

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

***Caracterización del fenotipo adulto
del ratón deficiente para la desyodasa tipo 2:
implicaciones funcionales de la generación local de T3***

Daniel Bosch García

Madrid 2012

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

***Caracterización del fenotipo adulto
del ratón deficiente para la desyodasa tipo 2:
implicaciones funcionales de la generación local de T3***

Memoria que presenta el licenciado en Ciencias Biológicas

Daniel Bosch García para optar al grado de Doctor

por la Universidad Autónoma de Madrid

Directora: Dra. Ana Cristina Guadaño Ferraz
Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols”, CSIC-UAM

Madrid 2012



**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
BIOMÉDICAS "ALBERTO SOLS"**

Ana Cristina Guadaño Ferraz, Doctora en Ciencias Biológicas, Científico Titular del Consejo Superior de Investigaciones Científicas en el Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols" (CSIC-UAM).

CERTIFICA: que **Daniel Bosch García**, licenciado en Ciencias Biológicas por la Universidad de Barcelona, ha realizado bajo su dirección el trabajo de investigación titulado:

**Caracterización del fenotipo adulto del ratón deficiente para la desyodasa tipo
2: implicaciones funcionales de la generación local de T3**

y considera que el trabajo reúne las condiciones de originalidad y rigor metodológico necesarias para ser presentado como Tesis Doctoral en el Departamento de Bioquímica de la Universidad Autónoma de Madrid.

Y para que conste donde proceda, expide el presente certificado en Madrid a 23 de Mayo del 2012.

Fdo. Dra. Ana Cristina Guadaño Ferraz
Directora de la tesis

VºBº Prof. María Jesús Obregón Perea
Tutora de la tesis

Dra vinculada al Programa de Doctorado de
Bioquímica, Biología Molecular y Biomedicina

Esta tesis se ha llevado a cabo gracias a la financiación del Ministerio de Economía y Competitividad
(antes Ministerio de Ciencia e Innovación; BFU2007-62979)

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar me gustaría agradecer la confianza que depositó Ana en mí para dirigir esta tesis. Gracias por el apoyo y por aguantarme estos 4 años.

En segundo lugar me gustaría agradecer muy especialmente a Kimmo Jensen por ser la persona que realmente me inició en la investigación y por ser la persona que ha permitido que a día de hoy estuviera escribiendo estos agradecimientos. Además de Kimmo me gustaría agradecer a todas las personas con las que compartí un año maravilloso, Marina, Irina, Kirsten, Vibeke, Zita, Mai y Kim.

Agradecer a Iván por enseñarme todo del IIB durante el primer año de la tesis y a Ana M. por compartir el laboratorio todo este tiempo.

Evidentemente agradecer a las 2 personas (Javi y Sergio) con quien he compartido estos 4 años de tesis y con las que posiblemente haya pasado más tiempo en Madrid. Han sido muchas las cosas compartidas, noches de Imperio, de Malasaña, de carnaza y futbol y sobre todo de monte...(viva el vino!). Son muchos los recuerdos que quedan y muchas las historias y anécdotas, pero ante todo 2 grandes personas y amigos! Carmen no te pienses que me olvido de ti, estás dentro del mismo saco. Has sido la tercera en discordia con la que más tiempo he pasado. Se te echa de menos por el IIB pero no te preocupes que cuando pueda me escapo a verte. No me puedo olvidar de toda la gente que ha ido pasando por el laboratorio, Natalia creo que no he conocido a ninguna persona con mejor fondo y que siempre piense positivamente, Pamper que desde el primer día que nos vimos supe que vendrías en bici cada día, a parte de eso has sido todo alegría para el labo y sobre todo fuera. Iris te diría muchas cosas pero creo que sabes que me alegro enormemente que pasaras por el labo, mucho ánimo y espero que tengas muchísima suerte con la tesis. Cuando entregue nos vamos al pobre! Pilar, Loreto menudas aventuras y risas ha habido cada día con vosotras. Dar la bienvenida a las nuevas generaciones que espero puedan hacer la tesis (Juana, Sandra, Daniela, Soledad). Sandra, llevas poco por el laboratorio y ya me alegro de que hayas pasado por aquí, cúrratelo que seguro que te va genial. Soledad te deseo lo mejor, se que harás una tesis muy chula, ya lo verás. Siguiendo con el laboratorio me gustaría agradecerle muchas cosas a Ricardo pero sobre todo su apoyo y su disposición a resolver todas esas dudas que han ido surgiendo estos años. Rosa, no son pocos los consejos que me has dado sobre todo este último año. María Jesús muchísimas gracias por ser mi tutora pero sobre todo por estar ahí siempre que lo he necesitado, he aprendido muchas cosas contigo. Ha sido un placer conoceros a los 3. También agradecer al 2.10 todo su apoyo y por facilitarme tanto las cosas cuando tenía que ir a "robar". Lali disfruta de la jubilación que te lo has merecido. Mari Carmen se nota que desde hace tiempo no entras cada día acelerada por el labo con una sonrisa. Bárbara que ya te queda poquito para terminar ya veras como al final merece la pena. Agradecer al resto del grupo 2.10 (Mónica, Pilar, Bea) por todas las cosas aportadas que no han sido pocas. Juan

has sido la persona a preguntar cuando tenía dudas de cualquier tema, la verdad que me he aprendido mucho contigo, más de lo que parece.

Por el IIB hay muchísima gente a la que agradecer cosas espero que si me dejo a alguien no se enfade. De las primeras personas que conocí fue a todo el servicio del animalario. Fernando a ti te debo mucho pero ya sabes que mi punto débil son las mujeres... Ruth, Ili, Geni, Cris, cuantos días y días y más días hemos compartido por el animalario echándome una mano o simplemente hablando de la vida. Dentro de la sección animalario tampoco me olvido del animalario de la facultad; Santi, Miguel, Eli, Manolo y sobre todo Marta y David. Siguiendo con la gente del IIB agradecer a María C y Vero por esos paseos diarios. Es curioso que nos crucemos cada día eh. María G que ya prácticamente hemos terminado! Un placer tenerte de vecina los primeros años ya solo nos queda celebrar nuestras tesis. María V, Marta, Irene, Ana Sastre que tardes de risas y marujeos me habéis dado en la biblioteca pero sobre todo daros la enhorabuena por estas tesis tan maravillosas que habéis escrito y por ser capaces de concentraros todas las mañanas con los porrazos al teclado de fondo. Jose (1.3.1) sabes que siempre te esperaré con Sergio en el baño para cepillarnos los 3. Alberto, Isa no se como lo hacéis pero estáis todo el día de cachondeo. A la gente de resonancia: Jesús, Patri, Eva, Pili (ya lo siento pero la representación de esa película en las jornadas todavía la tengo muy presente). A la gente de seguridad, Diego y Carlos que estáis todos los días de buen humor y dispuestos a dar los buenos días.

En Valencia durante mi estancia me trataron genial y aprendí un montón de cosas y técnicas. Gracias a todas (Patri, Irene, María, Susana, Clara, Vivian) y también al hombre del laboratorio (Mario).

De la UNED me gustaría agradecerle a César y a Inma su predisposición para realizar los experimentos de conducta que no se podían realizar en el IIB y por todo el tiempo que habéis empleado para que esta tesis recogiera sus frutos.

Del Ramón y Cajal me llevo más de lo que podría esperar. Para mi ha sido mi segundo laboratorio sin lugar a dudas. Jota te debo mucho más que una tesis. La verdad que he aprendido mucho este tiempo que he pasado en tu laboratorio realizando los experimentos de electrofisiología de unos ratones que no han dado muchos resultados positivos pero como siempre me decías... si necesitas más "ratones del amor" seguimos. Jose soy tu talismán que conmigo el Atleti ha ganado 2 Europa League! No hay palabras para agradecer todas las cosas aportadas. Lula has sido otra de las grandes personas del RyC, sin ti todas esas tardes no hubieran sido lo mismo. Una mención especial para toda la gente del pasillo (Toni, Lali, Lili, Maca, Luci, Rafa, Cris). He pasado muy buenos momentos en ese pasillo y seguro que no serán los últimos.

Tampoco quiero olvidarme de toda la familia de logopedas (Isra, Laura, Tati, Rubén, Sandra), de la gente de Alcalá (Maca, Vicen, Joaquín, Eva, Angel, Mario, Andrés, Arantxa), y de los erasmus en Madrid (Argiñe, Teresa os espero el día de la tesis y antes).

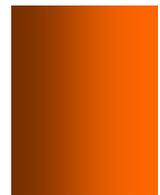
Eva, Lulis, que no me olvido de vosotras! Que ya son muchos los años que nos conocemos y muchos los momentos vividos. Sabéis que habéis participado mucho en esta tesis y que me habéis aguantado mucho! Al final quizás sea doctor y todo! Jona a veure si ho celebrem. David, Busi, després de tot això hem de fotre una bona platjeta, unes pales i sobretot un bon Opium per celebrar-ho. Oriol.... ets el mes gran, sempre has estat quan he necessitat una xerradeta. Merci per tot.

Asun, Alejandro, Alex, Sergio la familia política, habéis estado en todos los momentos así que poco más que decir.

Cris gracias por haber estado en todos los buenos momentos de esta tesis pero sobre todo por hacerlo en los malos, por creer en mis posibilidades pero sobre todo por compartir todos y cada uno de los momentos desde el día que nos conocimos. Esta tesis sin ti no hubiera sido lo mismo.

David, Emma a vosaltres també us dec molt i ho sabeu. Jan, Martina encara sou molt petits però la vostre arribada ha sigut l'alegria de la casa.

Finalment m'agradaria agrair tot el que els meus pares han fet per mi. Sou les persones que realment heu fet possible que arribes aquest dia i mai podré tornar-vos tot el que m'heu donat. Sense vosaltres mai hagués pogut arribar fins aquí.



ÍNDICE

ÍNDICE.....	15
ABREVIATURAS.....	21
RESUMEN	27
SUMMARY.....	31
INTRODUCCIÓN.....	35
1. LAS HORMONAS TIROIDEAS	37
1.1 Síntesis, secreción y transporte de las hormonas tiroideas	37
1.1.1 Metabolismo de las hormonas tiroideas.....	38
1.1.1.1 Desyodasa tipo 2	39
1.1.1.1.1 D2 y metabolismo de la glucosa	42
1.2 Mecanismos de acción de las hormonas tiroideas	43
1.2.1 Modulación de la expresión génica.....	43
1.2.2 Mecanismos de acción extranucleares de las hormonas tiroideas	44
1.3 Acciones de las hormonas tiroideas en el sistema nervioso central: hipotiroidismo.....	45
1.3.1 El hipotiroidismo durante el desarrollo del sistema nervioso central	45
1.3.2 El hipotiroidismo en el sistema nervioso adulto	46
2. LA FORMACIÓN HIPOCAMPAL	46
2.1 Estructura de la formación hipocampal	46
2.1.1. Anatomía del hipocampo en el ratón adulto	46
2.1.2. Anatomía del giro dentado en el ratón adulto.....	47
2.1.3 Conexiones de la formación hipocampal.....	48
2.2 Funciones de la formación hipocampal	49
2.2.1 Aprendizaje y memoria: Bases celulares y moleculares.....	49
2.2.2 Implicaciones de las hormonas tiroideas en la plasticidad del hipocampo..	50
3. MEMORIA EMOCIONAL: CONDICIONAMIENTO DEL MIEDO	51
3.1 Regulación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal.....	52
3.2 Anatomía y funciones dependientes de la amígdala.....	53
3.3 Implicaciones de las hormonas tiroideas en procesos de aprendizaje y memoria emocional.....	53

OBJETIVOS	55
MATERIALES Y MÉTODOS	59
1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN	61
1.1 Obtención de los ratones Dio2 ^{-/-}	61
1.2 Grupos experimentales y tratamientos hormonales	61
1.3 Sacrificio y obtención de tejido en fresco	62
1.4 Obtención de sangre y plasma	62
2. TÉCNICAS BIOQUÍMICAS	63
2.1 Determinación de las concentraciones de hormonas tiroideas	63
2.1.1 Síntesis de trazadores (T3 y T4 marcadas radiactivamente).....	63
2.1.2 Extracción de hormonas tiroideas de plasma.....	63
2.1.3 Determinación de T3 y T4 en extractos de plasma y tejido (RIA)	63
2.2 Determinación de la actividad de la D2 y D1 en tejido cerebral	64
2.2.1 Homogeneización del tejido	64
2.2.2 Medición de la actividad de la D2 y D1	64
2.3 Determinación de los niveles de glucosa en sangre.....	66
2.3.1 Test de tolerancia a la glucosa	66
2.3.2 Test de tolerancia a la insulina.....	66
2.4 Determinación de la concentración de corticosterona en plasma	66
2.5 Detección de la fosforilación de Akt mediante western blot.....	67
2.5.1 Análisis de la fosforilación de <i>Akt</i>	68
3. EVALUACIÓN NEUROSENSORIAL Y SENSORIOMOTORA.....	68
3.1 Estudio de los potenciales auditivos evocados del tronco cerebral	68
3.2 Prueba del rodillo giratorio o rotarod.....	69
3.3 Prueba del poste vertical	70
3.4 Prueba de la reja.....	70
3.5 Prueba de la imprenta de pisadas	71
3.6 Estudio de la velocidad de conducción nerviosa	72
3.7 Prueba de sensibilidad a la descarga eléctrica	73

4 EVALUACIÓN COGNITIVA	74
4.1 Prueba de Barnes.....	74
4.2 Prueba de condicionamiento del miedo	76
4.2.1 Proceso experimental de la prueba de condicionamiento del miedo	76
4.2.2 Proceso experimental de la extinción y la recuperación espontánea de la memoria del miedo condicionado.....	77
5. REGISTROS ELECTROFISIOLÓGICOS EN RODAJAS DE LA FORMACIÓN HIPOCAMPAL.....	78
5.1 Preparación del tejido	79
5.2 Registros electrofisiológicos.....	80
5.3 Potenciales extracelulares	80
5.4 Estimulación eléctrica.....	81
5.4.1 Curva estímulo/respuesta.....	81
5.4.2 Facilitación por pares de pulsos.....	81
5.4.3 Depresión a largo plazo	82
5.4.4 Potenciación a largo plazo	82
5.5 Procesamiento de los registros electrofisiológicos	82
6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	83
RESULTADOS.....	85
1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN: EVALUACIÓN DEL ESTADO TIROIDEO	87
1.1 Influencia de la D2 en el peso corporal	87
1.2 Concentraciones de hormonas tiroideas en plasma y regiones cerebrales.....	87
1.3 Actividad de la D2 y D1 en distintas regiones cerebrales	89
2. INFLUENCIA DE LA D2 EN EL METABOLISMO DE LA GLUCOSA.....	90
2.1 Niveles de glucosa en sangre	90
2.2 Test de tolerancia a la glucosa	90
2.3 Test de tolerancia a la insulina.....	91
2.4 Análisis de la fosforilación de Akt en respuesta a la señalización por insulina	93

3. INFLUENCIA DE LA D2 EN PRUEBAS NEUROSENSORIALES Y SENSORIOMOTORAS	96
3.1. Función auditiva.....	96
3.2 Prueba del rodillo giratorio	99
3.3 Prueba del poste vertical	103
3.4 Prueba de la reja.....	105
3.5 Prueba de la imprenta de pisadas	106
3.6 Función neuromuscular.....	109
4. INFLUENCIA DE LA D2 EN PRUEBAS COGNITIVAS	111
4.1 Prueba de Barnes.....	111
4.2 Prueba de condicionamiento del miedo	113
5. INFLUENCIA DE LA D2 EN LA PLASTICIDAD SINÁPTICA ENTRE LAS FIBRAS COLATERALES DE SCHAFFER Y LAS NEURONAS PIRAMIDALES DE LA REGIÓN CA1	117
5.1 Análisis del perfil de intensidades: curva estímulo/respuesta.....	117
5.2 Análisis de la facilitación por pares de pulsos	118
5.3 Depresión a largo plazo	118
5.4 Potenciación a largo plazo	119
DISCUSIÓN	123
1. Homeostasis de las HT en plasma y SNC.....	125
2. Metabolismo de la glucosa.....	127
3. Pruebas neurosensoriales y sensoriomotoras	129
4. Aprendizaje y memoria.....	132
4.1 Prueba de Barnes.....	132
4.2 Prueba de condicionamiento del miedo	134
5. Plasticidad sináptica en la región CA1 del hipocampo.....	136
CONCLUSIONES	139
BIBLIOGRAFÍA	143



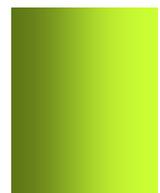
ABREVIATURAS

ACTH	Adrenocorticotropic hormone (hormona estimulante de la corteza suprarrenal)
AMPA	α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propiónico)
ANOVA	Análisis de la varianza
BAT	Tejido adiposo marrón
BLA	Núcleo basolateral de la amígdala
BSA	Bovine serum albumin (seroalbúmina bovina)
CA	<i>Cornu Ammonis</i> , asta de Amón
CaMKII	Calmodulina quinasa dependiente de Ca^{2+} de tipo 2
CaMKIV	Calmodulina quinasa dependiente de Ca^{2+} de tipo 4
CAP	Potencial de acción compuesto
CB	Cerebelo
Cols.	Colaboradores
cpm	Cuentas por minuto
CREB	Elemento de respuesta a AMP-cíclico
CRH	Corticotropin-releasing hormone (hormona liberadora de corticotropina)
CTX	Corteza cerebral
D1, D2, D3	Desyodasas tipo 1, 2 y 3
Dio ^{2-/-}	Ratones deficientes para desyodasa 2
Dio ^{2-/-} + HT	Ratones deficientes para desyodasa 2 con tratamiento de hormonas tiroideas
DOC	Sodium deoxycholate (deoxicolato sódico)
DTT	Dithiothreitol (ditiotreitól)
EC	Estímulo condicionado
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid (ácido etilendiamino-tetracético)
ELISA	Ensayo en fase sólida por inmunoabsorción ligado a enzimas
E-LTP	Early long term potentiation (potenciación a largo plazo temprana)
ENC	Estímulo no condicionado
ERK1/2	Quinasa regulada por señal extracelular 1/2
EST	Núcleo estriado
fEPSP	Field excitatory post-synaptic potentials (potencial excitador postsináptico poblacional)
GD	Giro dentado
GR	Receptores de glucocorticoides
GSK3	Glucógeno sintasa quinasa 3
GTT	Test de tolerancia a la glucosa
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid (ácido N-2-hidroxiethylpiperazina-N'-2-etanosulfónico)
HFS	High Frequency Stimulation (estimulación de alta frecuencia)

Abreviaturas

HHA	Eje hipotálamo-hipófisis-adrenal
HHT	Eje hipotálamo-hipófisis-tiroides
HPC	Formación hipocampal
HT	Hormonas tiroideas
i.p.	Intraperitoneal
ITT	Test de tolerancia a la insulina
KRB	Krebs-Ringer-Bicarbonato
LA	Núcleo lateral de la amígdala
LAT	Heterodimeric amino acid transporters (transportadores heterodiméricos de aminoácidos)
LCR	Líquido cerebroespinal o cefalorraquídeo
LFS	Impulsos de baja frecuencia
L-LTP	Late long term potentiation (potenciación a largo plazo tardía)
LTD	Long term depression (depresión a largo plazo)
LTP	Long term potentiation (potenciación a largo plazo)
MAPK	Mitogen-activated protein kinase (proteínas quinasas activadas por mitógeno)
MCT	Monocarboxylate transporters (transportadores de monocarboxilatos)
MLG	Modelo lineal general
MMI	2-mercapto-1- methylimidazole (2-mercapto-1-metil imidazol)
MR	Receptores de mineralocorticoides
NMDA	N-Methyl-D-aspartate (ácido N-metil-D-aspártico)
OATP	Organic Anion <i>Transporter</i> Polypeptide (transportadores de aniones orgánicos)
P15	Día postnatal 15 (P15, P30...)
PCR	Polymerase chain reaction (reacción en cadena de la polimerasa)
PDK1	Proteína quinasa dependiente de fosfoinosítidos-1
PEATC	Potenciales evocados auditivos de tronco cerebral
PI3K	Fosfotidilinositol 3 quinasa
PKA	Proteína quinasa A
PKB o Akt	Proteína quinasa B
PTU	6-Propyl-2-thiouracil (6-propil-2-tiouracil)
Q1	Cuadrante número 1
RIA	Radioinmunoanálisis
rT3	3, 3', 5'-triyodotironina o T3 reversa
RXR	Retinoid X receptor (receptor del ácido 9-cis-retinoico)
SDS	Sodium dodecyl sulphate (dodecilsulfato sódico)
SMA	Eje simpático-médulo-adrenal
SN	Sistema nervioso

SNC	Sistema nervioso central
T2	3, 3'-diyodotironina
T3	3, 5, 3' triyodo-L-tironina
T4	3, 5, 3', 5' tetrayodo-L-tironina o tiroxina
TBS	Theta Burst Stimulation (estimulación theta-burst)
TCA	Trichloroacetic acid (ácido tricloroacético)
TR	Thyroid hormone receptor (receptor de hormonas tiroideas)
TRE	Thyroid hormone response element (elemento de respuesta a hormona tiroidea)
TRH	Thyrotrophin releasing hormone (hormona liberadora de tirotropina)
TSH	Thyroid-stimulating hormone (hormona estimuladora del tiroides)
wt	Ratones Dio2 ^{+/+}
ZSG	Zona subgranular
ZSV	Zona subventricular



RESUMEN

Las hormonas tiroideas (HT), T4 y T3, son indispensables para un correcto desarrollo y funcionamiento del sistema nervioso central (SNC). La desyodasa tipo 2 (D2) es la enzima responsable de la generación local de T3 (forma activa a nivel transcripcional) por desyodación de T4. La D2 se expresa en la hipófisis, tejido adiposo marrón, músculo esquelético y en el SNC. En el cerebro adulto la D2 se expresa principalmente en astrocitos y tanicitos. Se ha propuesto un modelo de cooperación paracrina entre los astrocitos y las neuronas. En este modelo los astrocitos de la barrera hematoencefálica captarían la T4 de la sangre y la desyodarían a T3 por la acción de la D2. La T3 liberada al espacio extracelular sería captada por las neuronas en las que regularía la transcripción de genes sensibles a T3.

