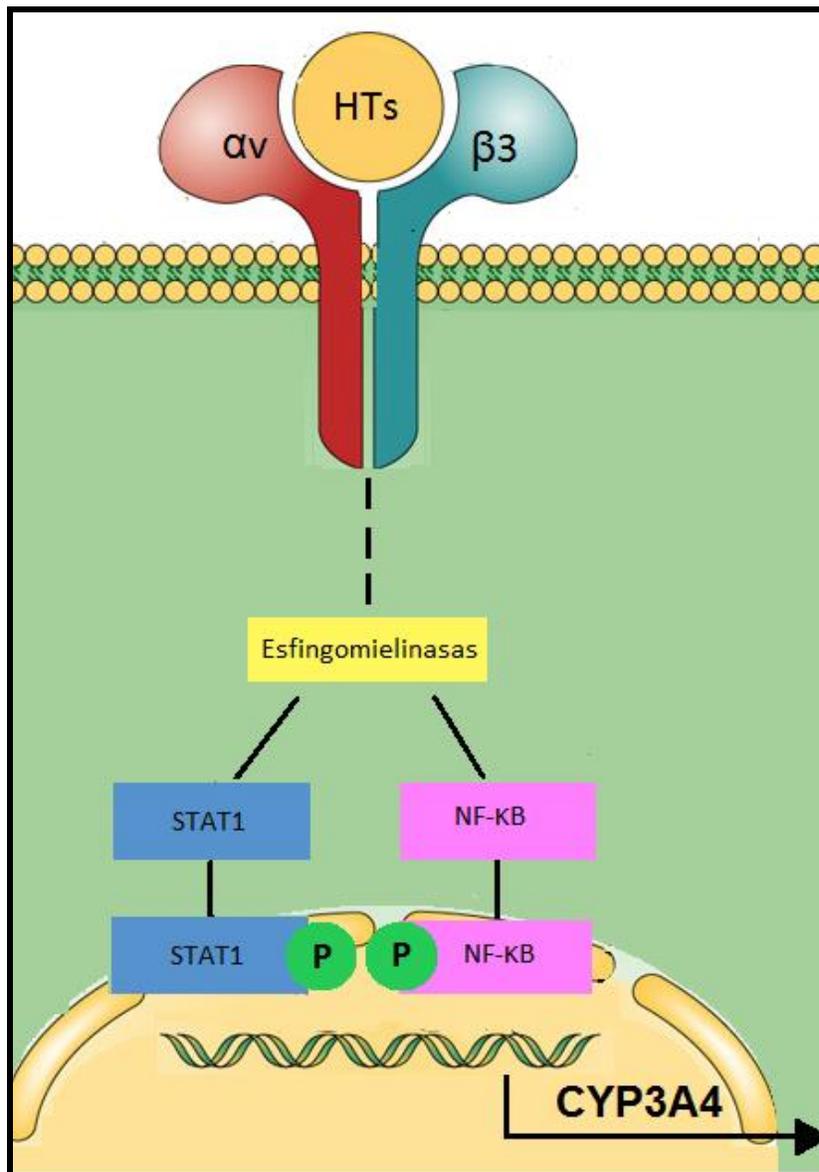
- El factor de transcripción NF- κ B también está involucrado en las acciones no genómicas de las HTs iniciadas a través de su receptor de membrana, ya que el mismo se fosforila cuando se realizan estímulos hormonales a tiempos cortos.

- El inhibidor farmacológico de las esfingomielinasas es capaz de impedir la activación de los factores de transcripción antes mencionados indicando que la misma se activa río arriba de los mismos.

- La integrina $\alpha\beta3$ es el receptor de membrana para esta cascada de señalización ya que al realizar la inhibición farmacológica o genómica de dicha integrina se impide la activación hormonal de los factores de transcripción STAT1 y NF- κ B.

- La inhibición de la vía JAK/STAT y posteriormente el silenciamiento de la expresión de STAT1 revierten el aumento de los niveles de ARNm de CYP3A4 producido por las HTs. Adicionalmente la presencia del inhibidor farmacológico del factor de transcripción NF- κ B produce el mismo efecto. Estos resultados permiten identificar a dichos factores de transcripción como los responsables de la modulación de los niveles de CYP3A4, producida por las acciones no genómicas de las HTs.

- Por ende, la vía de señalización activada por HTs que involucra a la integrina $\alpha\beta3$ como receptor de membrana, involucra la participación de las esfingomielinasas y de los factores de transcripción STAT1 y NF- κ B como mecanismo no genómico por el cual las HTs regulan los niveles de CYP3A4.



7.4 El estado tiroideo modula los niveles de expresión de enzimas metabolizadoras de drogas en tejido hepático y tumoral murino.