El objetivo de esta tesis ha sido obtener un mayor conocimiento del papel de la D2 como moduladora de la generación y disponibilidad de T3. Para ello, estudiamos diversos aspectos del fenotipo de ratones deficientes para la D2, especialmente los relacionados con fenotipos neurológicos en el adulto. Al comienzo de esta tesis no se había descrito ningún fenotipo característico relacionado con el SNC en estos animales, posiblemente por la existencia de mecanismos compensatorios en estadios juveniles. Nuestros resultados muestran que en condiciones de deficiencia de D2, aún con niveles plasmáticos eutiroideos de T3 y elevados de T4, diversas regiones cerebrales tienen niveles disminuidos de T3. Esto indica que en el cerebro adulto existe una fina regulación de los niveles de HT muy posiblemente dependiente de la necesidad de T3 y de la actividad de D2 en cada región cerebral. Numerosos estudios apuntan a la formación hipocampal como una de las regiones cerebrales con mayor dependencia de niveles eutiroideos de HT para su correcto funcionamiento. A pesar de ello, la disminución de T3 y T4 cuantificada en los animales deficientes para D2 en esta región no fue suficiente para producir alteraciones en distintos procesos de plasticidad cerebral dependientes del hipocampo habitualmente alterados en hipotiroidismo. Sin embargo, la deficiencia de D2 sí que altera el procesamiento de la memoria de miedo dependiente de la amígdala potenciándola, retrasando su extinción y aumentando considerablemente la recuperación espontánea de esta memoria emocional. El mecanismo de esta potenciación no está relacionado con un aumento en los niveles de corticosterona plasmáticos en respuesta al estímulo aversivo como sucede en el hipotiroidismo. Además, la deficiencia de D2 provoca alteraciones que se agravan con la edad en el patrón locomotor de los animales y también una disminución del tono muscular, lo que indicaría un importante papel de la D2 en el funcionamiento del músculo. Por último, la deficiencia de D2 produce anomalías en el metabolismo de la glucosa asociadas a una mayor tolerancia a la glucosa y mayor sensibilidad a la insulina en tejidos periféricos.

Clínicamente se han identificado distintas variantes de polimorfismos de la D2 asociadas a la predisposición a desarrollar distintas patologías. Estos hallazgos clínicos y los resultados obtenidos en esta tesis indican la importancia de seguir profundizando en el papel de la D2 en el adulto como enzima clave en la generación local de la T3 necesaria para el correcto funcionamiento del SNC y de distintos tejidos, como por ejemplo el músculo.

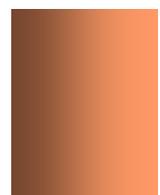


SUMMARY

Thyroid hormones (TH), T3 and T4, are essential for the correct development and function of the central nervous system (CNS). The type 2 deiodinase (D2) is an enzyme that generates T3 (active hormone at transcriptional level) for local use by the deiodination of T4. D2 is expressed at the pituitary gland, brown adipose tissue, skeletal muscle and the CNS. In the adult brain D2 is mainly expressed at astrocytes and tanycytes. There is a model that proposes a paracrine cooperation system between astrocytes and neurons. In this model, the astrocytes of the blood brain barrier would uptake T4 and would catalyse the deiodination to T3 by D2 activity. The T3 liberated to the extracellular domain would be taken up by neurons in which it would regulate the transcription of T3 dependent genes.

The aim of this thesis has been to gain a broader knowledge of the role of D2 in modulating the generation and availability of T3. To achieve this, we studied different aspects of the phenotype of D2 deficient mice, especially those ones related to neurological phenotypes in the adult. Until the start of this thesis no characteristic phenotype related with the CNS had been reported in these animals, possibly due to existence of compensatory mechanisms in early stages. Our results evidence that in D2 deficiency conditions, even with euthyroid levels of T3 and high levels of T4, several brain regions show decreased levels of T3. This shows that in the adult brain there is an acute regulation of the levels of TH, which is most probably dependent on the necessity of T3 and D2 activity in each brain region. Several studies point out the hippocampal formation as one of the most TH-dependent brain regions to ensure its correct function. Despite this, the monitored decrease in T3 and T4 levels in D2 deficient animals in this region was not enough to induce alterations in different hippocampal-dependent cerebral plasticity processes which are usually altered in hypothyroidism. However, D2 deficiency did alter the processing of amygdala-dependent fear memory, by potentiating it, delaying its extinction and considerable enhancing the spontaneous recovery of this emotional memory. The mechanism underlying this potentiation is not related to an increase on the plasma levels of corticosterone in response to the aversive stimulus as it happens in hypothyroidism. Moreover, D2 deficiency causes alterations that worsen with increasing age in the animal's locomotion pattern as well as it causes a decrease in muscle tone evidencing the important role of D2 in muscle function. Finally, D2 deficiency also causes abnormalities in the glucose metabolism, which are associated with increased glucose tolerance and insulin sensitivity in peripheral tissues.

Clinically, several D2 polymorphic variants that are associated to the predisposition to develop different pathologies have been identified. These clinical findings, along with the results obtained in this thesis, strongly indicate how important it is to continue researching to further define the role of D2 in the adult as a key enzyme for local generation of T3 for the correct function of the CNS and other tissues as, for example, the muscle.



INTRODUCCIÓN

1. LAS HORMONAS TIROIDEAS

Las hormonas tiroideas (HT), 3, 5, 3', 5' tetrayodo-L-tironina (T4) y 3, 5, 3' triyodo-L-tironina (T3) son esenciales en los vertebrados tanto por su papel durante el desarrollo del feto como por su implicación en la regulación del metabolismo de carbohidratos, lípidos, proteínas y del balance electrolítico. Está bien establecido que son necesarios niveles eutiroideos de HT para el correcto funcionamiento de los numerosos tejidos diana de las mismas como son el hígado, corazón, tejido adiposo, músculo y en especial el sistema nervioso central (SNC). La deficiencia de HT durante el desarrollo produce grave retraso mental, alteraciones neurológicas, retraso del crecimiento, así como síntomas endocrinos y signos de hipotiroidismo, siendo las alteraciones relativas al sistema nervioso (SN) irreversibles. La deficiencia de HT en el adulto puede ocasionar, además de manifestaciones metabólicas, trastornos de carácter neurológico o psiquiátrico y alteraciones en la conducta que en muchos casos son reversibles con un adecuado tratamiento de reemplazo hormonal.

1.1 Síntesis, secreción y transporte de las hormonas tiroideas

Las HT son hormonas yodadas que se sintetizan en la glándula tiroides (Figura 1). La glándula tiroides se localiza en la porción media del cuello, a ambos lados de la tráquea, y está compuesta por folículos. Estos folículos están constituidos por las células epiteliales foliculares o tirocitos que se sitúan en monocapa alrededor de una cavidad central rellena de coloide. El yodo es un micronutriente muy escaso pero los tirocitos son capaces de concentrarlo en su interior y sintetizar los precursores de las HT que se almacenan en el coloide.

En condiciones fisiológicas normales y de aporte suficiente de yodo, el tiroides secreta un 70 % de T4 y un 20 % de T3, la forma nuclearmente activa por tener mayor afinidad por sus receptores nucleares.

La síntesis y secreción de las HT está finamente regulada por el eje hipotálamo-hipófisis-tiroides (HHT). En el núcleo paraventricular del hipotálamo se sintetiza la hormona liberadora de tirotrópina (TRH) que induce la secreción de la hormona estimuladora del tiroides (TSH o tirotrópina) en la hipófisis anterior. La TSH se une a su receptor de membrana en los tirocitos y estimula la síntesis y secreción de las HT. El eje HHT está regulado por un mecanismo de retroalimentación negativa que contribuye a la homeostasis hormonal en el que las HT actúan directamente sobre el hipotálamo y la hipófisis inhibiendo la síntesis y secreción de TRH y TSH respectivamente.

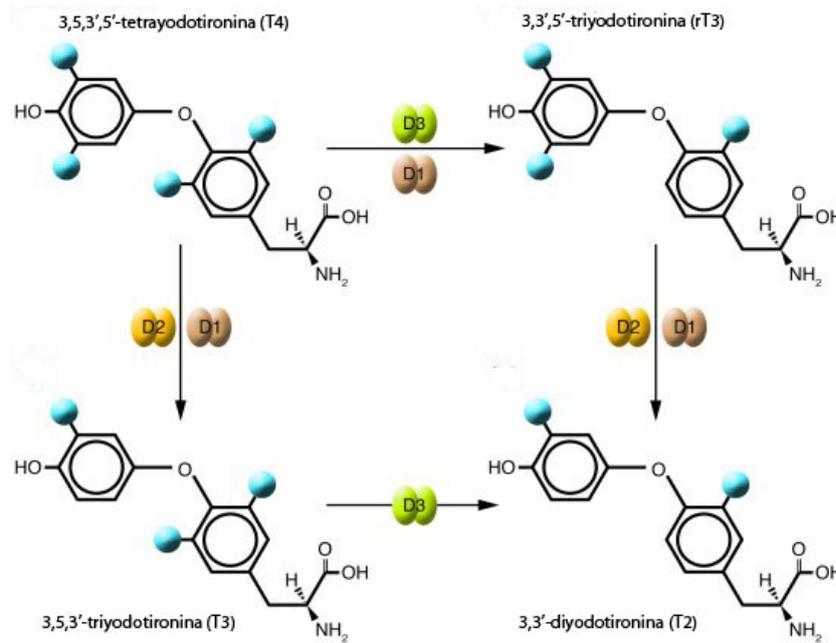


Figura 1. Estructura y metabolismo de las hormonas tiroideas. Las HT están constituidas por dos anillos bencénicos unidos por un puente de oxígeno. Los átomos de yodo se encuentran en número máximo de cuatro en las posiciones 3, 5, 3' y 5' y su número y posición son críticos para definir la actividad biológica de las HT y sus metabolitos.

Las HT son lipofílicas y poco solubles en agua, por lo que en la sangre el 95 % de las mismas circulan unidas a distintas proteínas plasmáticas: la globulina de unión a HT, la transtiretina y la albúmina, principalmente. Existe una pequeña porción de T4 y T3 que circulan libres. Estas HT libres son las que tienen la capacidad de unirse a receptores específicos en las células para llevar a cabo sus acciones biológicas. Actualmente está demostrado que en los distintos tejidos las HT se transportan al interior celular a través de varios transportadores: los transportadores de aniones orgánicos (OATP), los transportadores heterodiméricos de aminoácidos (LAT) y los transportadores de monocarboxilatos (MCT; (62, 99). En el cerebro del ratón, las HT se transportan por MCT8, MCT10, OATP2, OATP14, LAT1 y LAT2, que se expresan en la barrera hematoencefálica, en los plexos coroideos, en las neuronas y en los distintos tipos celulares del SNC (39, 95, 99).

1.1.1 Metabolismo de las hormonas tiroideas

Las HT son metabolizadas en los tejidos periféricos por varias rutas metabólicas siendo la desyodación progresiva la vía más importante. Las principales reacciones de desyodación son: la activación de la T4 a T3 por pérdida de un átomo de yodo en la posición 5' del anillo externo y la inactivación de T4 y T3 por pérdida de un átomo de yodo del anillo interno, generando 3,3',5'-triyodotironina (T3 reversa o rT3) y 3,3'-diyodotironina (T2), respectivamente (105).

La desyodasa tipo 1 (D1) y la desyodasa tipo 2 (D2) eliminan el yodo en la posición 5' del anillo externo de la T4, dando lugar a T3 que es la forma activa a nivel nuclear. La cinética de ambas enzimas indica una mayor aportación de la D2 en el paso de T4 a T3 debido a que su eficiencia catalítica es 700 veces mayor que la de la D1 (122). La D1 se localiza principalmente en órganos que permiten un rápido intercambio de las HT con el plasma (hígado, piel, tiroides y riñón) y su actividad contribuye a los niveles plasmáticos de T3. En cambio la D2 se expresa en tejidos de intercambio lento en los que las concentraciones intracelulares de T3 son críticas [SN, hipófisis, tejido adiposo marrón (BAT) y músculo esquelético] y su función es la generación local de T3 en estos tejidos. Estudios en humanos indican que la D2 contribuye de una manera importante a los niveles de T3 circulantes (122), aunque este papel de la D2 es controvertido pues varía entre especies. Por lo tanto, se considera que la D1 y la D2 desempeñan un importante papel en el mantenimiento de las concentraciones de T3. Se ha postulado que la D2 actuaría de forma específica para cada región cerebral según sean las necesidades de HT (77, 87).

La desyodasa tipo 3 (D3) inactiva la T4 y la T3 por desyodación en posición 5, dando lugar a rT3 y T2 respectivamente. Esta enzima se expresa en niveles bajos en todos los tejidos, pero su expresión es más elevada en el SNC, la piel, la placenta y el útero gestante. La D3 contribuye a la homeostasis hormonal, protegiendo a los tejidos del exceso de HT. En el encéfalo se expresa en neuronas, donde parece controlar la concentración y el tiempo de acción de la T3. Su expresión es máxima durante el periodo perinatal (102) y está relacionada con la diferenciación sexual del cerebro (65).

1.1.1.1 Desyodasa tipo 2

En el cerebro de rata en estadio postnatales juveniles y en el adulto, el 80 % de la T3 resulta de la conversión *in situ* de T4 a T3 por acción de la D2 (46, 182). La D2 parece ser la principal enzima implicada en este proceso dado que la D1 tiene una baja actividad en cerebro (500 veces menos) en comparación con otros tejidos como el hígado y el riñón (13). En el interior celular la D2 se localiza en el retículo endoplasmático, lo que puede favorecer el aporte de T3 al núcleo (77).

La actividad de la D2 se detecta por primera vez en el cerebro de rata al final de su periodo fetal y aumenta considerablemente hasta una actividad máxima alrededor del día postnatal 15 o 20 (P15, P20) que posteriormente decae hasta alcanzar los niveles del adulto (13, 170). La actividad de la D2 es muy sensible a los niveles de HT, regulándose de forma inversamente proporcional a las concentraciones de HT. Cuando los niveles de T4 son bajos se produce un aumento de la actividad de la D2 y en menor medida de su expresión, ayudando así a mantener la homeostasis cerebral de T3 (13, 147).

En los mamíferos, en el momento del nacimiento se produce una disminución de la actividad de la D3 que junto con el aumento de la actividad de la D2 resulta en un rápido aumento de la producción de T3 (13). Esto es el desencadenante de un aumento de la concentración intracelular de T3, permitiendo así la unión de la T3 a los receptores nucleares específicos y la modulación de la expresión de genes influyendo en procesos de diferenciación celular (34, 72, 96, 121, 143, 158, 171).

Actualmente está demostrado que la D2 tiene importantes funciones en el desarrollo del SN (15, 65, 87), en la diferenciación coclear (34, 143), en la regulación del eje HHT (51, 180), en la modulación de la termogénesis en el tejido adiposo marrón (52, 56, 98), en el funcionamiento y en la regeneración del músculo (58, 128) y en la formación ósea (12, 180, 199). Estudios más recientes han identificado nuevas funciones de la D2 en el corazón (193), en el músculo esquelético (85, 106) y en la hipófisis en respuesta a drogas específicas (166).

En el cerebro adulto la D2 se expresa principalmente en astrocitos y tunicitos (88), tanto en el soma como en sus prolongaciones. Los astrocitos forman parte de la barrera hematoencefálica y poseen prolongaciones que rodean los vasos sanguíneos y contactan con las neuronas. Los tunicitos son células gliales especializadas que tapizan la pared del tercio inferior del tercer ventrículo. El cuerpo celular de los tunicitos se encuentra en contacto con el líquido cerebrospinal o cefalorraquídeo (LCR) y emite prolongaciones que se extienden hasta la eminencia media, terminando con frecuencia en capilares sanguíneos. Debido al patrón de expresión de la D2 se ha propuesto un modelo de cooperación paracrina o acoplamiento celular entre los astrocitos y las neuronas y oligodendrocitos (88); Figura 2).

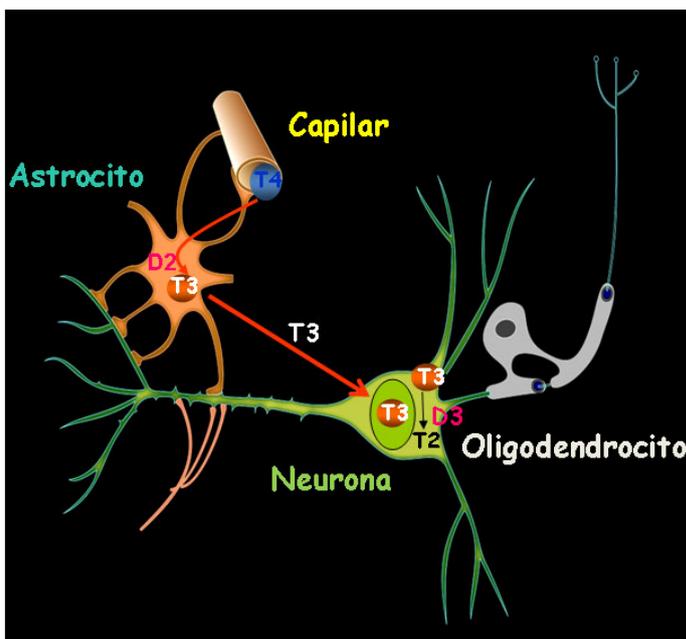


Figura 2. Modelo paracrina de señalización de HT en el cerebro. En la barrera hematoencefálica los astrocitos captarían la T4 circulante y la desyodarían a T3 por acción de la D2. La T3 sería liberada desde el astrocito hasta las neuronas dónde entraría gracias a los transportadores específicos de HT como MCT8. En el interior de las neuronas la T3 se une a receptores nucleares específicos modulando así la transcripción génica. La T3 y la T4 pueden ser inactivadas por acción de la D3 en las neuronas.

Estudios recientes realizados en ratones deficientes para D2 ($Dio2^{-/-}$) han corroborado la importancia del aporte intracerebral de T3 por acción de la D2. En ratones $Dio2^{-/-}$ a día P15 se ha descrito una disminución de entre un 25 y un 50 % en los niveles de T3 en diversas regiones cerebrales (75), siendo similar a la observada en ratones hipotiroideos de la misma edad tratados con la droga antitiroidea 2-mercapto-1-metil imidazol (MMI). Esta disminución de la concentración de T3 en los ratones $Dio2^{-/-}$ no es consecuencia de un aumento en la degradación de T3 porque la actividad de la D3 no se encuentra alterada (75). En corteza cerebral la disminución de los niveles de T3 tiene como consecuencia la alteración de la expresión de genes diana de las HT (74, 75, 141). A pesar de lo anterior, a día de hoy no se ha descrito ningún daño neurológico en los ratones $Dio2^{-/-}$ (74).

El músculo es otro tejido diana de las HT ya que se requieren niveles eutiroideos de HT para su correcto funcionamiento y regeneración. En pacientes hipotiroideos e hipertiroideos son frecuentes alteraciones funcionales en el músculo. Existen una gran cantidad de genes implicados en la función fisiológica del músculo así como en procesos metabólicos en este tejido que son regulados tanto positiva como negativamente por T3 (183, 191).

En el músculo se ha determinado tanto expresión como actividad de D2. El músculo está formado por 2 tipos de fibras musculares, las fibras de tipo I, denominadas rojas o de contracción lenta y las fibras de tipo II, denominadas blancas o de contracción rápida. Mientras que las fibras de tipo I predominan en los músculos posturales (músculos del tronco) cuya actividad es continua, las fibras de tipo II predominan en los músculos relacionados con el movimiento (músculos de las extremidades) que necesitan contraerse con mayor rapidez. En ratones adultos se ha descrito una actividad 5 veces superior de D2 en las fibras de tipo I en comparación con las fibras de tipo II. En condiciones de hipotiroidismo, en las fibras de tipo I se induce un aumento en la actividad de D2 de 3 veces sin que se detecten cambios en los niveles del ARNm (128).

El hipotiroidismo también se asocia con un retraso en la formación ósea y en el crecimiento corporal. Actualmente están emergiendo nuevos estudios que demuestran la implicación de la D2 en el desarrollo del esqueleto así como en la formación y mineralización del hueso en el adulto. Ratones adultos deficientes para la D2 ($Dio2^{-/-}$) de entre 3 y 4 meses de edad muestran fragilidad ósea asociada a fracturas por una reducción de la formación ósea del 50 % y un aumento en la mineralización (12).

En humanos se han descrito distintas variantes de polimorfismos de la D2 asociados a distintas patologías. Los polimorfismos de la D2 rs225012 y rs225010 se han asociado con un mayor riesgo a padecer retraso mental en regiones con deficiencia de yodo (90). El polimorfismo de la D2 rs225014 está asociado a osteoartritis (135), mientras que el polimorfismo Thr92Ala ha sido asociado con disfunciones en el eje HHT (33, 154), alteraciones de osificación (92), alteraciones en la respuesta al reemplazo de HT (8, 93, 152, 187), así como una relación no muy consistente con la hipertensión (89, 188), la resistencia a la insulina y el síndrome metabólico (35, 36, 61, 67, 84, 89, 133, 134, 155, 188).

1.1.1.1.1 D2 y metabolismo de la glucosa

Como se indica arriba, el polimorfismo Thr92Ala de la D2 se ha asociado en algunos estudios con resistencia a la insulina y con el síndrome metabólico. En la resistencia a la insulina se produce una alteración en la respuesta tisular a la acción de la insulina con el resultado de una menor captación de glucosa por los tejidos.

La insulina actúa aumentando la captación de glucosa en músculo y en grasa, e inhibe la producción de glucosa en el hígado, de esta manera la insulina actúa como primer regulador de los niveles de glucosa circulantes. Además, la insulina estimula el crecimiento y la diferenciación celular y permite el almacenamiento de sustratos energéticos en grasa, hígado y músculo por la estimulación de la lipogénesis, la síntesis de glucógeno y de proteínas y por la inhibición de la lipólisis y la glucogenólisis (174).

Para el cerebro, la glucosa es el principal sustrato energético, y es utilizado continuamente para una correcta actividad neuronal (130). Debido a lo anterior, las neuronas han desarrollado mecanismos de eficiencia energética (108) así como mecanismos específicos de captación de glucosa (131) para permitir un suministro adecuado en circunstancias de bajos niveles de glucosa en sangre.

Los receptores de insulina están presentes en todos los tejidos de los vertebrados, incluido el cerebro, y están relacionados con la vía de señalización que engloba la proteína quinasa B (PKB, también conocida como Akt) y la glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK3). En los tejidos que responden a la estimulación por insulina, ésta induce la activación de Akt y a su vez la inactivación de GSK3, en ambos casos incrementado su fosforilación (47). La activación de Akt se produce por fosforilación tanto de la treonina 308 (p-Thr308-Akt) como de la serina 473 (p-Ser473-Akt). La fosforilación en el residuo 308 se lleva a cabo por la proteína quinasa dependiente de fosfoinosítidos-1 (PDK1) y la del residuo 473 por una proteína quinasa no identificada, usualmente denominada PDK2 (110). Tejidos periféricos como el músculo de pacientes con diabetes y pacientes con resistencia a la insulina presentan desfosforilación de Akt y GSK3 (174, 196).

1.2 Mecanismos de acción de las hormonas tiroideas

1.2.1 Modulación de la expresión génica

La función principal de las HT es la modulación de la expresión génica por la unión de T3 a sus receptores nucleares específicos (TRs). En el interior de las células diana la T3 se concentra en el núcleo y tiene una afinidad por la unión a los TRs 10 veces mayor que la T4 (184).

Los TRs son factores de transcripción modulados por ligando que pertenecen a la superfamilia de receptores nucleares. Existen diferentes isoformas de TRs codificadas por dos genes distintos en ratones: *Thra* y *Thrb*. De todas ellas, las denominadas TR α 1, TR β 1, TR β 2 y TR β 3 son las isoformas a las que se puede unir la T3 intracelular para regular distintos procesos biológicos mediante el control transcripcional de los genes sensibles a T3 (48).

Los TRs se unen a secuencias específicas del ADN denominadas elementos de respuesta a hormona tiroidea (TREs) en los genes diana. Estas secuencias consisten en repeticiones de un hexámero consenso AGGTCA, dispuestas de forma palindrómica (Pal), palindrómica invertida (IP) o repeticiones directas (DR; (59). La unión de los TRs al TRE tiene lugar, principalmente, formando heterodímeros con el receptor del ácido 9 cis-retinoico (RXR; Figura 3), aunque también pueden homodimerizar (111).

Los TRs muestran diferente actividad en función de la presencia o ausencia de ligando. El mecanismo general del modo de acción de estos receptores se basa en que en ausencia de ligando, el heterodímero (RXR-TR) unido al ADN (TRE) interacciona con un conjunto de co-represores y complejos con actividad desacetilasa de histonas, dando lugar a una compactación de la cromatina que inhibe la transcripción del gen diana (86, 178). La unión de T3 a su receptor, desencadena en él un cambio conformacional que permite el desplazamiento de los co-represores y la unión de co-activadores que incluyen actividad acetilasa de histonas, dando lugar a la activación de la transcripción (81, 117). Este mecanismo de acción general de la regulación de la expresión génica por T3 es la denominada regulación positiva. Sin embargo, existen también casos de regulación negativa cuyo mecanismo es todavía poco conocido. En la regulación negativa, el TR en ausencia de ligando permite la transcripción basal del gen, mientras que la unión de T3 al TR induce la represión génica (192). Actualmente no han sido identificadas secuencias consenso ni requerimientos estructurales comunes para los TREs negativos.

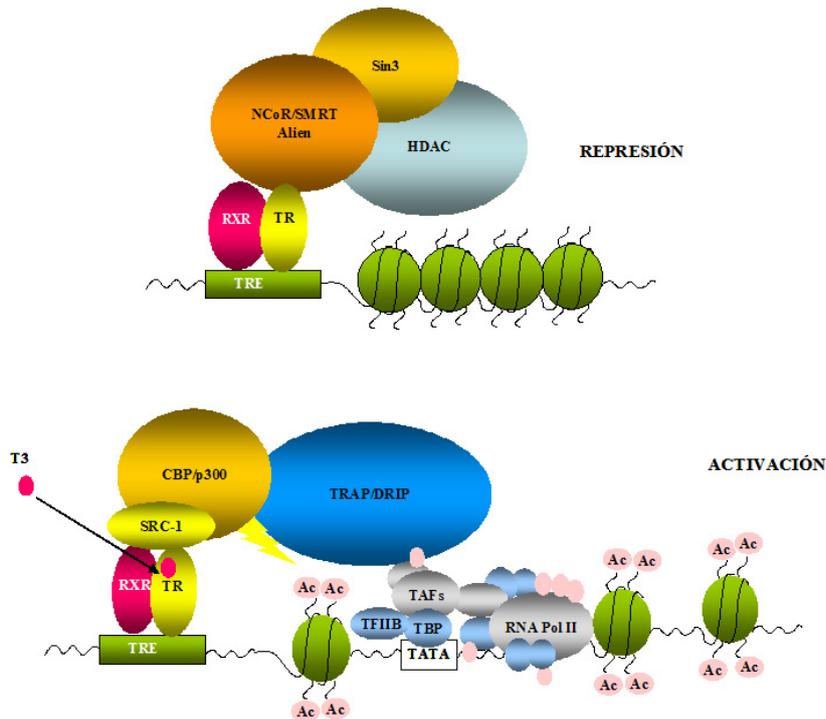


Figura 3. Modelo del mecanismo de acción general de la modulación de la expresión génica por T3. Los receptores de HT (TRs) se unen a los elementos de respuesta (TRES) heterodimerizando con el receptor de retinoides (RXR). En ausencia de hormona, el heterodímero TR-RXR se asocia con un complejo co-represor, lo que conduce a la desacetilación y compactación de la cromatina y a la represión de la transcripción. La unión de T3 al TR produce un cambio conformacional que induce la liberación de los co-represores y la unión de un complejo de co-activadores. Este complejo tiene capacidad acetilasa de histonas, lo que desestabiliza la cromatina y la hace más accesible. Además atrae y estabiliza a la ARN polimerasa II.

1.2.2 Mecanismos de acción extranucleares de las hormonas tiroideas

Las acciones nucleares de las HT tienen un tiempo de latencia largo (de horas a días). Sin embargo, se han descrito acciones mediadas por las HT que ocurren en un periodo de tiempo muy corto (pocos minutos; (202). Estas son las respuestas rápidas extranucleares, que son menos conocidas.

Estas acciones extranucleares pueden estar mediadas por receptores de membrana como la integrina $\alpha V \beta 3$, por isoformas de TRs citoplasmáticas y posiblemente también por receptores de membrana acoplados a proteínas G, señalizando a través de segundos mensajeros intracelulares. Se ha propuesto que las acciones extranucleares de la T4 y la T3 influyen sobre la transcripción génica de una manera indirecta a través de las cascadas de las proteínas quinasas activadas por mitógeno (MAPK), de STATs y PI3K, fosforilándose moléculas diana como los TRs y otros factores de transcripción (16, 48, 54).

A nivel mitocondrial, las HT ejercen acciones indirectas regulando la transcripción de genes nucleares cuyos productos modulan la expresión de genes mitocondriales. Del mismo modo también se han descrito acciones directas sobre la expresión del genoma mitocondrial y la fosforilación oxidativa. Muchas de estas acciones están mediadas por formas truncadas de los TRs nucleares que modulan la expresión del genoma mitocondrial actuando como factores de transcripción dependientes de ligando (200).

1.3 Acciones de las hormonas tiroideas en el sistema nervioso central: hipotiroidismo

Las acciones de las HT en el SN son aún más complejas que en otros órganos debido a la heterogeneidad regional y celular de este tejido. Clínica y experimentalmente se ha demostrado que la falta de HT durante el desarrollo causa anomalías estructurales y alteraciones neurológicas graves e irreversibles. Las HT también son necesarias en la fase adulta para el mantenimiento de la actividad y funcionalidad del SN, aunque sus acciones biológicas en el periodo adulto han sido menos estudiadas.

El hipotiroidismo está caracterizado por niveles insuficientes de T3 y T4 en sangre, y en el caso del hipotiroidismo primario por la elevación de la TSH plasmática.

1.3.1 El hipotiroidismo durante el desarrollo del sistema nervioso central

El papel fisiológico de las HT durante el periodo embrionario consiste en asegurar la coordinación temporal de diferentes eventos del desarrollo, modulando la expresión y actividad de proteínas específicas e influyendo en la diferenciación celular.

Estudios experimentales en los que se analizaba el efecto del hipotiroidismo durante el desarrollo han establecido que en la rata el periodo crítico para la deficiencia de las HT en el SN es el desarrollo embrionario tardío y el postnatal temprano (17). La deficiencia de HT durante periodos críticos del desarrollo provoca alteraciones moleculares y anatómicas en el cerebro en desarrollo que inducen anomalías neurológicas y neuropsicológicas irreversibles, como retraso mental, sordera y desórdenes neuromotores.

Las regiones más afectadas por la deficiencia de HT durante el desarrollo son la neocorteza, los ganglios basales, el cerebelo (CB), la formación hipocampal (HPC) y el giro dentado (GD). Todas estas regiones están implicadas en procesos de aprendizaje y memoria, así como en el control del movimiento, lo que explicaría muchas de las alteraciones funcionales debidas al hipotiroidismo.

1.3.2 El hipotiroidismo en el sistema nervioso adulto

Aunque las acciones de las HT en el SN adulto han sido menos estudiadas, en humanos también se han descrito importantes disfunciones mentales y psicológicas asociadas al hipotiroidismo (27, 197). El hipotiroidismo adulto provoca alteraciones de la memoria, el aprendizaje y la concentración, astenia psicomotora, modificación de los niveles de neurotransmisores y alteraciones del comportamiento (demencia, confusión, psicosis y cambios de personalidad) y del estado de ánimo (depresión, trastorno bipolar). En ocasiones tratamientos hormonales prolongados no son capaces de recuperar por completo estas alteraciones, lo que indica que no se puede excluir un leve deterioro persistente en los pacientes con hipotiroidismo adulto, aunque esto va a depender también del grado y tiempo de duración del hipotiroidismo (37, 57, 115, 162, 179).

2. LA FORMACIÓN HIPOCAMPAL

2.1 Estructura de la formación hipocampal

La HPC es una estructura límbica cortical que engloba el GD, el asta de Amón (*cornu Ammonis*, CA) o hipocampo propiamente dicho, el subículo, el presubículo, el parasubículo y la corteza entorrinal. La HPC está implicada en muchos procesos mentales, en particular en la memoria y en el aprendizaje. Presenta una gran plasticidad funcional y estructural y es una región diana de las HT tanto durante el desarrollo como en el adulto (71, 83, 119, 120, 136, 137, 160, 161).

2.1.1. Anatomía del hipocampo en el ratón adulto

La capa principal del hipocampo es la capa de células piramidales o CA. Esta capa agrupa los somas de las neuronas piramidales excitatorias y está formada por 4 regiones: CA3 y CA1 son las más importantes, CA2 es más pequeña y se sitúa entre ellas y por último CA4 está incluida en la capa polimórfica o hilio del GD. Estas regiones presentan diferencias en el tamaño celular y en el patrón de conectividad. Las neuronas de CA1 tienen somas más pequeños y están más empaquetadas. En CA1 y CA2, las neuronas piramidales carecen de las espinas dendríticas típicas de CA3 y de sus aferencias musgosas. Los otros estratos son el *lacunosum-moleculare* (continuación de la capa molecular de la corteza entorrinal), el *radiatum* (en el que se encuentran las dendritas apicales de las neuronas piramidales), el *lucidum* (sólo presente en CA3), el *oriens* (que contiene los axones de las neuronas

piramidales) y el álveo o *alveus* (en el que se reúnen los axones de las neuronas piramidales hacia la fimbria).

Las dendritas apicales de las neuronas piramidales de CA3 reciben las fibras musgosas y sus axones proyectan por un lado al álveo y por otro a las dendritas apicales de CA1 mediante las colaterales de Schaffer. Los axones de CA1 también se bifurcan y proyectan al álveo (hacia el hipotálamo) y al subículo. Las neuronas del subículo proyectan la información de vuelta a la corteza entorrinal.

En la capa piramidal y en el *stratum oriens* se encuentran la mayoría de las células en cesto y candelabro. Estas células son interneuronas inhibitorias GABAérgicas que están implicadas en la modulación de la actividad eferente en las neuronas piramidales. A diferencia de las capas de células piramidales, las otras capas del hipocampo contienen un número pequeño de neuronas. Estas neuronas tienen somas con diferentes morfologías y presentan distintos patrones de arborización dendrítica y axonal.

2.1.2. Anatomía del giro dentado en el ratón adulto

La capa celular principal del GD es la capa de células granulares, cuya disposición es en forma de V tumbada. El GD presenta una estructura similar a lo largo de todos los niveles de la HPC. Las células granulares se organizan en una lámina intermedia cuyas dendritas apicales se orientan hacia la capa superficial (molecular) y sus axones hacia la capa más profunda (hilio). La capa dorsal de las células granulares localizadas entre CA3 y CA1 se denomina capa suprapiramidal y la capa ventral situada en la zona opuesta se denomina infrapiramidal. La región que se encuentra conectando las dos capas se denomina cresta.

Las células granulares reciben aferencias de la corteza entorrinal o parahipocampal, que a su vez perforan el surco del hipocampo y conectan con las dendritas apicales de la capa molecular. Los axones de las células granulares abandonan el GD a través del hilio y de CA4 y se extienden hasta CA3 atravesando el *stratum lucidum*. Estos axones están altamente ramificados (fibras musgosas) formando sinapsis complejas con las espinas especiales, largas y muy ramificadas de las células piramidales de CA3.

En el borde interno de la capa granular también se localizan células en cesto, que son interneuronas GABAérgicas inhibitorias. Estas células presentan un axón muy ramificado y confinado a la capa granular y son capaces de inhibir simultáneamente un elevado número de células

granulares. En la capa molecular y en el hilio también se encuentran varios subtipos de interneuronas GABAérgicas.

2.1.3 Conexiones de la formación hipocampal

Las conexiones del hipocampo y el GD son principalmente unidireccionales y forman un bucle cerrado que se origina en la corteza entorrinal (Figura 4). Existen tres vías de aferencia principal: la primera es la vía perforante en la que los axones de la corteza entorrinal contactan con las células granulares del GD, con las piramidales de CA3 y también con neuronas piramidales de CA1 y del subículo; la segunda vía de entrada de información desde la corteza entorrinal es a través de la capa molecular del subículo, llegando a las dendritas apicales de CA3 y la tercera vía de entrada son las aferencias procedentes del septo, hipotálamo y tronco del encéfalo a través del fórnix que contactan con las dendritas basales de las neuronas piramidales de CA1.

En la corteza entorrinal se concentra la información aferente, procedente de las cortezas asociativas, y la información que devuelve la HPC. Tanto el hipocampo como el GD reciben además aferencias de la amígdala, tálamo, septo, hipotálamo y núcleos monoaminérgicos del tronco del encéfalo a través de la corteza entorrinal.

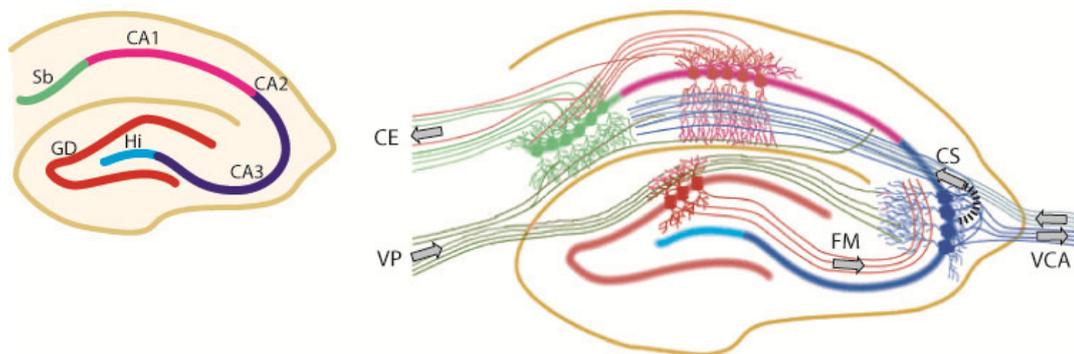


Figura 4. La formación hipocampal y sus conexiones. A la izquierda, esquema de las diferentes regiones: giro dentado (GD); hilio (Hi); CA1-CA3, regiones del hipocampo y subículo (Sb). A la derecha, esquema de las principales proyecciones de la formación del hipocampo: vía perforante (VP); fibras musgosas (FM); colaterales de Schaffer (CS); vía comisural asociativa (VCA) y corteza entorrinal (CE). Las flechas indican la direccionalidad de las conexiones.

2.2 Funciones de la formación hipocampal

2.2.1 Aprendizaje y memoria: Bases celulares y moleculares

Una de las cualidades más importantes del SN es que puede modificar su estructura y su dinámica como consecuencia de la experiencia. La plasticidad sináptica es la capacidad de las neuronas para modificar sus propiedades, así como sus patrones de conexión con otras neuronas. Existen varios mecanismos que cooperan entre sí para producir plasticidad sináptica, entre ellos cabe destacar, por un lado, los cambios en la cantidad de neurotransmisores que son liberados a la sinapsis y, por otro, el modo en que las células responden a estos neurotransmisores (73). La sinapsis no puede ser considerada como una estructura rígida sino que sufre variaciones como consecuencia de los diferentes patrones de actividad cerebral. En muchas sinapsis una actividad repetitiva puede desencadenar no sólo alteraciones a corto plazo, sino que puede producir modificaciones duraderas e incluso éstas pueden llegar a ser permanentes. El principal fenómeno asociado a estos cambios es la potenciación a largo plazo (LTP, del inglés Long Term Potentiation). La LTP se expresa como un aumento persistente de la transmisión sináptica tras estimular una vía aferente con pulsos de corriente de alta frecuencia (HFS, del inglés High Frequency Stimulation) produciendo una potenciación de la fuerza sináptica que puede durar desde horas hasta días (24). Actualmente está aceptado que en el hipocampo la LTP es sólo una de las formas de plasticidad sináptica duradera que existen en diferentes circuitos neuronales del cerebro de los mamíferos. Se pueden diferenciar dos tipos de LTP, una temprana (E-LTP, en inglés early-LTP) que se produce hasta las 3 horas de haberse aplicado la HFS y una tardía (L-LTP, en inglés late-LTP) que es la que se produce a partir de las 3 horas desde la HFS. La L-LTP es un fenómeno que depende de la activación coordinada de receptores glutamatergicos y dopaminérgicos y que requiere de la síntesis de proteínas. La E-LTP, cuya inducción depende únicamente de receptores ácido N-metil-D-aspartico (NMDA), se diferencia de la L-LTP por la ausencia de síntesis de proteínas y por el tiempo de duración de la potenciación.