- El estado tiroideo patológico, sea este hipo- o hiper- tiroideo, produce variaciones en los niveles de ARNm de enzimas metabolizadoras de drogas.
- Existen diferencias en los patrones de expresión de las isoenzimas, dependiendo el tejido en el cual sean evaluadas, particularmente en tejido hepático normal y tumores de linfomas T murinos.

En resumen, los resultados obtenidos *in vitro* muestran que la presencia de las HTs produce aumentos en los niveles de ARNm, proteína y actividad de CYP3A4 en LCT humanos; esta inducción es consecuencia de los efectos iniciados por las HTs a través de su receptor de membrana plasmática, la integrina $\alpha v \beta 3$, e involucra la participación de STAT1 y NF- κ B como factores de transcripción.

En el modelo *in vivo*, a diferencia de los resultados anteriores, se observa que es el estado hipotiroideo (déficit de HTs) es el que induce aumentos de los niveles de enzimas metabolizadoras de xenobióticos en tejido tumoral. Estas diferencias pueden deberse principalmente, a los diversos mecanismos de regulación de genes CYP relacionados con la especie, dependiendo si esta es murina o humana (Vignatti *et al*, 2004), o bien a que la situación *in vivo* involucra a otros protagonistas, incluyendo otras hormonas que se regulan con el déficit o aumento de HTs circulantes (Mintziori *et al*, 2012)

Finalmente, podemos concluir que nuestros resultados sugieren la importancia de conocer y evaluar el estado tiroideo de los pacientes con linfoma de células T al momento de iniciar tratamientos quimioterapéuticos, ya que podría contribuir al mejoramiento de la predicción de la respuesta a la terapia.

8. Bibliografía

- Alcorn J y McNamara PJ. Ontogeny of hepatic and renal systemic clearance pathways in infants. *Clinical Pharmacokinet.* 2002, vol 41, p. 959-998.
- Alcorn J y McNamara PJ. Pharmacokinetics in the newborn. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 2003, vol 55, p. 667-686.
- Aranda Ay Pascual A. Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiological Review.* 2001, vol 81, p. 1269-1304.
- Arnaout MA, *et al.* Integrin structure, allostery, and bidirectional signaling. *Annual Review of Cell and Developmental Biology.* 2005, vol 21, p. 381-410.
- Barreiro Arcos ML, *et al.* Cooperative nongenomic and genomic actions on thyroid hormone mediated modulation of T Cell proliferation involve up-regulation of thyroid hormone receptor and inducible nitric oxide synthase expression. *Journal of Cellular Physiology.* 2011, vol 226, p. 3208-3218.
- Barreiro Arcos ML, *et al.* Induction of apoptosis in T lymphoma cells by long-term treatment with thyroxine involves PKC ζ nitration by nitric oxide synthase. *Apoptosis.* 2013, vol 18, p. 1376-1390.
- Barreiro Arcos ML, *et al.* Thyroid hormones increase inducible nitric oxide synthase gene expression downstream from PKC-zeta in murine tumor T lymphocytes. *American Journal of Physiology- Cell Physiology.* 2006, vol 291, p. 327-336.
- Bassett J, *et al.* Mechanisms of thyroid hormone receptor-specific nuclear and extra nuclear actions. *Molecular Cellular Endocrinology.* 2003, vol 213, p. 1-11.
- Bergh JJ, *et al.* Integrin $\alpha v \beta 3$ contains a cell surface receptor site for thyroid hormone that is linked to activation of mitogenactivated protein Kinase and induction of angiogenesis. *Endocrinology,* 2005, vol 146, p. 2864-2871.

- Bergheim I, *et al.* Decreased expression of cytochrome P450 protein in non-malignant colonic tissue of patients with colonic adenoma. *BMC Gastroenterology*. 2005, p. 5:34.
- Bertz RJ y Granneman GR. Use of in vitro and in vivo data to estimate the likelihood of metabolic pharmacokinetic interactions. *Clinical Pharmacokinetics*. 1997, vol 32, p. 210-258.
- Bianco AC, *et al.* Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases. *Endocrine Reviews*. 2002, vol 23, p. 38–89.
- Bianco AC. Cracking the Metabolic Code for Thyroid Hormone Signaling. *Endocrinology*. 2011, vol 152, p. 3306–3311.
- Biéche I, *et al.* Reverse transcriptase-PCR quantification of mRNA levels from cytochrome (CYP) 1, CYP2 and CYP3 families in 22 different human tissues. *Pharmacogenetics and Genomics*. 2007, vol 17, p.731-742.
- Bradford PT, *et al.* Cutaneous lymphoma incidence patterns in the United States: a population-based study of 3884 cases. *Blood*, 2009, vol 113, p. 5064-5073.
- Brent GA. Mechanisms of thyroid hormone action. *The Journal of Clinical Investigation*. 2012, vol 122, p. 3035–3043.
- Bruno B, *et al.* A comparison of allografting with autografting for newly diagnosed myeloma. *The New England Journal of Medicine*. 2007, vol 356, p.1110-1120.
- Bruno RD y Njar VCO. Targeting Cytochrome P450 Enzymes: A New Approach in Anti-cancer Drug Development. *Bioorganic and Medical Chemistry*. 2007, vol 15, p. 5047-5060.
- Burk, O, *et al.* Molecular mechanisms of polymorphic CYP3A7 expression in adult human liver and intestine. *The Journal of Biological Chemistry*. 2002, vol 277, p. 24280–24288.
- Campos E, *et al.* The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. *Blood*. 2011, vol 117, p. 5019-5032.