Está bien establecido que las proteínas quinasas son esenciales como intermediarios entre la inducción y/o el mantenimiento de la LTP. La E-LTP principalmente depende de la fosforilación de la calmodulina quinasa dependiente de Ca^{2+} de tipo 2 (CaMKII; (123), pero la L-LTP, como se refleja anteriormente, requiere de nueva síntesis de proteínas a través de la activación de factores de transcripción inducidos por quinasas, como la proteína de unión al elemento de respuesta a AMP-cíclico (CREB). Estas quinasas incluyen a la proteína quinasa A (PKA) (1), a la MAPK (28) y a la calmodulina quinasa dependiente de Ca^{2+} de tipo IV (CaMKIV; (23). La activación neuronal tras la HFS produce un aumento de Ca^{2+} intracelular activándose la CaMKIV y la adenilato ciclasa que a su vez activa la PKA, generándose la señal de activación de la ruta de las MAPKs (ERK1/2) que fosforilarán CREB, factor de transcripción esencial para la L-LTP (101). Se ha demostrado que el

hipotiroidismo adulto reduce los niveles de LTP así como los niveles de las proteínas CREB y ERK1/2 en la región CA1 del hipocampo y en el GD (71, 80).

Se ha encontrado que la mayoría de las sinapsis que exhiben LTP también muestran depresión duradera (LTD, de sus siglas en inglés, Long Term Depression). Este otro fenómeno causa una disminución en la fuerza sináptica tras la estimulación repetida con impulsos de baja frecuencia (LFS, del inglés Low Frequency Stimulation). La LTD es un fenómeno postsináptico, pues se debe a cambios de densidad, de localización y de propiedades cinéticas del canal ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propiónico (AMPA) por el nivel de fosforilación del receptor. Esta forma de plasticidad es dependiente de los receptores NMDA, de receptores de glutamato metabotrópicos y se induce con una mayor facilidad en etapas juveniles (9, 63, 104, 114). Se ha demostrado que el hipotiroidismo adulto facilita y potencia la LTD en la región CA1 del hipocampo (3).

2.2.2 Implicaciones de las hormonas tiroideas en la plasticidad del hipocampo

El hipotiroidismo, tanto durante el desarrollo (167, 168) como en el adulto (37, 57, 115, 162, 179), produce un gran rango de alteraciones relacionadas con la funcionalidad de la formación HPC entre las que se incluyen alteraciones en el aprendizaje y la memoria.

El tratamiento de reemplazo con T4 mejora la memoria en los pacientes con hipotiroidismo subclínico (100, 138, 150). Sin embargo, otros estudios clínicos presentan resultados más variables y cuestionan si la terapia de reemplazo hormonal restaura completamente el daño producido en el aprendizaje y la memoria por el hipotiroidismo (37, 115, 132, 175).

En ratas adultas tiroidectomizadas se ha descrito un daño grave tanto en el aprendizaje como en la memoria a corto y largo plazo (4, 5, 71, 78, 80). Estudios en ratas tiroidectomizadas han demostrado un incorrecto aprendizaje espacial (medido con la prueba del laberinto acuático de brazos radiales de Morris), una reducción de los niveles de LTP así como de los niveles de las proteínas (medidas por western blot) CREB y ERK1/2 en la región CA1 del hipocampo y una recuperación de todas estas alteraciones con un tratamiento con T4 (5, 80). Por último en un estudio reciente en ratas tiroidectomizadas adultas despiertas se ha descrito una deficiencia en el reforzamiento sináptico durante el aprendizaje asociativo en la sinapsis vía perforante-GD, así como una incorrecta inducción de la LTP. Ninguna de estas alteraciones se recuperó con un tratamiento prolongado con HT (71).

La generación de nuevas neuronas en el cerebro adulto representa un mecanismo más de plasticidad que se ha demostrado que ocurre también en humanos (64, 176). En condiciones fisiológicas normales, la presencia de células madre con linaje neuronal en el cerebro adulto se

restringe a la zona subventricular (ZSV) adyacente a los ventrículos laterales y a la zona subgranular (ZSG) del GD (2).

En la ZSG se generan neuroblastos que migran tan sólo unas micras hasta integrarse en la capa granular del GD donde extienden procesos y se diferencian a neuronas granulares. Se ha estimado que en condiciones fisiológicas normales alrededor del 50 % de las nuevas células generadas mueren durante el primer mes y que posteriormente se reduce considerablemente la tasa de muerte celular (55). Se piensa que finalmente sólo sobreviven aquellas células que son capaces de establecer contactos sinápticos funcionales con otras neuronas, del mismo modo que sucede en el desarrollo (31). De hecho se ha descrito que las nuevas neuronas se integran en circuitos neuronales y maduran como neuronas funcionales (50). Se ha propuesto que las nuevas neuronas generadas permitirían optimizar las conexiones entre el GD y CA3 en la HPC (103). La función de las nuevas neuronas granulares es actualmente un tema de gran interés ya que estudios con animales de experimentación han relacionado funcionalmente la neurogénesis en la ZSG con algunos procesos de aprendizaje y memoria y con el mantenimiento del estado de ánimo (181).

En la ZSG el hipotiroidismo adulto reduce sustancialmente la tasa proliferativa celular y la cantidad de neuroblastos inmaduros que se generan. Además, estas alteraciones en la neurogénesis se correlacionan con una tendencia a un comportamiento de tipo depresivo y se revierten con un tratamiento prolongado hormonal (137).

3. MEMORIA EMOCIONAL: CONDICIONAMIENTO DEL MIEDO

El miedo es la reacción física, fisiológica o psicológica a la percepción de un peligro. Con el fin de comprender la implicación del miedo en el cerebro se han realizado infinidad de estudios clásicos Pavlovianos de condicionamiento del miedo (68, 107, 112, 113, 124, 125, 153, 164).

Los estudios clásicos Pavlovianos de condicionamiento del miedo están compuestos por un estímulo condicionado (EC), como puede ser la presencia de un tono o de un contexto, y un estímulo aversivo no condicionado (ENC), como puede ser una descarga eléctrica. Después de repetir una o varias veces la asociación del EC con el ENC se producen una serie de respuestas defensivas de comportamiento entre las que se puede destacar la inmovilización del animal (en inglés freezing) en la que sólo se perciben los movimientos respiratorios en respuesta al estímulo aversivo. También hay un aumento de la secreción de norepinefrina y glucocorticoides periféricos. En los vertebrados, el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA) y el eje simpático-médulo-adrenal (SMA) son los principales sistemas fisiológicos implicados en la respuesta a un estímulo aversivo. La activación del eje HHA

desencadena un aumento de los niveles plasmáticos de corticotropina u hormona estimulante de la corteza suprarrenal (ACTH) y de glucocorticoides (cortisol en la mayoría de los mamíferos y corticosterona en roedores). Así mismo la activación del eje SMA produce un aumento de los niveles plasmáticos de catecolaminas (noradrenalina y adrenalina).

3.1 Regulación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal

Las neuronas del núcleo paraventricular del hipotálamo sintetizan la hormona liberadora de corticotropina (CRH). Las neuronas CRHérgicas hipofisiotrópicas envían sus proyecciones a la eminencia media en donde, en respuesta a un estímulo, se produce la liberación de CRH a la circulación portal llegando así a la hipófisis que a su vez controla la síntesis y liberación de ACTH. La ACTH a través de la circulación sanguínea llega a la glándula adrenal estimulando la liberación de glucocorticoides que proporcionan la energía necesaria a los músculos para efectuar una respuesta. El eje HHA está regulado por un mecanismo de retroalimentación negativa a tres niveles: la HPC, el núcleo paraventricular del hipotálamo y la hipófisis, siendo la actividad del eje HHA inhibida por los propios glucocorticoides (Figura 5). Sin embargo, otras áreas cerebrales, como la amígdala, también pueden controlar la actividad del eje HHA ante la respuesta a un estímulo aversivo (70).

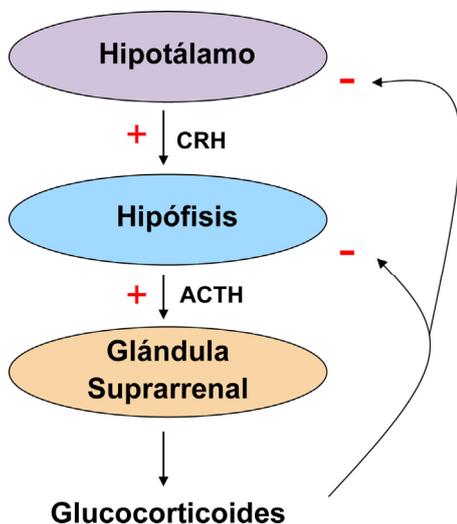


Figura 5. Esquema del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA). En el hipotálamo se sintetiza y secreta la CRH que a su vez estimula la hipófisis. La hipófisis controla la síntesis y secreción de la ACTH. La ACTH estimula la glándula adrenal facilitando la liberación de glucocorticoides. El eje HHA está regulado por un mecanismo de retroalimentación negativa donde los glucocorticoides inhiben la actividad del eje

3.2 Anatomía y funciones dependientes de la amígdala

La amígdala ocupa una posición central en la generación de las respuestas condicionadas, recibe la información del tálamo y la corteza cerebral en respuesta a los estímulos sensoriales y controla las respuestas neuroendocrinas del hipotálamo y las respuestas de comportamiento (inmovilización o freezing) a través de la sustancia gris periacueductal.

La amígdala está formada por una gran heterogeneidad de núcleos que se diferencian por los tipos celulares, la densidad celular, la composición neuroquímica y la conectividad (112, 157, 185). El núcleo lateral se caracteriza por ser la vía sensorial de la amígdala dado que recibe información auditiva, visual, olfatoria, gustativa y somatosensorial (incluyendo el dolor) desde el tálamo y la corteza. La vía tálamo-amígdala transmite muy rápidamente la información obtenida del estímulo sin que ésta se filtre mediante un control consciente. Sin embargo, la vía cortico-amígdala regula de un modo más lento, pero a la vez más detallado y preciso, la información sensorial. El núcleo central es la principal región eferente de la amígdala. Su función es controlar la reacción al miedo y la respuesta endocrina mediante la estimulación del hipotálamo y los núcleos dorsales motores del nervio vago (69, 107, 112, 113, 124, 125, 153, 164).

En la amígdala también se producen procesos de plasticidad localizados fundamentalmente en el núcleo lateral, aunque en menor grado también se pueden localizar en el núcleo central (153, 198).

3.3 Implicaciones de las hormonas tiroideas en procesos de aprendizaje y memoria emocional

La implicación de las HT en procesos de aprendizaje y memoria emocional es, a día de hoy, un campo científico poco estudiado. Desde la década de los 90 está bien establecido que las regiones límbicas asociadas a procesos cognitivos y respuestas emocionales son muy sensibles a alteraciones hormonales. La amígdala presenta altos niveles de expresión de D2 (14) y de TRs (29, 159) lo que indicaría que es una importante región diana de las HT.

Estudios en ratas adultas tiroidectomizadas han demostrado que el hipotiroidismo adulto no afecta al proceso de aprendizaje durante el condicionamiento al miedo. Sin embargo, se ha visto que la memoria del miedo condicionado y su recuperación espontánea se encuentran potenciadas y la extinción al miedo se encuentra disminuida (136). Se ha propuesto que en el hipotiroidismo la potenciación de la memoria emocional se debe tanto a una mayor expresión de los receptores de glucocorticoides (GR) y mineralocorticoides (MR) en los núcleos lateral y basolateral de la amígdala como a un incremento en la liberación de corticosterona en respuesta al estímulo aversivo (136).



OBJETIVOS

El objetivo general de esta tesis ha sido obtener un mayor conocimiento del papel de la D2 como moduladora de la generación y disponibilidad local de T3 en los tejidos, especialmente en el SN.

La hipótesis que planteamos es que la producción local de T3 por acción de la D2 debe ser importante para la función y la plasticidad del SN.

Para conseguir este objetivo nos hemos planteado caracterizar en el adulto distintos aspectos relacionados con fenotipos neurológicos y metabólicos debidos a la deficiencia de D2 utilizando ratones normales y deficientes para la D2 como modelo experimental.

Como objetivos concretos nos planteamos:

- Estudiar la influencia de la D2 en los niveles de hormonas tiroideas, así como la actividad de desyodasa 1 en distintas regiones del SNC.

- Estudiar la influencia de la D2 en el metabolismo de la glucosa.

- Evaluar la importancia de la generación local de T3 en distintas pruebas neurosensoriales y sensoriomotoras.

- Estudiar la importancia de la generación local de T3 en pruebas de aprendizaje, memoria espacial y memoria emocional.

- Estudiar la implicación de la D2 en procesos de plasticidad sináptica entre las fibras colaterales de Schaffer y las neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo.

MATERIALES Y MÉTODOS



1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Se utilizaron ratones con un fondo genético homogéneo C57/BL6J. Los animales fueron criados en el animalario del Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols” de Madrid. Se estabularon en habitaciones con una temperatura controlada (22-24 °C), ciclos alternativos de luz y oscuridad de 12 h y con libre acceso a comida y a bebida. Los animales se sometieron a control veterinario siguiendo las directivas de la Unión Europea (86/609/CEE y 2010/63/UE) según procedimientos aprobados por el comité ético de la institución.

1.1 Obtención de los ratones $Dio2^{-/-}$

El ratón $Dio2^{-/-}$ fue generado en el laboratorio de la Dra. Valerie Galton (180) y la delección del gen *Dio2* se generó por recombinación homóloga sustituyendo un segmento de 2,6 kb del gen *Dio2* por el gen *Neo*. El genotipo de cada animal fue confirmado mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir de ADN extraído de la cola en el momento del sacrificio. El ADN se extrajo de 2-3 mm de cola mediante incubación en una solución de lisis conteniendo 100 µg/ml de Proteinasa K (Roche) durante 1 h a 55 °C en agitación.

Se utilizaron los siguientes cebadores: iniciador común (5'-GTTTAGTCATGGAAGCAGCACTATG-3'); reverso específico para el mutante (5'-CGTGGGATCATTGTTTTCTCTTG-3'); y reverso específico para $Dio2^{+/+}$ (wt; 5'-CATGGCGTTAGCCAAAACATC-3') en una reacción de 40 ciclos (95 °C, 15 s; 62 °C, 15 s; 72 °C, 15 s). Este proceso genera un fragmento amplificado de 400 pares de bases para el alelo wt y de 450 pares de bases para el alelo mutado. Los fragmentos amplificados por PCR se identificaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 2 % teñidos con Sybr Safe (Invitrogen).

1.2 Grupos experimentales y tratamientos hormonales

Para la realización de los experimentos de esta tesis doctoral se utilizaron ratones macho adultos de 3 y 6 meses wt, $Dio2^{-/-}$ y $Dio2^{-/-}$ sin y con tratamiento hormonal ($Dio2^{-/-}$ + HT).

El tratamiento hormonal consistió en la administración, en el agua de bebida, de una mezcla de HT para conseguir una dosis fisiológica diaria de T4 (20 ng de T4 por g de peso corporal al día; Sigma-Aldrich) y una dosis 3 veces superior a la fisiológica de T3 (9 ng de T3 por g de peso corporal al día; Sigma-Aldrich). Las dosis fisiológicas hacen referencia a la producción total diaria de cada

hormona (66). Las HT se administraron en el agua de bebida con albúmina sérica bovina (BSA; Sigma-Aldrich) al 0,01 % en los 10 días previos y durante la realización de los experimentos. La solución se preparó diariamente y se protegió de la luz para evitar la degradación de las HT. La concentración hormonal en el agua de bebida se calculó en base al volumen de agua ingerido por los animales los 4 días previos al tratamiento y en base al peso corporal de los animales.

El diseño de este tratamiento hormonal se ha basado en estudios previos (66, 180) y en resultados de esta tesis en los que se han determinado los niveles de T3 y T4 en ratones wt y $Dio2^{-/-}$ de 3 meses de edad (ver apartado 1.2 de resultados). El objetivo de este tratamiento fue recuperar los niveles de T3 intracerebrales en los animales $Dio2^{-/-}$ sin modificar los niveles plasmáticos de T4. Por ello, para evitar la hipotiroxinemia que se induce tras la administración de altas dosis de T3 se administró, junto con la T3, una dosis fisiológica de T4.

1.3 Sacrificio y obtención de tejido en fresco

Los ratones se sacrificaron por dislocación cervical. Se extrajo el encéfalo del cráneo y se aislaron las distintas regiones cerebrales de estudio: CB, HPC, núcleo estriado (EST) y corteza cerebral (CTX). También se diseccionaron hígado y músculo (cuádriceps femoral) de la pata. Todos los tejidos fueron inmediatamente congelados en nieve carbónica y almacenados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para el análisis de la expresión de proteínas por western blot y para la determinación de las concentraciones de HT por radioinmunoanálisis (RIA).

1.4 Obtención de sangre y plasma

Muestras de sangre procedente de la vena mandibular o de las venas laterales de la cola se recogieron en tubos heparinizados (Sarstedt). La sangre heparinizada se centrifugó a 1000 g durante 20 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ y el plasma obtenido como sobrenadante se congeló para ser usado en la determinación de los niveles de HT y corticosterona.

2. TÉCNICAS BIOQUÍMICAS

2.1 Determinación de las concentraciones de hormonas tiroideas

Las medidas de las concentraciones de T3 y T4 en plasma y tejidos se realizaron en colaboración con la Prof. María Jesús Obregón y la Dra. Ana Montero del Instituto de Investigaciones Biomédicas.

2.1.1 Síntesis de trazadores (T3 y T4 marcadas radiactivamente)

Se sintetizaron T3 y T4 radiactivas de muy alta actividad específica (3000-1500 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$) con [^{125}I] para su utilización en los ensayos posteriores de RIA. También se sintetizaron HT radiactivas para utilizarlas como trazadores internos para poder estimar el porcentaje de recuperación de T3 y T4 en el proceso de extracción. En este caso la T3 se sintetizó con [^{125}I] y la T4 con [^{131}I] para poder distinguirlas. La T4 marcada se sintetizó a partir de T3 y la T3 a partir de 3,5-T2, siguiendo el método descrito por Weeke y Orskov (194). El yoduro radiactivo utilizado se oxidó a yodo naciente mediante cloramina T y se incorporó en la posición 5' ó 3' del grupo fenilo del sustrato. Los productos del marcaje se separaron por cromatografía en papel con butanol-metanol-amoniaco (146).

2.1.2 Extracción de hormonas tiroideas de plasma

Para la extracción y purificación de HT del plasma se siguió el protocolo descrito por Gordon y cols. (82) modificado por Morreale de Escobar y cols. (140). A las muestras de plasma se les añadió 2000 cpm de [^{131}I]-T4 y 2000 cpm de [^{125}I]-T3 como trazadores internos y se extrajeron con metanol-cloroformo (1:2) en Cl_2Ca al 0,05 %. La purificación de las HT de los extractos obtenidos se realizó por cromatografía de intercambio iónico en columnas de resina Dowex 50W-X2 (Bio-Rad) y posterior elución con ácido acético al 70 %. La radiactividad de la fracción resultante se cuantificó con un contador gamma para calcular la recuperación individual de cada hormona en cada una de las muestras analizadas. Posteriormente la fracción resultante se sometió a evaporación y se resuspendió en tampón de RIA (tampón fosfato 0,04 M pH8 con BSA al 0,2 % y mertiolato 0,6 mM). Este extracto se guardó congelado hasta su análisis posterior mediante RIA.

2.1.3 Determinación de T3 y T4 en extractos de plasma y tejido (RIA)

Para la realización del RIA de T3 y T4 se utilizó el método de Weeke y Orskov (195) modificado para tejido de rata y ratón (139, 140, 146), usando anticuerpos específicos (169).

Cada muestra se ensayó por duplicado y a dos diluciones diferentes, añadiendo a cada ensayo 100 µl de tampón de RIA con 6000 cpm de [¹²⁵I]-T4 ó [¹²⁵I]-T3 y 100 µl del antisuero específico (en una dilución 1/300.000 para T4 y 1/150.000 para T3). Después de 12-24 h de incubación se añadieron 1,5 ml de tampón de RIA con 90 mg de polietilenglicol 6000 y 45 µl de suero bovino. Los complejos antígeno-anticuerpo se precipitaron por centrifugación y se contó la radiactividad del precipitado.

En cada ensayo se prepararon curvas patrón de T4 y T3. La curva patrón del RIA de T4 cubrió el rango de 2,5 a 320 pg, siendo el límite de detección de 2,5 pg/tubo. La curva patrón del RIA de T3 cubrió el rango de 1,5 a 100 pg, siendo el límite de detección de 1,5 pg/tubo. Las concentraciones de cada hormona en la muestra inicial se calcularon teniendo en cuenta el peso de la muestra original homogeneizada, la recuperación de los trazadores durante el proceso de extracción y el volumen de cada alícuota, y se expresaron en ng por ml de plasma o en ng por mg de tejido.

2.2 Determinación de la actividad de la D2 y D1 en tejido cerebral

La medición de la actividad de la D1 y D2 en tejido cerebral se realizó en colaboración con la Prof. María Jesús Obregón y la Dra. Ana Montero del Instituto de Investigaciones Biomédicas.

2.2.1 Homogeneización del tejido

Se estudiaron 3 regiones cerebrales (CB, CTX y HPC) procedentes de ratones wt y ratones Dio2^{-/-} de 3 meses de edad. Los tejidos fueron homogeneizados en 1 ml de tampón de homogeneización conteniendo sacarosa (0,32 M), ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfónico (HEPES; 10 mM) a pH=7 y ditioneitol (DTT; 10 mM).

2.2.2 Medición de la actividad de la D2 y D1

Antes de la realización del ensayo, se sintetizó [¹²⁵I]-rT3 (rT3) y [¹²⁵I]-T4 y se purificaron para eliminar el [¹²⁵I]-Yoduro contaminante. Esta purificación se realizó por electroforesis en tiras de 2 cm de papel Whatmann 3MM durante 5 minutos a 400 V, usando como solvente acetato amónico (50 mM), pH 6,8. El yoduro migra unos 3-4 cm, mientras que la [¹²⁵I]-rT3 (rT3) y la [¹²⁵I]-T4 permanecen en el origen de aplicación de donde se eluyeron usando NaOH (0,04 N). Este proceso permite la recuperación de aproximadamente el 50 % de la yodotironina marcada y libre de yoduro (menos del 1 % de la radiactividad proviene del yoduro residual).

La determinación de la actividad de la D2 se realizó según el método de Leonard (116) con modificaciones adaptadas en el laboratorio de la Prof. María Jesús Obregón (94).

La actividad de la D2 se midió en un volumen final de 100 μ l que contenía: 50 μ l del homogeneizado de cada una de las regiones cerebrales, 100.000 cpm [125 I]-T4 y T4 (2 nM) como sustrato, T3 (1 μ M) para inhibir la desyodación de la T4 en posición 5 (en el anillo interno por acción de la D3), tampón fosfato (100 mM; pH 7), ácido etilendiamino-tetracético (EDTA; 1 mM) y 6-propil-2-tiouracil (PTU; 1 mM) para inhibir la actividad 5' D1 y DTT (50 mM). Tras una incubación de 1 hora a 37 °C se paró la reacción añadiendo 50 μ l de una mezcla (1:1) de suero de ternera con PTU (10 mM) y luego se añadieron 350 μ l de ácido tricloroacético (TCA) al 10 %, precipitando las proteínas por centrifugación (1000 g, 30 min a 4 °C).

La separación del yoduro y de la yodotironina residual (no precipitada con el suero y el TCA) se realizó por cromatografía de intercambio iónico. Esto se realizó pasando 400 μ l del sobrenadante anterior por columnas rellenas de Dowex 50W-X2 (Bio-Rad) equilibradas con ácido acético al 10 % y eluyendo con 2 ml del mismo ácido. Se contó la radioactividad [125 I]-yoduro y la actividad enzimática se obtuvo restando al valor de cada muestra la desyodación no enzimática. Ésta se estimó incubando el blanco con la solución de homogeneización (sin tejido) y calculando el porcentaje de [125 I]-T4 desyodada como fracción de los 200 femtomoles usados por hora y mg de proteína.

La concentración de proteína de las muestras se determinó por el método de Lowry (118) precipitando los homogeneizados tisulares con TCA al 10 % para evitar la interferencia colorimétrica del DTT en el ensayo.

La actividad de la D1 se midió también en un volumen final de 100 μ l que contenía 50 μ l del homogeneizado de cada una de las regiones cerebrales, 100.000 cpm [125 I]-rT3 (rT3) y rT3 (2 nM) como sustrato, tampón fosfato (100 mM) pH 7, EDTA (1 mM) y DTT (50 mM). El ensayo se realizó por cuadruplicado, añadiendo PTU (1 mM) a la mitad de las muestras para inhibir la actividad 5'D1 y obtener la medida de actividad de la D2 y sin PTU en la otra mitad de las muestras para obtener el valor de actividad 5'D total. La actividad de la D1 se calculó como la diferencia entre la actividad 5'D total y la actividad D2. El proceso experimental para la determinación de la actividad de la D1 se realizó siguiendo el protocolo descrito para la D2. Tanto los resultados de la actividad de la D2 como los de la D1 se expresan como femtomoles de yoduro formado en una hora por mg de proteína (fmol/h·mg de proteína).

2.3 Determinación de los niveles de glucosa en sangre

Los niveles de glucosa en sangre en ratones wt y Dio2^{-/-} de 3 meses de edad se determinaron mediante el uso de tiras reactivas de glucosa (One Touch Ultra, Lifescan) y un glucómetro (One Touch Ultra, Lifescan), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se realizó una pequeña incisión en el tercio final de la cola del animal y se obtuvo una gota de sangre que se aplicó directamente sobre la tira reactiva previamente introducida en el glucómetro. En todos los casos los niveles de glucosa en sangre se midieron a las 10:00 h en condiciones de ayuno y en condiciones de alimentación.

2.3.1 Test de tolerancia a la glucosa

El test de tolerancia a la glucosa (GTT) se realizó en ratones wt y Dio2^{-/-} de 3 meses de edad. Para ello se administró a cada animal, vía intraperitoneal (i.p.), 2 g/kg de peso corporal de D-Glucosa (Sigma-Aldrich) tras un periodo de 24 h en ayuno. Los niveles de glucosa en sangre se midieron a 0, 5, 10, 15, 30, 60, 90, 120 y 180 min desde la administración de D-Glucosa.

2.3.2 Test de tolerancia a la insulina

El test de tolerancia a la insulina (ITT) se realizó en ratones wt y Dio2^{-/-} de 3 meses de edad. Tras un periodo de 4 h en ayuno se inyectó a cada animal vía i.p. 0,75 U o 0,23 U de insulina/kg de peso corporal, dependiendo del experimento. Los niveles de glucosa en sangre se midieron a 0, 30, 60 y 90 min en el primer caso y a 0, 15, 30, 60, 90 y 120 min en el segundo caso desde la administración de la insulina.

2.4 Determinación de la concentración de corticosterona en plasma

Los niveles de corticosterona plasmática se determinaron mediante un ensayo en fase sólida por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) con un kit comercial (Corticosterone ELISA, Demeditec) siguiendo las instrucciones del fabricante. Este kit viene dispensado en una placa de 96 pocillos con el anticuerpo policlonal específico de corticosterona. En cada pocillo se incubaron 20 µl de plasma (diluído 1:20 en solución estándar de 0 ng/ml de corticosterona) y 200 µl del conjugado enzimático del kit (corticosterona conjugada con peroxidasa de rábano picante) durante 60 min en agitación. La corticosterona endógena de la muestra compite con la corticosterona del conjugado enzimático para su unión al anticuerpo específico. Tras realizar 3 lavados para eliminar los conjugados que no se han unido al anticuerpo, se añadió a cada pocillo 100 µl de solución sustrato de la peroxidasa y se incubó

durante 15 min, tras los cuales se paró la reacción. Por último, sin sobrepasar los 10 min posteriores a la parada de la reacción, se procedió a la lectura de la absorbancia en el lector de micro-placas (Biogen) a una longitud de onda de 450 nm con el programa informático DigiWin 3.0. La curva patrón del ELISA cubrió el rango de 0 a 84 ng/ml de corticosterona, siendo el límite de detección de la técnica de 0,56 ng/ml de corticosterona.

2.5 Detección de la fosforilación de *Akt* mediante western blot

Se obtuvieron extractos de proteína de las diferentes regiones diseccionadas del cerebro en fresco así como de hígado y músculo (ver apartado 1.3 de Materiales y Métodos) de animales wt y *Dio2^{-/-}* de 3 meses de edad inyectados con insulina (0,75 U/kg de peso corporal) o suero salino. Para la extracción de proteínas las muestras se homogeneizaron a 4 °C en tampon de lisis RIPA (Hepes 50 mM pH 7,4; NaF 100 mM pH 7,4; EGTA 1 mM pH 8; tritón 1 %; NaCl 150 mM; MgCl₂ 1,5 mM; glicerol 10 %; deoxicolato sódico (DOC) 1 %; dodecil sulfato sódico (SDS) 0,1 %), conteniendo inhibidores de proteasas (Sigma-Aldrich) usando un homogeneizador de tejidos (Polytron System PT 1200 E, Kinematica AG). La concentración de proteína total se cuantificó por el método de BCA (Pierce) utilizando como patrón BSA.

Las proteínas (30 µg por muestra) se separaron mediante electroforesis utilizando geles de poliacrilamida al 10 % bajo condiciones desnaturalizantes (SDS) y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Protran, Whatman, Dassel). Las membranas se bloquearon en TBS (Tris-HCl 20 mM pH 7,5; NaCl 150 mM;) con un 5 % de leche en polvo (Fluka) durante 1 h a temperatura ambiente. Seguidamente se incubaron con el anticuerpo primario en T-TBS (Tris-HCl 20 mM pH 7,5; NaCl 150 mM; Tween-20 0,1 %) durante toda la noche en una noria a 4 °C. Tras realizar los lavados de las membranas utilizando T-TBS éstas se incubaron con el anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa en T-TBS durante 1 h a temperatura ambiente. La detección de los inmunocomplejos se realizó mediante el sistema de quimioluminiscencia ECL (Amersham, GE Healthcare) siguiendo las indicaciones del fabricante.

Para cuantificar la fosforilación de Akt en las muestras de hígado y músculo se utilizó un anticuerpo específico de Akt fosforialdo en la serina 473 (p-Akt-Ser473; SC-7985-R, Santa Cruz Biotechnology) mientras que para las muestras de CTX, HPC y EST se utilizó un anticuerpo específico de Akt fosforilado en la treonina 308 (p-Akt-Thr308; SC-16646-R, Santa Cruz Biotechnology). Para realizar el control de carga en las muestras de hígado y cerebro se utilizó un anticuerpo específico de β-actina (ab6276, Abcam) y en las muestras de músculo un anticuerpo específico de PI3K (p85; 4292, Cell Signaling).

2.5.1 Análisis de la fosforilación de Akt

La expresión de p-Akt se cuantificó por densitometría utilizando el programa Image J 1.410. Se cuantificó la intensidad de las bandas específicas obtenidas y los valores obtenidos se normalizaron con el control de carga utilizado en cada uno de los experimentos.

3. EVALUACIÓN NEUROSENSORIAL Y SENSORIOMOTORA

3.1 Estudio de los potenciales auditivos evocados del tronco cerebral

Se analizó la respuesta auditiva de ratones wt y $Dio2^{-/-}$ de 6 meses de edad en el servicio de Evaluación Neurofuncional No Invasiva (ENNI) del Instituto de Investigaciones Biomédicas.

Los ratones fueron anestesiados vía i.p. con una mezcla de ketamina (75 mg/kg peso corporal; Imalgene, Merial) y xilacina (5 mg/kg peso corporal; Rompun, Bayer). El estudio audiológico mediante potenciales evocados auditivos de tronco cerebral (PEATC, en inglés Auditory Brainstem Response, ABR) se llevó a cabo en una cámara insonorizada. Para analizar la respuesta auditiva se usó un sistema de estimulación y registro multifuncional TDT system 3 (Tucker-Davis Technologies, Alachua, FL, EUA). Los electrodos de acero inoxidable se colocaron en el vértex y en la parte ventrolateral de los oídos. Se realizaron dos tipos de estudios: la determinación de los PEATC tras exposición a “click” a una velocidad de 30 pulsos por segundo y la determinación de los PEATC tras exposición a tonos puros de 1, 2 y 8 kHz, a una velocidad de 50 pulsos por segundo. El “click” es un estímulo auditivo inespecífico compuesto por el espectro de frecuencias audibles que activa todas las neuronas cocleares mientras que el tono puro es un estímulo auditivo formado por una frecuencia específica (y sus armónicos) que estimula una región concreta del órgano de Corti. En el primer caso, los resultados se utilizaron para determinar el umbral auditivo, las latencias pico de las ondas I (cóclea), II (núcleo coclear), III (oliva superior), IV (lemnisco lateral) y V (colículo inferior lateral) y las amplitudes de las ondas o picos PEATC (Figura 6) (40). En el segundo caso, los resultados se utilizaron para configurar el audiograma a frecuencias bajas y establecer la frecuencia más adecuada para la realización de la prueba de condicionamiento del miedo que requiere un estímulo sonoro para su desarrollo (ver apartado 4.1.1 de Materiales y Métodos).

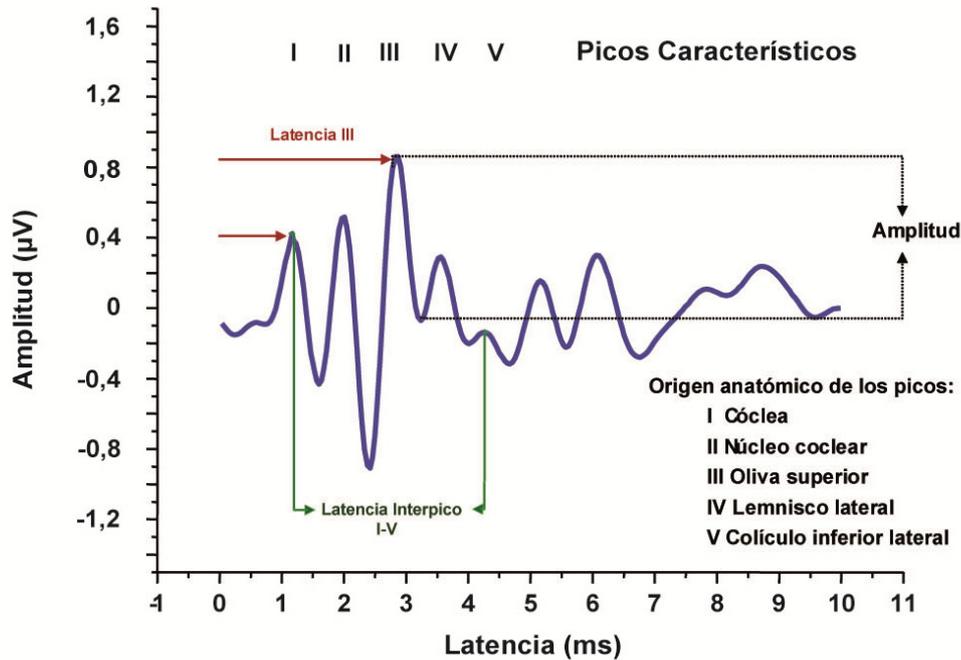


Figura 6. Potenciales auditivos evocados del tronco cerebral (PEATC). Ejemplo esquemático de una gráfica de potencial auditivo evocado donde se aprecia cada uno de los picos pertenecientes a las diferentes estaciones nerviosas de la vía auditiva periférica y el tronco cerebral. También se indican los distintos parámetros analizados para obtener información *in vivo* sobre la respuesta cerebral al sonido.

3.2 Prueba del rodillo giratorio o rotarod

La prueba del rodillo giratorio se utilizó para evaluar el equilibrio y la coordinación motora de las extremidades anteriores y posteriores de los ratones wt y $Dio2^{-/-}$ a 3 y 6 meses de edad.

Para la realización de la prueba se siguió el protocolo descrito por Pallier y cols. (151) realizando pequeñas modificaciones. El rodillo giratorio (Accelerating model, Ugo Basile) consistió en 5 rodillos giratorios de 5 cm de diámetro y 10 cm de largo elevados 20 cm del suelo que podían girar a distintas velocidades constantes y además generar un ciclo de aceleración. El rodillo giratorio se programó para realizar una aceleración desde 4 rpm hasta 44 rpm en 180 s y posteriormente mantener una velocidad constante de 44 rpm durante 120 s, completando así un ciclo de 5 min por ensayo.

Cada ratón realizó durante 5 días consecutivos este ensayo 3 veces al día con intervalos de 30 min entre cada ensayo. Los primeros 2 días fueron considerados como entrenamiento y los 3 posteriores como prueba. Se midió la latencia de caída del rodillo. Para la realización del análisis estadístico de los 3 días de realización de la prueba se utilizó el valor máximo de latencia de caída de cada ratón por día. A los ratones que permanecieron en el cilindro los 5 minutos que duró la prueba se les concedió el valor máximo de 300 s.

3.3 Prueba del poste vertical

La prueba del poste vertical se realizó para evaluar la fuerza de las extremidades anteriores, el equilibrio y la habilidad de los ratones wt y Dio2^{-/-} de 3 y 6 meses de edad para agarrarse a una superficie cilíndrica (26).

Esta prueba se desarrolló tal y como había sido descrito anteriormente (148) realizando pequeñas modificaciones. Los ratones se situaron en la parte superior del poste (diámetro 4,5 cm, longitud 50 cm) mirando hacia arriba. Se midió el porcentaje de ratones capaces de girar con éxito para descender, el tiempo que tardaban en girar y el tiempo que tardaban en descender por el poste. La prueba se realizó 2 días consecutivos y se realizaron 2 ensayos cada día con un tiempo máximo de 60 s por ensayo. Los ratones que no fueron capaces de girar en los 60 s que duró la prueba fueron evaluados con 60 s en el tiempo de giro y al no descender no se les dio ningún valor en el tiempo empleado en descender. El análisis estadístico se realizó con el menor tiempo que empleaban los animales en girar y descender cada día.

3.4 Prueba de la reja

La prueba de la reja se utilizó para evaluar un posible daño neuromuscular y anomalías en el mantenimiento del equilibrio debidas a deficiencias de D2. Esta prueba se realizó en ratones wt y Dio2^{-/-} de 3 y 6 meses de edad según el protocolo descrito por Sango y cols. (177), realizando pequeñas modificaciones.

Se utilizó una reja procedente de una tapa de cubeta estándar de ratón. Mediante una cinta de carroceros se delimitó un área cuadrangular (14x14 cm). Una vez situado el ratón en el centro de la reja, se procedió a la agitación de la misma para mejorar el agarre de los animales. Seguidamente se invirtió la reja a una altura de 50 cm respecto al suelo que estaba acolchado para evitar lesiones en caso de caída de los animales. Se midió el tiempo que los ratones permanecían agarrados a la reja durante 120 s (valor máximo para aquellos animales que no cayeron). Los valores de los ratones que no fueron capaces de permanecer agarrados a la reja más de 5 segundos se descartaron y en estos casos se repitió la prueba (esto únicamente sucedió en 3 animales).

3.5 Prueba de la imprenta de pisadas

Esta prueba se utilizó para evaluar el patrón locomotor (10, 45) en ratones wt y Dio2^{-/-} a 3 y 6 meses de edad.

Para ello se acondicionó un pasillo de 70 cm de largo, 20 cm de ancho y 20 cm de alto y un habitáculo oscuro al fondo del pasillo dónde el ratón pudiera refugiarse. En la parte media del pasillo se depositó una hoja blanca de 40 cm de longitud. Se pintaron las extremidades de los ratones utilizando pintura no tóxica para dedos (Delfinus). Las extremidades anteriores se pintaron de color negro mientras que las extremidades posteriores se pintaron de color rojo. Cada ratón fue posicionado al comienzo del pasillo para que lo recorriera hasta introducirse en el habitáculo oscuro, dejando sus huellas de colores impresas en la hoja blanca situada en la zona media del pasillo.

La interpretación de los resultados del experimento se realizó analizando varios parámetros:

- a) La velocidad que tardaba cada animal en recorrer los 70 cm del pasillo.
- b) La distancia de las extremidades anteriores. Es la distancia, en cm, desde el centro de la huella de la extremidad anterior izquierda hasta el centro de la huella de la extremidad anterior derecha en un mismo paso.
- c) La distancia de las extremidades posteriores. Es la distancia, en cm, desde el centro de la huella de la extremidad posterior izquierda hasta el centro de la huella de la extremidad posterior derecha en un mismo paso.
- d) La longitud de la zancada anterior. Es la distancia, en cm, desde el centro de la huella de la extremidad anterior hasta el centro de la siguiente huella de la misma extremidad en línea recta.
- e) La longitud de la zancada posterior. Es la distancia, en cm, desde el centro de la huella de la extremidad posterior hasta el centro de la siguiente huella de la misma extremidad en línea recta.
- f) El solapamiento de las pisadas. Se midió la distancia entre el centro de la huella trasera (rojo) con respecto al centro de la delantera (negra) de ese mismo lado del cuerpo. Este parámetro se puntuó de la siguiente manera:
 - Si la huella trasera solapaba con la delantera: 0 puntos.
 - Si la huella trasera caía por detrás de la delantera se dió el valor en negativo de la distancia en cm.
 - Si la huella trasera caía por delante de la delantera se dió el valor en positivo de la distancia en cm.