- Cayrol F *et al.* Integrin α V β 3 acting as membrane receptor for thyroid hormones mediates angiogenesis in malignant T cells. *Blood*. 2015, vol 125, p. 841-851.
- Cheng SY1, *et al.* Molecular aspects of thyroid hormone actions. *Endocrine Reviews*. 2010, vol 31, p. 139-170.
- Chighizola C, *et al.* Cyclophosphamide as Disease-modifying Therapy for Scleroderma. *International Journal of Clinical Rheumatology*. 2011, vol 6, p. 219-230.
- Colin D, *et al.* Endocytosis of resveratrol via lipid rafts and activation of downstream signaling pathways in cancer cells. *Cancer Prevention Research*. 2011, vol 4, p. 1095–1106.
- Cordeiro A, *et al.* Non-classic thyroid hormone signaling involved in hepatic lipid metabolism. *Journal of Endocrinology*, 2013, vol 216, p. R47-R57.
- Cuccaro A, *et al.* Prognostic factors in Hodgkin lymphoma. *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases*. 2014, vol 6, e2014053.
- D'Arezzo, *et al.* Rapid nongenomic effects of 3,5,3'-triiodo-L-thyronine on the intracellular pH of L-6 myoblasts are mediated by intracellular calcium mobilization and kinase pathways. *Endocrinology*. 2004, vol 145, p. 5694-5703.
- Daly AK. Significance of the minor cytochrome P450 3A isoforms. *Clinical Pharmacokinetics*. 2006, vol 45, p. 13–31.
- Darnell JE Jr. STATs and gene regulation. *Science*. 1997, vol 277, p. 1630-1635.
- Davies T, *et al.* The TSH receptor reveals itself. *Journal of Clinical Investigation*. 2002, vol 110, p. 161–164.
- Davis FB, *et al.* Acting via a cell surface receptor, thyroid hormone is a growth factor for glioma cells. *Cancer Research*. 2006, vol 66, p. 7270-7275
- Davis FB, *et al.* Proangiogenic action of thyroid hormone is fibroblast growth factor-dependent and is initiated at the cell surface. *Circulation Research*. 2004, vol 94, p. 1500-1506.

- Davis M, *et al.* Prednisone or Prednisolone for the treatment of chronic active hepatitis? A comparison of plasma availability. *British Journal of Clinical Pharmacology*. 1978, vol 5, p. 501-505.
- Davis PJ, *et al.* Membrane receptor for thyroid hormone: physiologic and pharmacologic implications. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 2011, vol 51, p. 99-115.
- Davis PJ, Thyroid Hormone and P-Glycoprotein in Tumor Cells. *BioMed Research International*. 2014, vol 2015.
- de Leval L y Gaulard P. Tricky and terrible T-cell tumors: these are thrilling times for testing: molecular pathology of peripheral T-cell lymphomas. *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology*. 2011, p. 336-343
- de Wildt SN, *et al.* Cytochrome P450 3A: Ontogeny and drug disposition. *Clinical Pharmacokinetics*. 1999, vol 37, p.485-505.
- de Lloyd A, *et al.* TSH receptor activation and body composition. *Journal of Endocrinology*. 2010, vol 204, p-13-20.
- Dearden CE, *et al.* Guidelines for the management of mature T-cell and NK-cell neoplasms (excluding cutaneous T-cell lymphoma). *British Journal of Haematology*. 2011, vol 153, p. 451-85.
- Dees EC y Watkins PB. Role of cytochrome P450 phenotyping in cancer treatment. *Journal of Clinical Oncology*. 2005, vol 23, p. 1053-1055.
- Dennison JB, *et al.* Effect of CYP3A5 expression on Vincristine metabolism with human liver microsomes. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2007, vol 321, p. 553-563.
- Dentice M1 y Salvatore D. Deiodinases: the balance of thyroid hormone: local impact of thyroid hormone inactivation. *Journal of Endocrinology*. 2011, vol 209, p. 273-282.
- Dhaini HR, *et al.* Cytochrome P450 CYP3A4/5 expression as a biomarker of outcome in osteosarcoma. *Journal of Clinical Oncology*. 2003, vol 21, p. 2481-2485.

- Dhaini HR, *et al.* Cytochrome P450 CYP3A4/5 expression as a biomarker of outcome in osteosarcoma. *Journal of Clinical Oncology*. 2003, vol 21, p. 2481-2485.
- Dietrich, JW, *et al.* TSH and thyrotropic agonists: Key actors in thyroid homeostasis. *Journal of Thyroid Research*. 2012., vol 2012, p. 1-29.
- Ding, X y Kaminsky LS. Human extrahepatic cytochromes P450: function in xenobiotic metabolism and tissue-selective chemical toxicity in the respiratory and gastrointestinal tracts. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 2003, vol 43, p, 149–173.
- Downie D, *et al.* Profiling cytochrome P450 expression in ovarian cancer: identification of prognostic markers. *Clinical Cancer Research*. 2005, vol 11, p. 7369-7375.
- Dumont J, *et al.* The Phylogeny, Ontogeny, Anatomy and Regulation of the Iodine Metabolizing Thyroid. *Thyroid Disease Manager*. 2008.
- Dumontet C y Sikic BI. Mechanisms of action of and resistance to antitubulin agents: microtubule dynamics, drug transport, and cell death. *Journal of Clinical Oncology*. 1999, vol 17, p. 1061-1070.
- Ekins RP. Basic principles and theory. *British Medical Bulletin*. 1974, vol 30, p. 3-11.
- Evans WE y Relling MV. Moving towards individualized medicine with pharmacogenomics. *Nature*. 2004, vol 429, p. 464-468.
- Fabris N. Immunodepression in thyroid-deprived animals. *Clinical and Experimental Immunology*. 1973, vol 15, p. 601-611.
- Farias RN, *et al.* Non genomic actions of thyroid hormones: A focus on membrane transport systems. *Current Medicinal Chemistry - Immunology Endocrine & Metabolic Agents*. 2006, vol 6, p. 241–254.
- Foss FM, *et al.* Peripheral T-cell lymphoma. *Blood*. 2011, vol. 117, p. 6756-6767.
- Freindorf M1 *et al.* Combined QM/MM study of thyroid and steroid hormone analogue interactions with $\alpha\beta 3$ integrin. *Journal of Biomedicine Biotechnology*. 2012, vol 2012, p. 1-12.

- Gaulard P, de Leval L. The microenvironment in T-cell lymphomas: emerging themes. *Seminars in Cancer Biology*. 2014, vol 24, p. 49-60.
- GCI. Gray Cancer Institute, *Research Report 2002*. 2002.
- Geffner DL, *et al*. Propylthiouracil blocks extrathyroidal conversion of thyroxine to triiodothyronine and augments thyrotropin secretion in man. *The Journal of Clinical Investigation*. 1975, vol 55, p. 224-229.
- Gereben B, *et al*. Cellular and molecular basis of deiodinase-regulated thyroid hormone signaling. *Endocrine Journal*. 2008, vol 29, p. 898–938.
- Gogakos A, *et al*. Thyroid and bone. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2010, vol 503, p. 129-136.
- Gore A y Roberts L. Neuroendocrine Systems, en Bloom F., McConnel S., Roberts J., Spitzer N., Zigmond M (Eds). *Fundamental neuroscience*, 2da Edición. Capítulo 40 Academic Press (An imprint of Elsevier Science), 2003, p. 1031-1037.
- Hakkola J, *et al*. Cytochrome P450 3A expression in the human fetal liver: evidence that CYP3A5 is expressed in only limited number fetal livers. *Biology of the Neonate*. 2001, vol 80, p. 193-201.
- Hammacher A, *et al*. Interleukin-6 is a potent inducer of S100P, which is up-regulated in androgen-refractory and metastatic prostate cancer. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2005, vol 37, p. 442-450.
- Havaki S, *et al*. Altered expression pattern of integrin alphavbeta3 correlates with actin cytoskeleton in primary cultures of human breast cancer. *Cancer Cell International*. 2007, vol 7, p. 16.
- Heuer H y Visser TJ. Minireview: pathophysiological importance of thyroid hormone transporters. *Endocrinology*. 2009, vol 150, p. 1078–1083.
- Hines RN. Ontogeny of human hepatic cytochromes P450. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*. 2007, vol 2, p. 169- 175.