De cada uno de los parámetros analizados se hizo el promedio de tres medidas exceptuando el apartado a, dónde solo se contabilizó una medida por ratón.

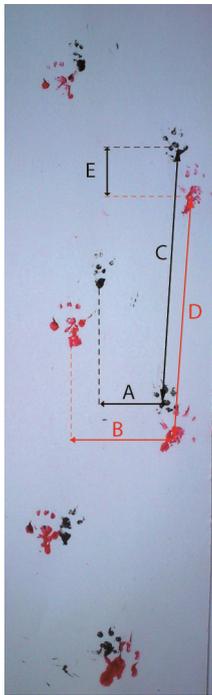


Figura 7. Prueba de la impronta de pisadas. Representación de la impronta de las pisadas de los ratones dónde se analizan los siguientes parámetros: **A)** Distancia entre de las extremidades anteriores. **B)** Distancia entre las extremidades posteriores. **C)** Longitud de la zancada anterior. **D)** Longitud de la zancada posterior. **E)** Solapamiento de la pisada de una huella delantera con la huella trasera.

3.6 Estudio de la velocidad de conducción nerviosa

Se analizó la la velocidad de conducción nerviosa del nervio ciático para obtener información de la función neuromuscular de ratones wt y Dio2-/- de 3 y 6 meses de edad en el servicio de Evaluación Neurofuncional No Invasiva (ENNI) del Instituto de Investigaciones Biomédicas. La velocidad de conducción nerviosa depende del tipo de fibra y de su diámetro, así como del estado fisiológico (metabolismo, temperatura, etc.) y es una medida que se utiliza en el diagnóstico y monitorización de enfermedades neuromusculares.

Los animales se anestesiaron vía i.p. con una mezcla de ketamina (100 mg/kg peso corporal; Imalgene, Merial) y xilacina (10 mg/kg peso corporal; Rompun, Bayer). El estudio neurofuncional se realizó evaluando la velocidad de conducción mediante la estimulación del nervio ciático, cerca de su paso por el trocánter mayor del fémur, y registrando en la región del metatarso (palmar y plantar).

Se utilizó un estímulo eléctrico con una amplitud y duración que fue del 20 % de la respuesta máxima a una intensidad de 9 V y una duración de 2 ms. Para la localización del punto exacto de estimulación se realizó una estimulación previa con un amperaje de 0,5 mA. Durante la prueba, el registro se realizó con un amperaje de 2 mA.

Cuando el estímulo eléctrico activa los axones del nervio, se registra una onda que se denomina potencial de acción compuesto (CAP) que resulta de la suma algebraica de los potenciales de acción individuales de cada axón. La onda CAP tiene una forma característica de espiga (onda directa o M). La estimulación eléctrica del nervio produce la despolarización y propagación del potencial de acción por sus axones en ambas direcciones y la contracción de los músculos inervados. Los impulsos conducidos hacia la médula por las fibras aferentes producen la activación de motoneuronas que llevan de nuevo el impulso hacia el músculo, dando lugar a una onda tardía denominada onda H.

Se determinaron tanto la latencia de la onda directa (definida como la onda que se transmite desde el punto de estimulación hasta el punto de registro), como la de la onda refleja (definida como la onda producida en la zona de estimulación que se propaga por la zona espinal para ser registrada en la zona de registro). Las latencias se determinaron calculando el tiempo que discurría desde la estimulación hasta la detección de actividad eléctrica en los puntos de registro.

La velocidad de conducción nerviosa se calculó en cada animal dividiendo la distancia existente desde el punto de estimulación al punto de registro entre el tiempo transcurrido entre la estimulación y el registro de las ondas (latencia). Para el cálculo de la velocidad se determinaron las siguientes distancias mediante la utilización de un calibre digital: ciático-rótula, rótula-calcáneo, calcáneo-electrodo de registro en la extremidad, ciático-médula. La localización de los puntos de referencia para realizar las mediciones se basó en referencias anatómicas. La localización del ciático se realizó palpando el trocánter mayor del fémur y la de la médula palpando la espina sacra.

3.7 Prueba de sensibilidad a la descarga eléctrica

Esta prueba se realizó para descartar diferencias en la sensibilidad a la descarga eléctrica debidas a la deficiencia de la D2 que pudieran influir en la realización de las pruebas de condicionamiento del miedo (ver apartado 4.2 de Materiales y Métodos). Ratones wt y $Dio2^{-/-}$ de 6 meses de edad fueron introducidos en la cámara de condicionamiento dónde tras 60 s de aclimatación se les administró descargas eléctricas a intensidades crecientes de 0,05 mA, desde los 0 mA hasta 0,4 mA mediante el uso de un generador (ver apartado 4.2 de Materiales y Métodos para la descripción de los aparatos utilizados). Se midieron dos parámetros, el “flinch” definido como el movimiento sutil que realiza el ratón en el momento que empieza a detectar la descarga eléctrica y el “jump” definido como el salto realizado por el ratón en el momento en que la descarga eléctrica produce una sensación aversiva.

4 EVALUACIÓN COGNITIVA

Los estudios de la evaluación cognitiva se realizaron en colaboración con el Dr. César Venero de la Universidad Nacional de Educación a Distancia.

4.1 Prueba de Barnes

Esta prueba descrita por Barnes (11) se basa en la capacidad que tienen los ratones para encontrar la única salida existente en un espacio determinado, mediante la orientación espacial, gracias a pistas visuales. Esta prueba se utilizó para evaluar la memoria espacial de ratones wt y $Dio2^{-/-}$ de 6 meses de edad.

Para el desarrollo de esta prueba se utilizó un tablero de color blanco de 1,2 m de diámetro elevado 1 m respecto al suelo, con 20 agujeros de 45 mm de diámetro repartidos equidistantemente en la periferia de la superficie. El tablero se dividió virtualmente en 4 cuadrantes con 5 agujeros cada uno. La única vía de salida que tenían los ratones para refugiarse era un agujero destapado situado en medio del cuadrante número 1 (Q1) del tablero. El agujero conducía a una cubeta de ratón (30 x 20 x 7 cm) llena de viruta. Se distribuyeron distintas pistas visuales en cada una de las 4 paredes de la sala donde se realizó la prueba para que los ratones pudieran usarlas para orientarse en la localización del agujero de salida.

El comportamiento de los animales en esta prueba se grabó con una cámara de video situada en el techo de la sala y conectada a un sistema computerizado (EthoVision 1.9, Noldus IT).

Los ratones se entrenaron en la prueba durante 3 días, realizándose 4 ensayos por día, 2 ensayos consecutivos y tras 30 minutos otros 2 ensayos consecutivos. El entrenamiento tenía la finalidad de que los animales memorizaran el agujero dónde se encontraba la salida. Cada ensayo consistió en colocar al ratón en el centro del tablero durante un tiempo máximo de 5 minutos o hasta que el animal saliese por el agujero de salida y se evaluaron los siguientes parámetros:

- a) Errores Primarios: número de agujeros explorados por el ratón antes de explorar el agujero de salida.
- b) Errores Secundarios: número de agujeros explorados por el ratón después de haber explorado el agujero de salida.

Al día siguiente del último entrenamiento se procedió a realizar la prueba. Para ello se tapó la salida, con el fin de que los ratones no pudiesen escapar. Los ratones estuvieron 2 minutos en el tablero y se midieron los siguientes parámetros:

- c) Errores Primarios: número de agujeros explorados por los ratones antes de encontrar el agujero de salida.
- d) Errores Secundarios: número de agujeros explorados por los ratones después de encontrar el agujero de salida.
- e) El número de veces que cada ratón exploraba el agujero donde estaba la salida.
- f) El porcentaje de tiempo que los ratones permanecían en el Q1.

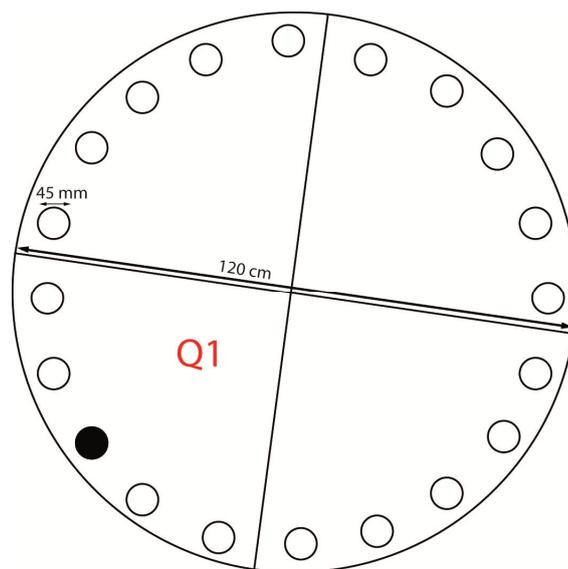


Figura 8. Prueba de Barnes. Representación de la superficie circular de color blanco de 120 cm de diámetro utilizada en la prueba de Barnes. La superficie circular está compuesta por 20 agujeros (45 mm de diámetro) repartidos equidistantemente en la periferia. La superficie circular se divide en 4 cuadrantes compuestos cada uno de ellos por 5 agujeros. El cuadrante número 1 (Q1) tiene el único agujero de salida representado en color negro. Cada una de las 4 paredes de la sala dispone de distintas pistas visuales para que sirvan de orientación espacial.

4.2 Prueba de condicionamiento del miedo

La prueba de condicionamiento del miedo se utilizó para evaluar las capacidades de aprendizaje y memoria emocional de ratones wt y $Dio2^{-/-}$ de 6 meses de edad (Figura 9).

Para la realización de esta prueba se utilizó una caja de condicionamiento de tipo Pavloviano o Skinner (30x37x25 cm) formada por tres paredes metálicas y una pared transparente en la que se sitúa la puerta para introducir al ratón. El suelo de la jaula consta de 20 varillas metálicas de 4 mm de diámetro equidistantes entre sí 1,5 cm. La caja de Skinner está ubicada dentro de una caja de aislamiento cuya pared frontal se sustituyó por una pantalla de plexiglás roja para facilitar la observación de la conducta del ratón. Esta caja de aislamiento está equipada con un sistema de ventilación que emite un sonido de fondo constante de 68 db y con una luz de 20 W.

El estímulo incondicionado fue una descarga eléctrica de 0,7 mA de intensidad. La administración de las descargas eléctricas se realizó mediante el uso de un generador de descargas eléctricas LI100-26 Shocker (LETICA I.C.). El estímulo condicionado fue un tono de 80 dB a una frecuencia de 8 kHz y el contexto en el que se encontraba el animal.

El comportamiento de los ratones se definió como activo o inmóvil cada 2 s, usando un procedimiento de muestreo del tiempo. La respuesta de inmovilización, considerada un buen indicador del grado de miedo que provoca el ENC (descarga eléctrica), se define como la ausencia de movimiento visible exceptuando los movimientos respiratorios del ratón.

Después de cada sesión se retiraron las heces, se cambió la viruta y la jaula de observación se limpió con una solución de ácido acético al 0,1 %.

4.2.1 Proceso experimental de la prueba de condicionamiento del miedo

Los tiempos a los que se realizaron estos estudios están esquematizados en la figura 9.

a) **Entrenamiento:** Los ratones fueron introducidos en el interior de la caja de condicionamiento dejándolos un periodo inicial de 180 s para que explorasen libremente. Pasado este tiempo se activó el tono durante 20 s, seguido de la descarga eléctrica durante 2 s. Este protocolo se repitió 4 veces más con un intervalo de 38 s en los que los ratones no tuvieron ni tono ni descarga. Los ratones se extrajeron 38 s después de la última descarga y se devolvieron a sus jaulas de origen. El tiempo total de duración de cada sesión fue de 7 min. El comportamiento de los ratones se registró durante toda la sesión (7 min), analizándose por separado los 180 s anteriores a la

primera descarga (periodo pre-descarga) y los 152 s posteriores a la descarga (periodo post-descarga). Para realizar el análisis estadístico los datos se transformaron a un porcentaje del total del tiempo de observación.

- b) Prueba de condicionamiento del miedo al contexto:** 24 h después de realizar el entrenamiento los ratones se volvieron a introducir en la caja de condicionamiento, esta vez sin la presencia ni de tono ni de descarga eléctrica durante 8 min. El comportamiento del animal se evaluó midiendo la respuesta de inmovilización durante los 8 min que duró la prueba. Para realizar el análisis estadístico los datos se transformaron a un porcentaje del total del tiempo de observación.
- c) Prueba de condicionamiento del miedo al tono:** Esta prueba se realizó 24 h después de la prueba de condicionamiento del miedo al contexto. Para esta prueba se cambió el contexto de la caja de condicionamiento. Se sustituyó el suelo de varillas metálicas por un suelo completamente liso y también se sustituyeron las paredes por otras de plástico. Además se cambió el olor de la caja de condicionamiento, limpiándola con una solución de agua perfumada. Los ratones se introdujeron en el interior de la caja de condicionamiento y tras un periodo inicial de 180 s se aplicaron 300 s ininterrumpidos de tono, siendo el tiempo total de realización de la prueba de 8 min. El comportamiento de los ratones se registró durante toda la sesión (8 min), analizándose por separado los 180 s anteriores a la primera descarga (periodo pre-descarga) y los 300 s posteriores a la descarga (periodo post-descarga). Para realizar el análisis estadístico los datos se transformaron a un porcentaje del total del tiempo de observación.

4.2.2 Proceso experimental de la extinción y la recuperación espontánea de la memoria del miedo condicionado

- a) Extinción del miedo condicionado:** Transcurridos 12 días desde la realización de la prueba de condicionamiento del miedo se realizaron 3 sesiones de extinción con un intervalo de 24 h entre cada sesión. Cada una de estas sesiones consistió en un periodo de 120 s donde el ratón permanecía en la caja sin presencia de tono. Transcurridos los 120 s se siguió un protocolo, repetido 8 veces, consistente en 20 s de presencia de tono y 20 s sin tono. El comportamiento de los ratones se registró durante toda la sesión (7,3 min), analizándose por separado los 160 s en presencia de tono y los 320 s en ausencia de tono. Para realizar el análisis estadístico, los datos de la respuesta de inmovilización en presencia de tono se transformaron a un porcentaje del total del tiempo de observación.
- b) Recuperación espontánea de la memoria del miedo condicionado:** 7 días después de la última sesión de extinción los ratones se introdujeron dentro de la caja de condicionamiento y se

mantuvieron 180 s sin la presencia de tono, seguido de 300 s en presencia de tono. El comportamiento de los ratones se registró durante toda la sesión (8 min), analizándose por separado los 180 s anteriores a la primera descarga (periodo pre-descarga) y los 300 s posteriores a la descarga (periodo post-descarga). Para realizar el análisis estadístico los datos se transformaron a un porcentaje del total del tiempo de observación.

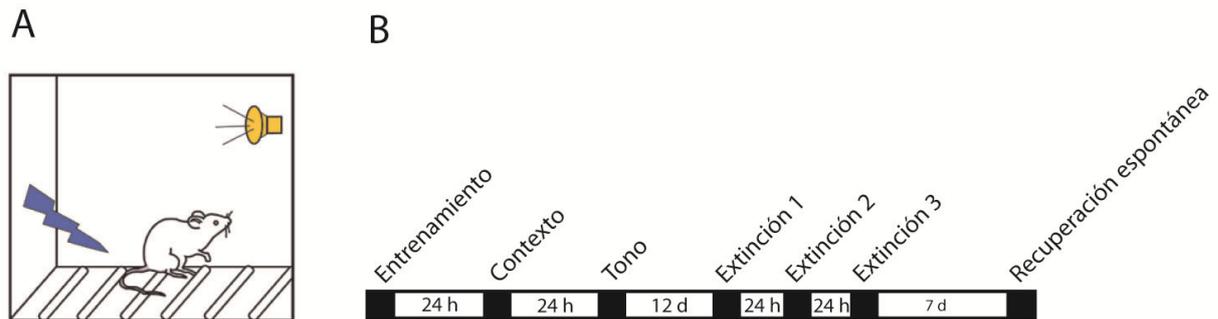


Figura 9. Prueba de condicionamiento del miedo. A) Representación de la caja de condicionamiento con el altavoz que proporciona el estímulo sonoro y la rejilla del suelo que proporciona la descarga eléctrica. B) Esquema de la prueba de condicionamiento del miedo. Para el entrenamiento de los ratones se utilizó como estímulo condicionado (EC) un tono y un contexto y como estímulo no condicionado (ENC) una descarga eléctrica. Transcurridas 24 h desde la última sesión de entrenamiento los ratones se volvieron a introducir en la caja de condicionamiento sin la presencia del tono ni de la descarga eléctrica y se evaluó el condicionamiento del miedo al contexto. 48 horas después de la última sesión de entrenamiento los ratones se volvieron a introducir en la caja de condicionamiento a la que se le había cambiado el contexto y se evaluó el condicionamiento del miedo al tono mediante la presencia del tono. La extinción se evaluó 12 días después de la realización de la prueba de condicionamiento del miedo realizándose 3 sesiones de extinción separadas cada una de ellas 24h. La recuperación espontánea del miedo se evaluó 7 días después de la última sesión de extinción introduciendo de nuevo a los ratones en la caja de condicionamiento sin la presencia de tono.

5. REGISTROS ELECTROFISIOLÓGICOS EN RODAJAS DE LA FORMACIÓN HIPOCAMPAL

Estos estudios se realizaron en colaboración con el grupo del Dr. José María Solís del Hospital Universitario Ramón y Cajal, IRYCIS de Madrid. Estos estudios se realizaron para caracterizar posibles alteraciones debidas a la deficiencia de D2 en la plasticidad sináptica del hipocampo. Todos estos estudios se realizaron en ratones wt y $Dio2^{-/-}$ de 3 meses de edad.

La región CA1 del hipocampo recibe las aferencias excitatorias (glutamatérgicas) de los axones de las neuronas piramidales de CA3 desde las regiones ipsilateral y contralateral denominadas fibras colaterales de Schaffer y fibras comisurales respectivamente. En estos experimentos se estudió la transmisión sináptica en la región CA1 estimulando eléctricamente las fibras colaterales de Schaffer en el *stratum radiatum* de la CA1 para activar las sinapsis excitadoras. De esta forma, se generan

corrientes a través de las membranas postsinápticas por activación de los receptores de glutamato de tipo AMPA localizados en las espinas dendríticas de las células piramidales. Estas corrientes se registraron extracelularmente como cambios en el potencial de campo.

5.1 Preparación del tejido

Los ratones se anestesiaron por inhalación de isoflurano (Aerrane, Baxter) dentro de una cámara cerrada. Tras sacrificar a los animales por decapitación, se extrajo el cerebro con la mayor rapidez posible y se introdujo en una disolución de Krebs-Ringer-Bicarbonato (KRB, ver composición más abajo) con glucosa mantenida a una temperatura aproximada de 1 °C y burbujeada constantemente con gas carbógeno (95 % O₂, 5 % CO₂). A continuación se aislaron las 2 HPC correspondientes a los 2 hemisferios. Las HPC se seccionaron transversalmente a su eje longitudinal en rodajas coronales de 400 µm de espesor utilizando un cortador manual. Se seleccionaron rodajas de la porción central de la HPC dorsal y se transfirieron a una cámara de mantenimiento similar a la utilizada por Nicoll y Alger (145). El tiempo transcurrido en todo el proceso fue inferior a 5 min. La rapidez del proceso así como la baja temperatura de la solución utilizada son importantes, tanto para reducir el metabolismo celular como para evitar tiempos de hipoxia prolongados. De esta manera, se preserva el tejido frente al daño celular, ya que tanto la exposición de las rodajas a tiempos superiores a 3 min como la liberación de glutamato durante el proceso de corte de las rodajas pueden inhibir la síntesis proteica de manera irreversible (60).

Posteriormente a la preparación de las rodajas hay un período de tiempo en el que no se detecta ninguna actividad neuronal a consecuencia del trauma ocasionado durante la preparación de las mismas. Estudios previos han demostrado que son necesarias de 2 a 4 h tras la preparación de las rodajas para que su metabolismo se mantenga estable (173). Por ello las rodajas permanecieron en la cámara de mantenimiento durante al menos 3 h sobre un papel Whatman por el que difundía KRB en atmósfera oxigenada y saturada en vapor de agua a temperatura ambiente (20-25 °C) antes de ser utilizadas experimentalmente.