- Hiroi Y, *et al.* Rapid nongenomic actions of thyroid hormone. *Proceedings of the National Academy of Sciences-USA*. 2006, vol 103, p. 14104–14109.
- Hoffman SJ, *et al.* Rapid inhibition of thyroxine-induced bone resorption in the rat by an orally active vitronectin receptor antagonist. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2002, vol 302, p. 205–221.
- Hörmann R y Schumm-Draeger PM. Organ manifestations of hyperthyroidism. *Internist (Berl)*. 2010, vol 51, p. 596-602.
- Horn JR, *et al.* Get to Know an Enzyme: CYP3A4. *Pharmacy Times*. 2008, p. 40-43.
- Hulbert AJ. Thyroid hormones and their effects: a new perspective. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society*. 2000 vol 75, p. 519-563.
- Hustert E, *et al.* The genetic determinants of the CYP3A5 polymorphism. *Pharmacogenetics*. 2001, vol 11, p. 773–779.
- Incerpi S *et al.* Thyroid Hormone inhibition in L6 myoblasts of IGF-I-mediated glucose uptake and proliferation: new roles for integrin $\alpha\beta 3$. *American Journal of Physiology*. 2014, vol 307, p. C150-C161.
- Incerpi S, *et al.* Short-term effects of thyroid hormones on the Na/H antiport in L-6 myoblasts: high molecular specificity for 3, 3-, 5-triiodo-l-thyronine. *Endocrinology*. 1999, vol 140, p. 683– 689.
- Jaffe ES. The 2008 WHO classification of lymphomas: implications for clinical practice and translational research. *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology*. 2009, p. 523-531.
- Jover R, *et al.* Down-regulation of human CYP3A4 by the inflammatory signal interleukin 6: molecular mechanism and transcription factors involved. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2002, vol 16, p. 1799-801.
- Kaminsky LS y Fasco MJ. Small intestinal cytochromes P450. *Critical Reviews in Toxicology*. 1992, vol 21, p. 407-422.

- Kapucuoglu N, *et al.* Expression of CYP3A4 in human breast tumour and non-tumour tissues. *Cancer Letters*. 2003, vol 202, p. 17-23.
- Kapucuoglu N, *et al.* Expression of CYP3A4 in human breast tumour and non-tumour tissues. *Cancer Letters Journal*. 2003, vol 202, p. 17-23.
- Karmisholt J, *et al.* Variation in thyroid function in subclinical hypothyroidism: importance of clinical follow-up and therapy. *European Journal of Endocrinology*. 2011, vol 164, p. 317-323.
- Kashiwai T, *et al.* Practical treatment with minimum maintenance dose of anti-thyroid drugs for prediction of remission in Graves' disease. *Endocrine Journal*. 2003, vol 50, p. 45-49.
- Kimbro KS y Simons JW. Hypoxia-inducible factor-1 in human breast and prostate cancer. *Endocrine-Related Cancer*. 2006, vol 3, p. 739-749.
- Kimbro KS, Simons JW. Hypoxia-inducible factor-1 in human breast and prostate cancer. *Endocrine-Related Cancer*. 2006, vol 13, p. 739-749.
- Kindt TJ, Goldsby RA, Osborne BA, Kuby J. Inmunología. 6ta Ed. WH Freeman, 2007, p. 574.
- Kopp P. Thyroid hormone synthesis; in Braverman LE, Cooper D: Werner and Ingbar's the Thyroid. A fundamental and Clinical Text, 20ava Edición. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2013, p 48-74.
- Koulouri, *et al.* Pitfalls in the measurement and interpretation of thyroid function tests. *Best Practice & Research: Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2013, vol 27, p. 745–762.
- Koutsoumpa M, *et al.* Interplay between alphavbeta3 integrin and nucleolin regulates human endothelial and glioma cell migration. *The Journal of Biological Chemistry*. 2013, vol 288, p. 343–354.

- Kuehl P, *et al.* Sequence diversity in CYP3A promoters and characterization of the genetic basis of polymorphic CYP3A5 expression. *Nature Genetics*. 2001, vol 27, p. 383–391.
- Küppers R, *et al.* Hodgkin lymphoma. *The Journal of Clinical Investigation*. 2012, vol 122, p. 3439-3447.
- Labardini Méndez JR, *et al.* Linfoma Non-Hodgkin. *Cancerología*. 2011, vol 6, p. 139-152.
- Lacroix D, *et al.* Expression of CYP3A in human Liver Evidence That the shift between CYP3A7 And CYP3A4 Occurs immediately after birth. *European Journal of Biochemistry*. 1997, vol 247, p. 625-634.
- Lee S y Privalsky M. Heterodimers of retinoic acid receptors and thyroid hormone receptors display unique combinatorial regulatory properties. *Molecular Endocrinology*. 2005, vol 19, p. 863-78.
- Lei J e Ingbar DH. Src kinase integrates PI3K/Akt and MAPK/ERK1/2 pathways in T3-induced Na-K-ATPase activity in adult rat alveolar cells. *American Journal of Physiology: Lung Cellular and Molecular Physiology*. 2011, vol. 301, p. L765–L771,
- Lei, JCN, *et al.* T3 increases Na-K-ATPase activity via a MAPK/ERK1/2-dependent pathway in rat adult alveolar epithelial cells. *The American Journal of Physiology—Lung Cellular and Molecular Physiology*, 2008, vol. 294, p. L749–L754.
- Lester Reed H. Thyroid Physiology: Síntesis and release, iodine metabolism, binding and transport. En Becker K. Principles and practice of endocrinology and metabolism. 2001; 3era Edición. Wartofsky L. (Ed). Part III. The thyroid gland. Capítulo 30. Lippincott Williams y Wilkins Publishers. P. 314-318.
- Li AP, *et al.* Substrates of human hepatic cytochrome P450 3A4. *Toxicology*. 1995, vol 104, p. 1-8.

- Liddle C, *et al.* Separate and Interactive Regulation of Cytochrome P450 3A4 by Triiodothyronine, Dexamethasone, and Growth Hormone in Cultured Hepatocytes. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 1998, vol 83, p. 2411-2416.
- Lin HY, *et al.* L-Thyroxine vs. 3, 5, 3'-triiodo-Lthyronine and cell proliferation: activation of mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase. *American journal of physiology Cell physiology*. 2009, vol 296, C98091.
- Lin HY, *et al.* Nuclear monomeric integrin α 5 in cancer cells is a coactivator regulated by thyroid hormone. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2013, vol 27, p. 3209-3216.
- Lin X, *et al.* cloning of the 5'-flanking region of mouse sodium/iodide symporter and identification of a thyroid-specific and TSH responsive enhancer. *Thyroid*. 2004, vol 14, p. 19-27.
- Lin, HY, *et al.* Integrin α 5 β 3 contains a receptor site for resveratrol. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2006, vol 20, p. 1742-1744.
- Liu Y, *et al.* Rapid T cell receptor-mediated SHP-1 S591 phosphorylation regulates SHP-1 cellular localization and phosphatase activity. *Journal of leukocyte biology*. 2007, vol 82, p. 42-51.
- Livak KJ y Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-Delta Delta C (T)} Method. *Methods*. 2001, vol 25, p. 402-408.
- Livolsi V. Morphology of the thyroid gland. En Becker K. (Ed). Principles and practice of endocrinology and metabolism, 3era Edición. Wartofsky L. (Ed). Part III. The thyroid gland. Capítulo 29. Lippincott Williams y Wilkins Publishers. 2011, p.311-313.
- Ma C, *et al.* Thyroxine alone or thyroxine plus triiodothyronine replacement therapy for hypothyroidism. *Nuclear Medicine Communications*. 2009, vol 30, p. 586-593.

- Malik R & Hodgson H. The relationship between the thyroid glands and the liver. *QJM: Monthly Journal of the Association of Physicians*. 2002, vol 95, p. 559-569.
- Martignoni M, *et al.* An in vivo and in vitro comparison of CYP gene induction in mice using liver slices and quantitative RT-PCR. *Toxicology in Vitro*. 2006, vol 20, p. 125-331.
- Meredith, C, *et al.* Studies on the induction of rat hepatic CYP1A, CYP2B, CYP3A and CYP4A subfamily form mRNAs in vivo and in vitro using precision-cut rat liver slices. *Xenobiotica*. 2003, vol, 33, p. 511-527.
- Mintziori G, *et. al.* Thyroid diseases and female reproduction. *Minerva Med*. 2012, 103(1): p. 47-62.
- Miyoshi Y, *et al.* Prediction of response to docetaxel by immunohistochemical analysis of CYP3A4 expression in human breast cancers. *Breast Cancer*. 2005, vol 12, p. 11-5.
- Moeller LC y Broecker-Preuss M. Transcriptional regulation by nonclassical action thyroid hormone. *Thyroid Research*, 2011, vol 4 (Suppl 1) S6.
- Moeller LC y Führer. Thyroid hormone, thyroid hormone receptors, and cancer: a clinical perspective. *D.Endocrine Related Cancer*. 2013, vol 22, p. 19-29.
- Molina Ortiz D, *et al.* Modulación de la Expresión de Enzimas del Citocromo P450 hepáticas durante las Etapas Fetal y Pediátrica. *Revista de Educación Bioquímica*. 2012, vol 31, p. 60-71.
- Morag *et al.* Cytochrome P450 enzymes: Novel options for cáncer therapeutics. *Molecular Cancer Therapeutics*. 2004, vol 3, p. 363-371.
- Murray *et al.* Small-scale immunopurification of cytochrome c oxidase for a high-throughput multiplexing analysis of enzyme activity and amount. *Biotechnology Applied Biochemistry*. 2007, vol, p. 167-178.
- Murray *et al.* Tumor-specific Expression of Cytochrome P450 CYP1B1. *Cancer Research*. 1997, vol 57, p. 3026-3031.
- Murray GI y Burke MD. Immunohistochemistry of drug metabolizing enzymes. *Biochemical Pharmacology*. 1995, vol 50, p. 895-903.