La composición del KRB utilizado, tanto para la obtención de las rodajas como para su perfusión, fue la siguiente (en nM): NaCl 119; KCl 2,5; KH₂PO₄ 1,0; NaHCO₃ 26,2; MgSO₄ 1,3; CaCl₂ 2,5; Glucosa 11. El KRB se preparó a diario a partir de disoluciones madre almacenadas a 4 °C que tenían una concentración diez veces mayor que la final. Todos los componentes del KRB se obtuvieron de Sigma-Aldrich o Merck. La osmolaridad del KRB se midió diariamente con un microosmómetro Mod.3Moplus (Advanced Instruments). Durante su uso, el KRB fue constantemente burbujeado con carbógeno (95 % O₂ y 5 % CO₂) para mantener la oxigenación y el pH de la disolución (~7,4). También se controlaron las variaciones de la osmolaridad de forma periódica.

5.2 Registros electrofisiológicos

La cámara de registro utilizada en nuestros experimentos fue del tipo de la descrita por Nicoll y Alger (145). En este tipo de cámara la rodaja permanece entre dos mallas de nylon totalmente sumergida en solución de KRB oxigenada y renovada constantemente gracias a una bomba peristáltica del modelo M312 minipuls3 (Gilson, Francia) con un flujo de 1,8-2 ml por min. El líquido de perfusión se mantuvo a una temperatura constante de 31-32 °C. La cámara de registro se fijó a una mesa antivibratoria TMC (Massachusetts) y se iluminó con una fuente de luz fría EK-1 (Euromez) desde la parte inferior del pocillo de registro.

El posicionamiento en la rodaja de los electrodos de registro y estimulación se realizó mediante el uso de una lupa Leica mod. MS5 (Leica Microsystems) y micromanipuladores Märzhäuser MM-33 (Märzhäuser Wetzlar-Steindorf) que se fijaron a la mesa antivibratoria por medio de bases magnéticas (Figura 10).

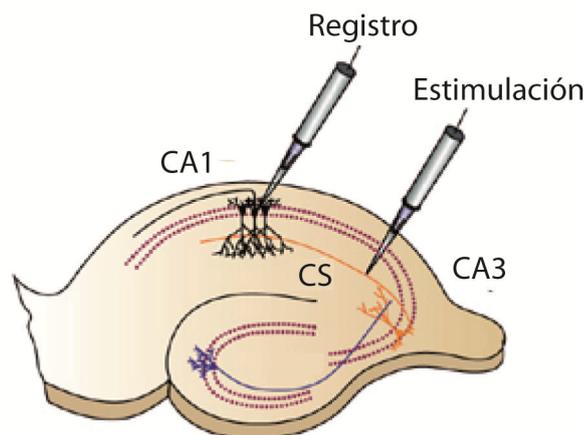


Figure 10. Representación del registro electrofisiológico de una rodaja de tejido. Cuando las colaterales de Schaffer (CS) son estimuladas en el *stratum radiatum* de la región CA1 del hipocampo con el electrodo de estimulación, los potenciales excitatorios postsinápticos poblacionales (fEPSPs) pueden ser registrados en la CA1 usando un microelectrodo de tungsteno o acero inoxidable.

5.3 Potenciales extracelulares

La activación de las fibras colaterales de Schaffer genera despolarizaciones intracelulares que son registradas extracelularmente en la región dendrítica de la CA1 como una onda negativa con relación a tierra. Dicha onda negativa es el potencial excitador postsináptico poblacional (fEPSP) que corresponde a la suma de las corrientes sinápticas excitadoras generadas en los cientos de sinapsis situadas en la zona cercana al electrodo de registro y es un buen indicador de la transmisión sináptica excitadora (7).

En estos estudios, el fEPSP se registró con un microelectrodo de tungsteno o acero inoxidable (1 M Ω que se conectó a un preamplificador AI-401 (Axon Instruments), acoplado a su vez a un acondicionador de señales CyberAmp 320 (Axon Instruments) que filtró y amplificó las señales para adecuar su adquisición por una tarjeta analógica/digital Digidata 1320A (Axon Instruments).

5.4 Estimulación eléctrica

Los electrodos de estimulación se construyeron en el laboratorio a partir de dos microelectrodos de tungsteno o acero inoxidable (0.1 m Ω ; W.P.I.), dejando una separación entre sus puntas de alrededor de 100 μ m.

Las colaterales de Schaffer se estimularon con pulsos eléctricos bifásicos, de 100 μ s de duración por fase, suministrados mediante un generador de pulsos Master-8 (A.M.P.I.) conectado a una unidad aisladora de estímulos en configuración de corriente constante (Cibertec) que genera pulsos de corriente independientes a los cambios de resistencia de los electrodos. La intensidad de estimulación se estableció para cada registro ajustando el valor del fEPSP a un 40 % aproximadamente de su valor máximo y en todos los casos estuvo entre 10 y 30 μ A. Se utilizó una frecuencia de estimulación de 0,033 Hz que no induce cambios en la plasticidad sináptica (173).

En cada rodaja se estableció un periodo basal registrando durante 20 min los fEPSP provocados cada 15 s. Aquellas rodajas con un fEPSP cuya amplitud máxima fue inferior a 2 mV o que no fueron estables durante el periodo basal fueron desechadas.

5.4.1 Curva estímulo/respuesta

Esta prueba se realizó para evaluar si la deficiencia de D2 alteraba el reclutamiento de fibras sinápticas que tiene lugar como consecuencia de una mayor intensidad de estimulación. Para generar una curva estímulo/respuesta, se estimularon las rodajas a intensidades de corriente crecientes, desde la intensidad a la que la rodaja empieza a tener repuesta sináptica hasta llegar a la saturación de las respuestas sinápticas (10,6 a 30,7 μ A).

5.4.2 Facilitación por pares de pulsos

La prueba de la facilitación por pares de pulsos (FPP) se utilizó para evaluar la modulación de la excitabilidad celular a corto plazo (203). Esta prueba se basa en el registro de una segunda respuesta postsináptica producida después de una primera respuesta postsináptica. Los intervalos de tiempo

utilizados entre el primer y el segundo estímulo fueron: 20, 50, 80, 100, 150 y 250 ms. La intensidad de estimulación se estableció para cada registro ajustando el valor del fEPSP a un 40 % de su valor máximo.

5.4.3 Depresión a largo plazo

La LTD fue inducida por una estimulación de baja frecuencia (1 Hz cada s durante 15 min). Posteriormente se siguió estimulando a la misma frecuencia que se usó para obtener la línea basal del fEPSP.

5.4.4 Potenciación a largo plazo

Esta prueba se utilizó para evaluar la variación de la fuerza sináptica debida a la LTP. Se utilizaron diferentes protocolos de estimulación para evaluar distintas formas de potenciación. Se indujo E-LTP mediante HFS aplicando una tetanización de 100 Hz durante 1 s (97). Se indujo L-LTP con el mismo protocolo usado para la E-LTP con la única diferencia de que se aplicaron 3 tetanizaciones separadas por intervalos de 10 min (97). También se indujo LTP mediante estimulación theta-burst (TBS, del inglés Theta Burst Stimulation), ésto se realizó mediante 4 pulsos de 100 Hz separados cada uno de ellos 10 ms. Se aplicaron 2 y 3 TBS separados por intervalos de 200 ms (44). En los tres protocolos de estimulación utilizados, posteriormente se siguió estimulando a la misma frecuencia que se usó para obtener la línea basal del fEPSP.

5.5 Procesamiento de los registros electrofisiológicos

Los potenciales provocados se filtraron a 3 kHz con un filtro pasa-bajos y se digitalizaron a 25 kHz con una tarjeta analógica digital Digidata 1320A (Axon Instruments). Estas señales fueron visualizadas y almacenadas informáticamente con la ayuda del programa pClamp 8.0.2 (Axon Instruments).

La pendiente del fEPSP se calculó ajustando la misma a una línea recta por el método de los mínimos cuadrados en una ventana de tiempo de alrededor de 0,5 ms para el fEPSP. Se midió la pendiente inicial con el fin de evitar posibles contaminaciones con la espiga poblacional resultante del disparo sincrónico de los potenciales de acción en los somas.

Para valorar los efectos sobre la transmisión sináptica de una condición experimental específica, los valores de la pendiente de los fEPSP registrados durante los 20 min de línea basal fueron

promediados y considerados como el 100 %. A partir de estos valores se normalizaron los resultados del resto del experimento.

6. ANALÍISIS ESTADÍSTICO

Todos los resultados se expresan como media \pm error estándar. El nivel de significación estadística se estableció en $p \leq 0,05$. Las comparaciones estadísticas entre grupos se realizaron con el programa estadístico SPSS (SPSS Inc.). Para establecer comparaciones entre 2 grupos se utilizó la prueba T de Student y entre 3 grupos el análisis de la varianza (ANOVA) de una vía. Cuando el ANOVA indicó un efecto significativo del factor condición experimental, se realizaron análisis *a posteriori* apropiados (Bonferroni).

Las comparaciones entre 2 grupos experimentales con distintas mediciones en el tiempo se analizaron con un modelo lineal general (MLG) de medidas repetidas.

Por último, en los estudios electrofisiológicos de LTD y LTP se utilizó un modelo ANOVA de dos vías de medidas repetidas para establecer las comparaciones entre los grupos experimentales.





RESULTADOS



1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN: EVALUACIÓN DEL ESTADO TIROIDEO

1.1 Influencia de la D2 en el peso corporal

Una buena medida del estado tiroideo de los animales es la ganancia de peso corporal a lo largo de su ciclo de vida, ya que anomalías en los niveles plasmáticos de HT provocan alteraciones en la ganancia de peso corporal. Se realizó un seguimiento del peso corporal de ratones wt y Dio2^{-/-} a 3, 4, 5, 6 y 12 meses de edad en al menos 20 animales de cada edad y condición experimental. En ninguna de las edades estudiadas se observaron diferencias significativas entre ambos grupos experimentales (Tabla 1).

Pesos corporales (g)					
	3 meses	4 meses	5 meses	6 meses	12 meses
wt	27,35 ± 0,55 (n=22)	29,26 ± 0,72 (n=36)	31,06 ± 0,35 (n=35)	32,03 ± 0,67 (n=20)	36,63 ± 1,09 (n=22)
Dio2 ^{-/-}	27,74 ± 0,36 ^{NS} (n=25)	28,00 ± 0,52 ^{NS} (n=29)	30,56 ± 0,45 ^{NS} (n=27)	32,54 ± 0,85 ^{NS} (n=21)	35,73 ± 1,55 ^{NS} (n=20)

Tabla 1. Peso corporal de ratones wt y Dio2^{-/-} a distintas edades. Diferencias respecto al grupo wt: NS: no significativo. La n indica el número de animales usados

1.2 Concentraciones de hormonas tiroideas en plasma y regiones cerebrales

Para seguir evaluando el estado tiroideo de los animales se midieron los niveles de HT circulantes en animales wt y Dio2^{-/-} de 3 meses de edad. Los niveles plasmáticos de T3 y T4 en ratones wt confirmaban los valores determinados previamente en ratones eutiroideos de la misma edad (190). Los niveles de T3 en suero no presentaban variaciones entre ambos grupos experimentales ($t_{12}=0,447$; $p=0,663$; Figura 11 A). Sin embargo, los niveles plasmáticos de T4 en los ratones Dio2^{-/-} estaban aumentados al doble respecto a los niveles de los ratones wt, siendo estas diferencias estadísticamente significativas ($t_{22}=3,962$; $p=0,001$; Figura 11 B).

En segundo lugar se midieron los niveles de T3 y T4 en 3 regiones cerebrales diana de HT como son el CB, la CTX y la HPC, también en ratones wt y Dio2^{-/-} de 3 meses de edad (Figura 11 C). Debido a la sensibilidad de la técnica fue necesario realizar agrupaciones de tejido de varios ratones para obtener suficiente muestra para las determinaciones hormonales por RIA. Se utilizaron tejidos de 3 ratones para cada muestra de CB analizada, tejido de 2 ratones para las muestras de CTX y tejido de

Resultados

4 ratones para las muestras de HPC. La concentración de T3 estaba significativamente reducida en los ratones $Dio2^{-/-}$ en comparación con los ratones wt en más del 37 %, tanto en CTX como en HPC ($t_8=3,334$; $p=0,01$ y $t_6=2,595$; $p=0,041$ respectivamente). Sin embargo, en el CB la concentración de T3 no presentó diferencias significativas entre ambos grupos experimentales ($t_7=2,123$; $p=0,071$). La concentración de T4 también estaba disminuida en los ratones $Dio2^{-/-}$ en comparación con los ratones wt en torno a un 30 % en el CB y en el HPC ($t_8=2,858$; $p=0,022$ y $t_6=3,995$; $p=0,007$ respectivamente). Sin embargo, en la CTX, la concentración de T4 estaba aumentada en los ratones $Dio2^{-/-}$ en comparación con los ratones wt en más del 44 % ($t_9=4,43$; $p=0,002$; Figura 11 C).

En resumen, en los ratones $Dio2^{-/-}$, en comparación con los ratones wt, las concentraciones de T3 y T4 estaban disminuidas en todas las regiones cerebrales estudiadas a excepción de la concentración de T3 en el CB que no mostraba diferencias significativas y de la concentración de T4 en la CTX que estaba aumentada considerablemente, como ocurría con los niveles plasmáticos de T4.

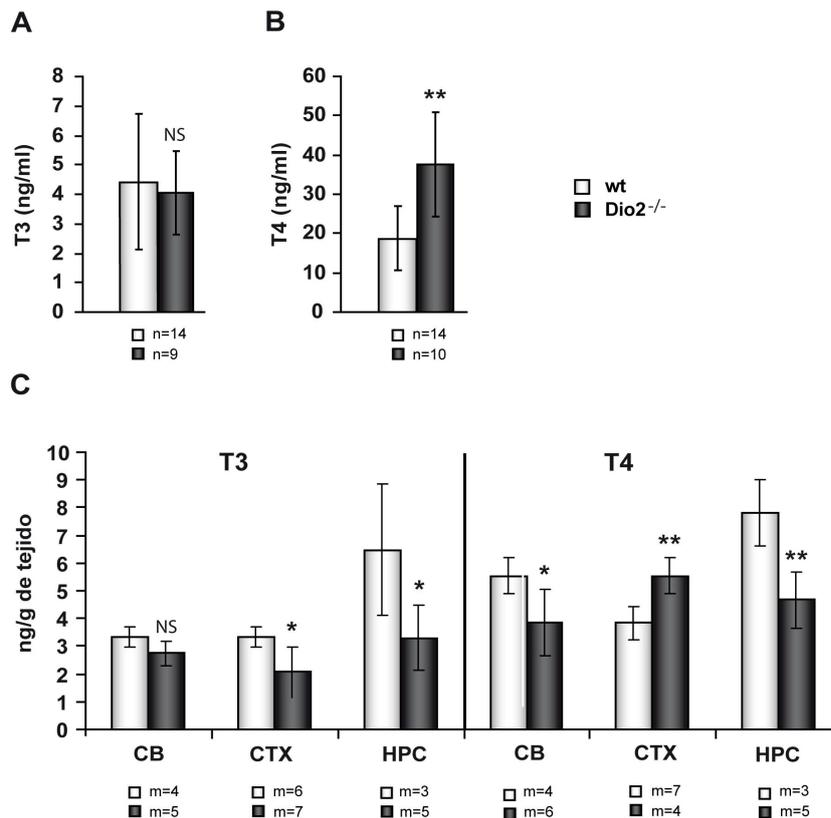


Figura 11. Niveles de T3 y T4 en plasma y regiones cerebrales. A, B) Niveles de T3 y T4 plasmáticos en ratones wt y $Dio2^{-/-}$ de 3 meses de edad. La n indica el número de animales usados. C) Niveles de T3 y T4 en cerebelo (CB), corteza cerebral (CTX) y formación hipocampal (HPC). La m indica el número de muestras usadas. Se utilizó tejido de 3 ratones para cada muestra de CB, tejido de 2 ratones para las muestras de CTX y tejido de 4 ratones para las muestras de HPC. Los resultados se representan como la media \pm el error estándar. Diferencias respecto al grupo wt: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; NS, no significativo.

1.3 Actividad de la D2 y D1 en distintas regiones cerebrales

También se midió la actividad de la D2 y D1 en CB, CTX y HPC de ratones wt y $Dio2^{-/-}$ de 3 meses de edad para determinar la capacidad de generación local de T3 en estas regiones.

La actividad de la D2, determinada mediante la utilización de T4 como sustrato y PTU como inhibidor de la D1, fue indetectable en los ratones $Dio2^{-/-}$. En los ratones wt se registró actividad D2 en las 3 regiones cerebrales analizadas, siendo mayor en la CTX y la HPC (un 67,8 y un 53,1 % respectivamente) en comparación con el CB (Figura 12).

En los ratones wt la actividad de la D1, medida con rT3 como sustrato, fue prácticamente indetectable en CTX y HPC. Sin embargo, en CB se cuantificó una actividad de D1 muy elevada y mucho mayor (77,7 %) que la actividad de la D2 en esta misma región. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en la actividad D1 en el CB entre los ratones wt y los ratones $Dio2^{-/-}$ ($t_8 = 0,882$; $p = 0,404$; Figura 12).

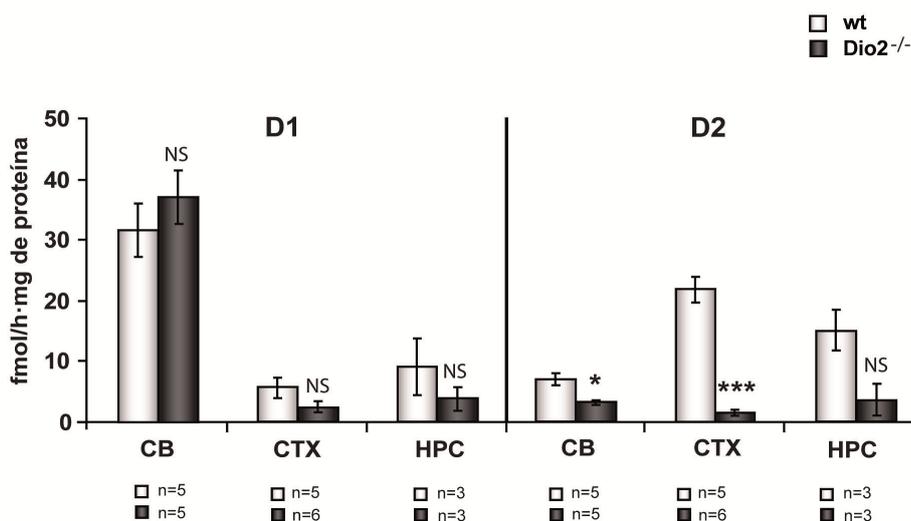


Figura 12. Determinación de la actividad de D1 y D2 en regiones cerebrales. Actividad de D1 y D2 en cerebelo (CB), corteza cerebral (CTX) y formación hipocampal (HPC) en ratones wt y $Dio2^{-/-}$ de 3 meses de edad. Los resultados se representan como la media \pm el error estándar. La n indica el número de animales usados. Diferencias respecto al grupo wt: * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$; NS, no significativo.

La actividad de la D1 no se modifica en condiciones de deficiencia de D2 en ninguna de las regiones estudiadas.

2. INFLUENCIA DE LA D2 EN EL METABOLISMO DE LA GLUCOSA

Debido a que distintos estudios en humanos han asociado el polimorfismo Thr92Ala de la D2 con el fenómeno de resistencia a la insulina (35, 36, 61, 67, 84, 133, 134, 155), se ha querido profundizar en la implicación de la D2 en el metabolismo de la glucosa realizando distintas pruebas en ratones wt y $Dio2^{-/-}$ de 3 meses de edad.

2.1 Niveles de glucosa en sangre

Se midieron los niveles de glucosa en sangre en estado de alimentación y tras un periodo de 24 h de ayuno. Ambas medidas fueron tomadas a las 10:00 h. Los resultados obtenidos no mostraron diferencias significativas en los niveles de glucosa ni en alimentación ($t_{18}= 0,009$; $p= 0,993$) ni en ayuno ($t_{18}= 0,929$; $p= 0,365$) entre ambos genotipos (Figura 13).

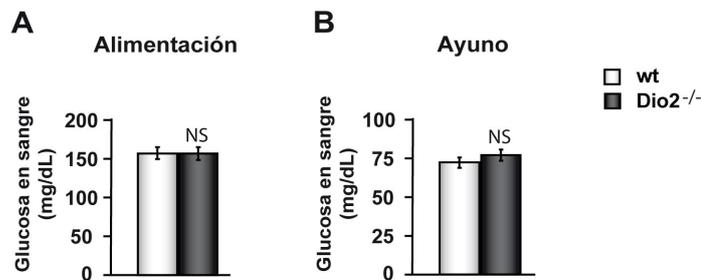


Figura 13. Niveles de glucosa en sangre. **A)** Niveles de glucosa en sangre en estado de alimentación. **B)** Niveles de glucosa en sangre tras 24 h de ayuno. Los resultados obtenidos de ratones de 3 meses de edad ($n=10$ wt y $n=8$ $Dio2^{-/-}$) se representan como la media \pm error estándar. Diferencias respecto al grupo wt: NS, no significativo.