-
- Nebert DW y Russell DW. Clinical importance of the cytochromes P450. *The Lancet*. 2002, vol 360, p. 1155–1162.
 - Nebert DW y Gonzalez FJ. P450 genes: structure, evolution, and regulation. *Annual Review of Biochemistry*. 1987, vol 56, p. 945 –993.
 - Nebert *et al.* Human cytochromes P450 in health and disease. *Philosophical Transactions of the Royal Society*. 2013, vol 368, p. 1-21.
 - Nelson DR, *et al.* Comparison of cytochrome P450 (CYP) genes from the mouse and human genomes, including nomenclature recommendations for genes, pseudogenes, and alternative-splice variants. *Pharmacogenetics*. 2004, vol 14, p. 1 –18.
 - Oetting A y Yen PM. New insights into thyroid hormone action. *Best Practice & Research: Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2007, vol 21, p. 193-208.
 - Ohtsuki S, *et al.* Simultaneous absolute protein quantification of transporters, cytochrome P450s and UDP-glucuronosyltransferases as a novel approach for the characterization of individual human liver: comparison with mRNA levels and activities. *Drug Metabolism and Disposition*. 2012, vol 40, p. 83–92.
 - Okosieme OE. Thyroid hormone replacement: current status and challenges. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*. 2011, vol 12, p. 2315-2328
 - Orellana MB y Guajardo TV. Cytochrome P450 activity and its alteration in different diseases. *Revista Medica Chile*. 2004, vol 132, p. 85-94.
 - Pan J, *et al.* Use of a novel real-time quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction method to study the effects of cytokines on cytochrome P450 mRNA expression in mouse liver. *Drug Metabolism and Disposition*. 2000, vol 28, p. 709–713.
 - Petrich AM y Rosen ST. Peripheral T-cell lymphoma: new therapeutic strategies. *Oncology (Williston Park)*. 2013, vol 27, p. 878-884.
 - Peking Fong. Thyroid iodide efflux: a team effort? *Journal of Physiology*. 2011, vol 589, p. 5929-5939.

- Plow EF, *et al.* Ligand binding to integrins. *The Journal of Biological Chemistry*. 2010, vol 275, p. 21785–21788.
- Potenza M, *et al.* Excess thyroid hormone and carbohydrate metabolism. *Endocrine Practice*. 2009, vol 15, p. 254-262.
- Pucci E, *et al.* Thyroid and lipid metabolism. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders*. 2000 vol 24, p. S109-S112.
- Quiñones LS, *et al.* Papel de las enzimas citocromo P450 en el metabolismo de fármacos antineoplásicos: Situación actual y perspectivas terapéuticas. *Revista Médica Chile*. 2008, vol 136, p. 1327-1335.
- Rang HP, Dale M, Ritter JM, Moore PK. *Pharmacology*. 5ta Ed. Churchill-Livingstone, 2003, p. 816.
- Reiche EM, *et al.* Stress, depression, the immune system, and cancer. *The Lancet Oncology*. 2004, vol 5, p. 617-625.
- Reuning U. Integrin alphavbeta3 promotes vitronectin gene expression in human ovarian cancer cells by implicating rel transcription factors. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2011, vol 112, p. 1909–1919.
- Ribatti D, *et al.* The role of angiogenesis in human non-Hodgkin lymphomas. *Neoplasia*. 2013, vol 15, p.231-238
- Rodríguez-Abreu D, *et al.* Peripheral T-cell lymphomas, unspecified (or not otherwise specified): a review. *Journal of Hematology & Oncology*. 2008, vol 26, p.8–20.
- Rodríguez-Antona C, *et al.* Expression of CYP3A4 as a predictor of response to chemotherapy in peripheral T-cell lymphomas. *Blood*. 2007, vol 110, p. 3345-3351.
- Romano A, *et al.* Immunological deregulation in classic Hodgkin lymphoma. *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases*. 2014, vol 6, e2014039

-
- Rosenquist R, *et al.* The microenvironment in lymphomas—dissecting the complex crosstalk between tumor cells and ‘bystander’ cells. *Seminars in Cancer Biology*. 2014, vol 24, p. 1-2.
 - Roth P, *et al.* Integrin control of the transforming growth factor-beta pathway in glioblastoma. *Brain*. 2013, vol 136, p. 564–76.
 - Saltel F, *et al.* Actin cytoskeletal organisation in osteoclasts: a model to decipher transmigration and matrix degradation. *European Journal of Cell Biology*. 2008, vol 87, p. 459–468.
 - Schuetz EG, *et al.* Expression of cytochrome P450 3A in amphibian, rat and human kidney. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1992, vol 294, p. 206-214.
 - Serrano-Nascimento C, *et al.* Post-transcriptional regulation of sodiumiodide symporter mRNA expression in the thyroid gland by acute iodide administration. *American Journal of Physiology- Cell Physiology*. 2010, vol 298, p. 893-899
 - Shih A, *et al.* Disparate effects of thyroid hormone on actions of epidermal growth factor and transforming growth factor alpha are mediated by 3', 5'-cyclic adenosine 5'-monophosphate-dependent protein kinase II. *Endocrinology*. 2004, 145, p. 1708–1717.
 - Shih A, *et al.* Disparate effects of thyroid hormone on actions of epidermal growth factor and transforming growth factor are mediated by 3'5'- cyclic adenosine 5' monophosphate-dependent protein kinase II. *Endocrinology*. 2004, vol 145, p. 1708-1717.
 - Singh D *et al.* Novel advances in Cytochrome P450 research. *Drug Discovery Today*. 2011, vol 16, p. 793-799.
 - Singh V, Singh SM. Progressive tumor growth-associated altered tumor microenvironment: implications in a tumor stage-dependent modulation in survival of a murine T cell lymphoma. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. 2009, vol 135, p. 1015-1024.
 - Sloan EK, *et al.* Tumor-specific expression of alphavbeta3 integrin promotes spontaneous metastasis of breast cancer to bone. *Breast Cancer Research*. 2006, 8:R20.

- Sterle HA, *et al.* Thyroid status modulates T lymphoma growth via cell cycle regulatory proteins and angiogenesis. *Journal of Endocrinology*. 2014, vol 222, p. 243-255.
- Tata JR. The road to nuclear receptors of thyroid hormone. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2013, vol 1830, p. 3860-3836.
- Thorn, CF, *et al.* Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects. *Pharmacogenet Genomics*, 2011, vol 21, p.440-446.
- Umemoto T, *et al.* Integrin- α v β 3 regulates thrombopoietin-mediated maintenance of hematopoietic stemcells. *Blood*. 2012, vol 119, p. 83–94.
- van Maanen, JM, *et al.* Cytochrome P450-mediated O-demethylation: a route in the metabolic activation of etoposide (VP-16-213). *Cancer Research*. 1987, vol 47, p. 4658–4662.
- van Maanen, JM, *et al.* The role of metabolic activation by cytochrome P-450 in covalent binding of VP 16-213 to rat liver and HeLa cell microsomal proteins. *European Journal of Cancer and Clinical Oncology*. 1985, vol 21, p. 1099–1106.
- van Schaik RHN. CYP450 pharmacogenetics for personalizing cancer of therapy. *Drug Resistance Updates*. 2008, vol 11, p. 77-98.
- Vardiman JW, *et al.* The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*. 2009, vol 114, p. 937–951
- Vasile D, *et al.* Peripheral T and NK Cell Non-Hodgkin Lymphoma a Challenge for Diagnosis. *MAEDICA – a Journal of Clinical Medicine*. 2014, vol 9, p. 104-108.
- Vignati LA, *et al.* A human and mouse pregnane X receptor reporter gene assay in combination with cytotoxicity measurements as a tool to evaluate species specific CYP3A induction. *Toxicology*. 2004, vol 199, p. 23–33.
- von Richter O, *et al.* Cytochrome P450 3A4 and P-glycoprotein expression in human small intestinal enterocytes and hepatocytes: a comparative analysis in paired tissue specimens. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*. 2004, vol 75, p. 172-183.

-
- Wilkinson GR. Drug metabolism and variability among patients in drug response. *The New England Journal of Medicine*. 2005, vol 352, p. 2211-2221.
 - Williams G. Neurodevelopmental and neurophysiological actions of thyroid hormone. *Journal of Neuroendocrinology*. 2008, vol 20, p.784-794.
 - Williams JA, *et al.* Comparative metabolic capabilities of CYP3A4, CYP3A5, and CYP3A7. *Drug Metabolism and Disposition*. 2002, vol 30, p. 883–891.
 - Williams JA, *et al.* Comparative metabolic capabilities of CYP3A4, CYP3A5, and CYP3A7. *Drug Metabolism and Disposition*. 2002, vol 30, p. 883-891.
 - Wrighton SA, *et al.* Human drug metabolizing cytochromes P450. *Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics*. 1996, vol 24, p. 461-473.
 - Yamauchi M, *et al.* Thyroid hormone activates adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase via intracellular calcium mobilization and activation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase β . *Molecular Endocrinology*. 2008, vol 22, p. 893-903.
 - Yen PM, *et al.* Thyroid hormone action at the cellular, genomic and target gene levels. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2006, vol 246, p. 121-127.
 - Yen PM. Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. *Physiological Review*. 2001, vol 81, p. 1097-1142.
 - You SH, *et al.* The interaction between nuclear receptor corepressor and histone deacetylase 3 regulates both positive and negative thyroid hormone action in vivo. *Molecular Endocrinology*. 2010, vol 24, p. 1359-1367.
 - Zanger UM y Schwab M. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: Regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacology & Therapeutics*. 2013, vol 138, p. 103-141.
 - Zhang W, *et al.* Expression of drug pathway proteins is independent of tumour type. *The Journal of Pathology*. 2006, vol 209, p. 213-219.
 - Zordoky BNy El-Kadi AO. Induction of several cytochrome P450 genes by doxorubicin in H9c2 cells. *Vascular Pharmacology*. 2008, vol 49, p. 166-172.