2.2 Test de tolerancia a la glucosa

Esta prueba se realizó para evaluar la capacidad de los animales para secretar insulina en respuesta a niveles plasmáticos elevados de glucosa. Tras un periodo de 24 h de ayuno se administró a los animales vía i.p una dosis de glucosa de 2 g/kg peso corporal y se midió la glucemia a 9 tiempos comprendidos entre los 0 y los 180 min posteriores a la administración de glucosa. La comparación de las medias de los niveles de glucosa para cada uno de los tiempos analizados mostró en los ratones $Dio2^{-/-}$ disminuciones estadísticamente significativas de un 13,5 % a los 10 min ($t_{14}= 2,907$; $p= 0,011$) y de un 19 % a los 15 min ($t_{18}= 2,768$; $p= 0,013$) en comparación con los ratones wt (Figura 14 A). Los niveles de glucosa en sangre, medidos con el área bajo la curva (ABC), eran estadísticamente significativos entre ambas condiciones, presentando los ratones $Dio2^{-/-}$ niveles inferiores a un 16,7 % en comparación con los ratones wt ($t_{16}= 2,281$; $p= 0,037$; Figura 14 B). La evolución de las curvas de

glucosa durante los 180 min que duró la prueba, no mostró diferencias significativas entre ambos genotipos ($\chi^2_8 = 12,341$; $p = 0,137$; Figura 14 A) analizando los resultados con un MLG de medidas repetidas.

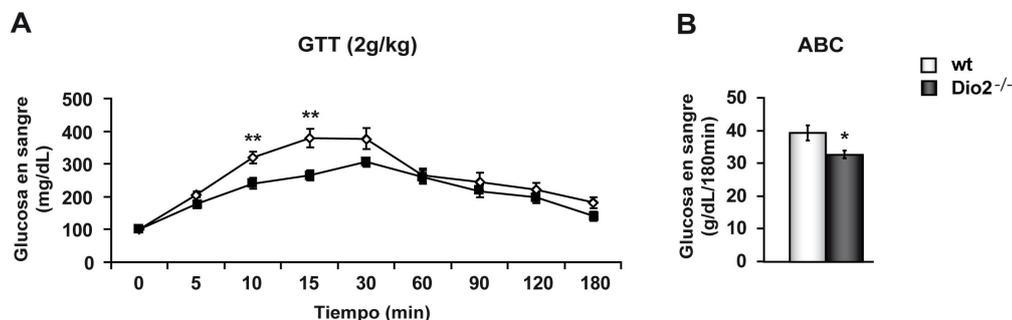


Figura 14. Test de tolerancia a la glucosa (GTT). A) GTT realizado tras un periodo de 24 h de ayuno administrando D-Glucosa a una dosis de 2 g/kg de peso corporal. Los niveles de glucosa se expresan como un porcentaje del valor de glucosa en sangre antes de la realización del test. B) Histogramas representativos del área bajo la curva (ABC) de A. Los resultados obtenidos de ratones de 3 meses de edad (n=10 wt y n=8 Dio2^{-/-}) se representan como la media \pm error estándar. Diferencias respecto al grupo wt: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; NS, no significativo

2.3 Test de tolerancia a la insulina

La respuesta de los ratones a la administración exógena de altas dosis de insulina se evaluó con el ITT tras un periodo de 4 h de ayuno en ratones wt y ratones Dio2^{-/-} de 3 meses de edad.

Se realizaron dos experimentos. A los animales del primer experimento se les inyectó una dosis de insulina de 0,75 U/kg de peso corporal, la utilizada habitualmente en este tipo de estudios. A los animales del segundo experimento les fue administrada una dosis menor de insulina (0,23 U/kg de peso corporal). En ambos experimentos se midieron los niveles de glucosa a distintos tiempos comprendidos entre los 0 y los 120 min posteriores a la administración de insulina.

En el primer experimento, en el que se utilizó una dosis de insulina de 0,75 U/kg de peso corporal, los niveles de glucosa de los ratones Dio2^{-/-} para cada uno de los tiempos analizados estaban significativamente disminuidos entre un 26,7 % y un 61 % respecto a los niveles de los ratones wt ($p < 0,05$ en todos los tiempos analizados; Figura 15 A). Así mismo, los niveles de glucosa medidos por el ABC estaban disminuidos significativamente en un 36 % en los ratones Dio2^{-/-} en comparación con los ratones wt ($t_{15} = 4,757$; $p = 0,000$; Figura 15 B). La evolución de las curvas de glucosa de ambas condiciones experimentales a lo largo de los 120 minutos fue significativamente diferente ($\chi^2_5 = 19,154$; $p = 0,002$; Figura 15 A) analizando los resultados con un MLG de medidas repetidas.

Resultados

En el segundo experimento utilizando una dosis menor de insulina (0,23 U/kg de peso corporal) los niveles de glucosa de los ratones $Dio2^{-/-}$ para cada uno de los tiempos analizados estaban disminuidos entre un 12,1 % y un 24 % respecto a los niveles de los ratones wt. Esta disminución únicamente fue estadísticamente significativa a los 30 min ($t_{14}= 2,650$; $p= 0,019$), donde los niveles de glucosa de los ratones $Dio2^{-/-}$ estaban disminuidos un 24 % (Figura 15 C). Así mismo los niveles de glucosa, medidos por el ABC estaban disminuidos significativamente en un 14,3 % en los ratones $Dio2^{-/-}$ en comparación con los ratones wt ($t_{14}= 2,607$; $p= 0,02$; Figura 15 D). En esta ocasión, la evolución de las curvas de glucosa de ambas condiciones experimentales a lo largo de los 90 minutos no presentó diferencias significativas entre ambos genotipos ($\chi^2_3= 2,505$; $p= 0,474$; Figura 15 C) analizando los resultados con un MLG de medidas repetidas.

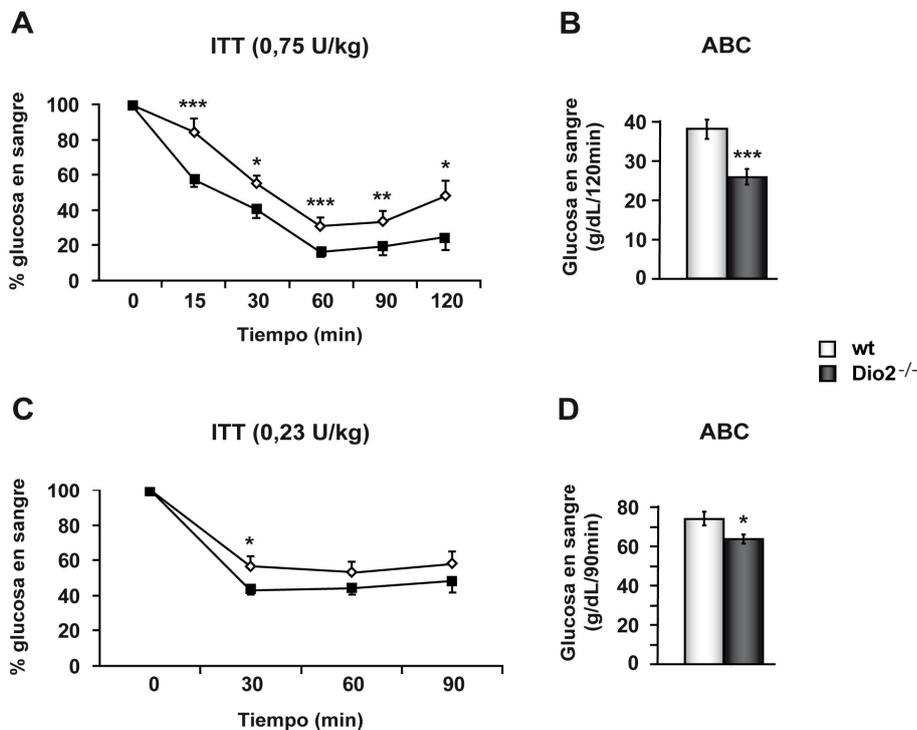


Figura 15. Test de tolerancia a la insulina (ITT). A) ITT tras la administración de insulina a una dosis de 0,75 U/kg de peso corporal. B) Histogramas representativos del área bajo la curva (ABC) de A. C) ITT tras la administración de insulina a una dosis de 0,23 U/kg de peso corporal. D) Histogramas representativos del ABC de C. En A y C los niveles de glucosa se expresan como porcentaje del valor inicial de glucosa. Los resultados se representan como la media ± el error estándar de 10 ratones wt y 9 ratones $Dio2^{-/-}$ para A y B y 8 ratones wt y 8 ratones $Dio2^{-/-}$ para C y D de 3 meses de edad. Diferencias respecto al grupo wt: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; NS, no significativo.

2.4 Análisis de la fosforilación de *Akt* en respuesta a la señalización por insulina

La acción y señalización por insulina a través de la vía PI3K/Akt induce la fosforilación y activación de la PKB también conocida como Akt. Modelos murinos con anomalías en la señalización por insulina se han relacionado con procesos de resistencia a la insulina (49, 76). Por nuestros resultados obtenidos en el GTT y el ITT hemos querido evaluar la señalización de la insulina analizando la fosforilación de Akt tanto en tejidos periféricos (músculo e hígado) como en 3 regiones cerebrales (CTX, HPC y EST).

La fosforilación de Akt se analizó por western blot en 2 experimentos independientes en distintos tejidos de ratones wt y *Dio2^{-/-}* de 3 meses de edad. En el primer experimento se inyectó a los animales i.p una dosis de insulina de 0,75 U/kg de peso corporal y éstos se sacrificaron a los 15 min de la inyección y se analizó la fosforilación de Akt en músculo, hígado y distintas regiones cerebrales. En el segundo experimento se inyectó a los animales la misma dosis de insulina, pero en esta ocasión la mitad de los ratones se sacrificaron a los 15 min y la otra mitad a los 30 min tras la administración de la insulina (tiempo en el que hay una mayor respuesta a la insulina basándonos en los resultados obtenidos en el ITT) y se analizó la fosforilación de Akt en hígado y músculo. Como control del experimento se utilizaron animales a los que se les inyectó suero salino en lugar de insulina.

En todas las regiones cerebrales estudiadas todos los ratones inyectados con suero salino (controles) presentaban una fosforilación de Akt basal muy elevada. Esta fosforilación basal elevada impidió cuantificar un aumento en la fosforilación de Akt tras la estimulación con insulina, tanto en los ratones wt como en los ratones *Dio2^{-/-}*. Por ello no se pudieron analizar posibles diferencias en la señalización por insulina debidas a la deficiencia de D2 (Figura 16). Aún así, la cuantificación de la fosforilación de Akt no indicó diferencias entre genotipos.

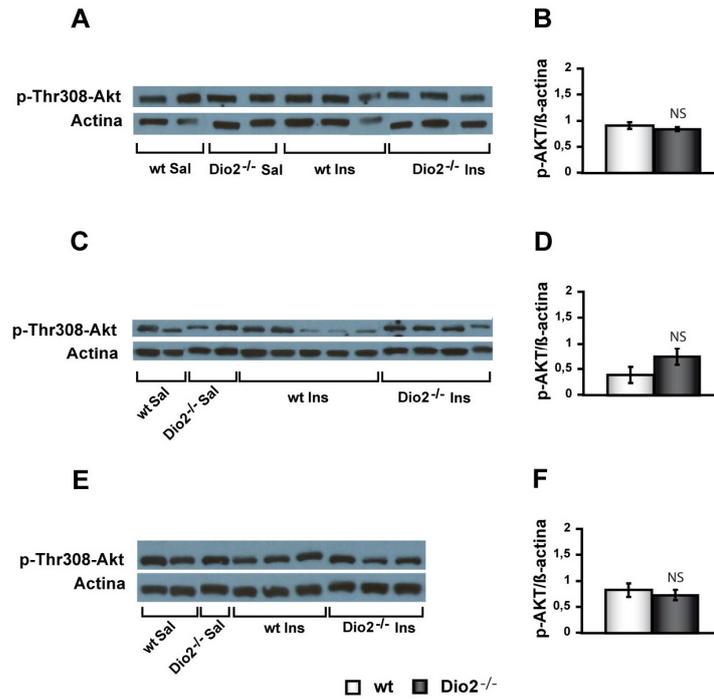


Figura 16. Análisis de la expresión de p-Akt en regiones cerebrales. **A, C y E)** Expresión de p-Thr308-Akt normalizado con β -actina en corteza cerebral (CTX), formación hipocampal (HPC) y estriado (EST) 15 min después de la administración de insulina a una dosis de 0,75 U/kg de peso corporal. **B, D y F)** Cuantificación de p-Akt de A, C y E respectivamente. Los resultados de la cuantificación de p-Akt se representan como la media \pm el error estándar de 3 ratones wt y 3 ratones Dio2^{-/-} para B y F y de 5 ratones wt y 4 ratones Dio2^{-/-} para D. Diferencias respecto al grupo wt: NS, no significativo. Como control de carga se utilizó el anticuerpo de actina.

En músculo e hígado, los ratones inyectados con suero salino presentaban una fosforilación de Akt con una baja intensidad de señal. Los ratones inyectados con insulina presentaban un incremento considerable en ambos tejidos a los 15 y 30 min tras la administración de insulina (Figura 17 y Figura 18). En músculo no se cuantificaron diferencias estadísticamente significativas en la fosforilación de Akt entre los ratones wt y los ratones Dio2^{-/-} ni a los 15 min en ninguno de los dos experimentos independientes ($t_0= 0,901$; $p= 0,391$ y $t_5= 0,378$; $p= 0,722$ respectivamente) ni a los 30 min ($t_6= 0,961$; $p= 0,374$; Figura 17). En hígado tampoco se observaron diferencias entre genotipos ni a los 15 min ($t_5= 0,849$; $p= 0,437$ y $t_6= 1,04$; $p= 0,338$ respectivamente) ni a los 30 min ($t_6= 1,411$; $p= 0,208$; Figura 18) tras la administración de insulina.

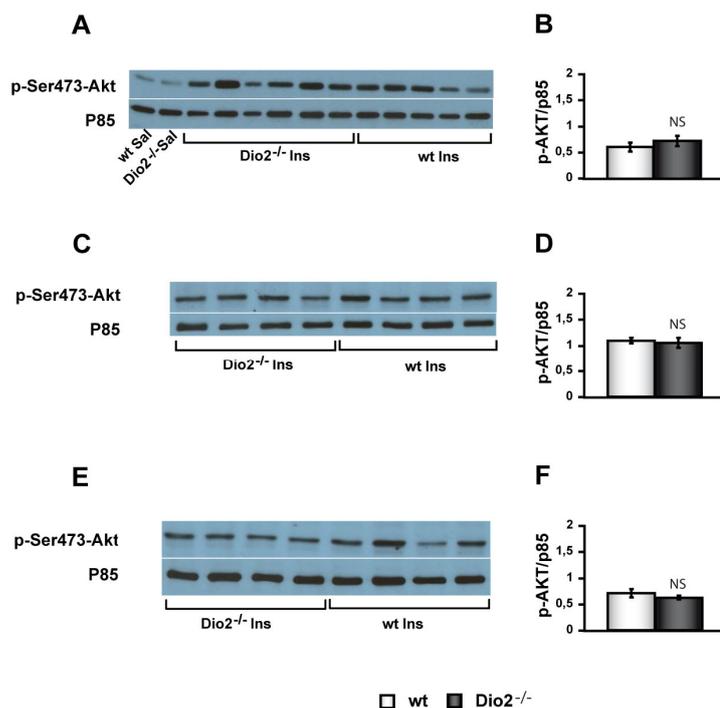


Figura 17. Análisis de la expresión de p-Akt en músculo. A y C) Expresión de p-Ser473-Akt normalizado con p85 15 min después de la administración de insulina a una dosis de 0,75 U/kg de peso corporal. E) Expresión de p-Ser473-Akt 30 min después de la administración de insulina a una dosis de 0,75 U/kg de peso corporal. B, D y F) Cuantificación de p-Akt de A, C y E respectivamente. Los resultados de la cuantificación de p-Akt se representan como la media \pm el error estándar de 5 ratones wt y 6 ratones Dio2^{-/-} para B y 4 ratones wt y 4 ratones Dio2^{-/-} para E y F. Diferencias respecto al grupo wt: NS, no significativo.

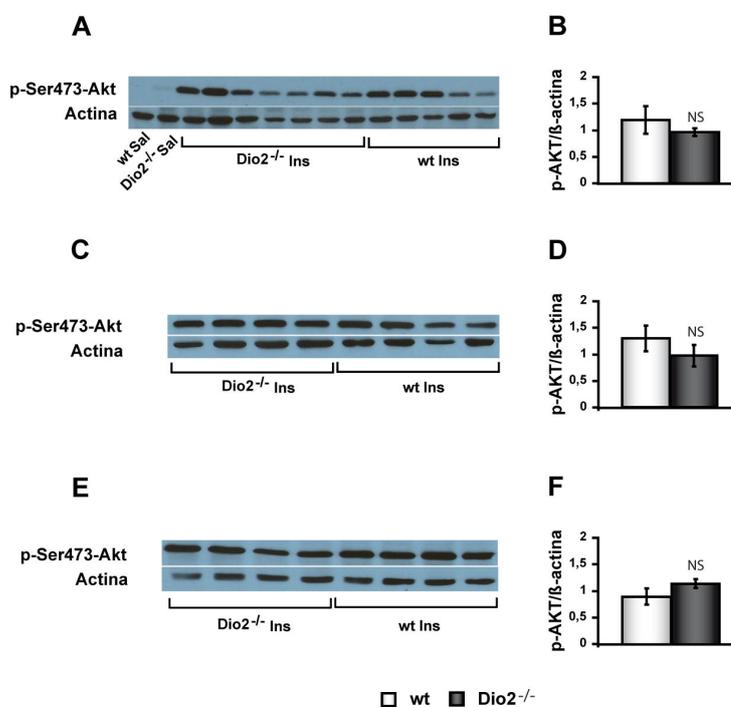


Figura 18. Análisis de la expresión de p-Akt en hígado. A y C) Expresión de p-Ser473-Akt normalizado con β-actina 15 min después de la administración de insulina a una dosis de 0,75 U/kg de peso corporal. E) Expresión de p-Ser473-Akt 30 min después de la administración de insulina a una dosis de 0,75 U/kg de peso corporal. B, D y F) Cuantificación de p-Akt de A, C y E respectivamente. Los resultados de la cuantificación de p-Akt se representan como la media \pm el error estándar de 5 ratones wt y 7 ratones Dio2^{-/-} para B y 4 ratones wt y 4 ratones Dio2^{-/-} para E y F. Diferencias respecto al grupo wt: NS, no significativo.

Los resultados del GTT y del ITT indican anomalías en el metabolismo de la glucosa en los ratones Dio2^{-/-} asociadas a una mayor tolerancia a la glucosa y una mayor sensibilidad a la insulina. Este aumento en la sensibilidad a la insulina no se ha podido asociar a alteraciones en la fosforilación de Akt en respuesta a la insulina, al menos en hígado y músculo.

3. INFLUENCIA DE LA D2 EN PRUEBAS NEUROSENSORIALES Y SENSORIOMOTORAS

3.1. Función auditiva

Estudios previos realizados en el mismo modelo experimental de ratones Dio2^{-/-} a 1 mes de edad habían mostrado una importante pero no total disfunción auditiva (143). Por ello, para el diseño, realización e interpretación de la prueba de condicionamiento del miedo (ver apartado 4.2 de Resultados) era muy importante evaluar la funcionalidad auditiva de los ratones Dio2^{-/-} en comparación con la de los ratones wt a la edad de realización del condicionamiento, en nuestro caso a los 6 meses de edad.

En primer lugar se evaluó la capacidad auditiva de ratones de 6 meses de edad realizando un estudio de los PEATC en respuesta a “click” (espectro de frecuencias audibles). El análisis de los umbrales auditivos en respuesta a “click” mostró una hipoacusia moderada en los ratones Dio2^{-/-} (52 ± 10 dB) estadísticamente significativa en comparación a los valores obtenidos en los ratones wt (11 ± 2 dB; $t_7 = 10,734$; $p = 0,000$) que presentaron valores dentro de la normo-audición (≤ 45 dB; Figura 19 A).

En segundo lugar se realizó un estudio de los PEATC en respuesta a tonos puros (1, 2 y 8 kHz) para establecer la frecuencia más adecuada a utilizar como estímulo sonoro en las pruebas de condicionamiento del miedo. El análisis de los umbrales auditivos en respuesta a frecuencias puras mostró valores de umbral significativamente elevados, entre un 75 y un 155 %, en los ratones Dio2^{-/-} respecto a los ratones wt en las 3 frecuencias analizadas (1 kHz: $t_7 = 10,160$; $p = 0,000$; 2 kHz: $t_6 = 5,915$; $p = 0,001$; 8 kHz: $t_6 = 4,145$; $p = 0,006$; Figura 19 B), mostrando a la frecuencia de 8 kHz la menor diferencia del umbral entre los ratones Dio2^{-/-} y wt.

En tercer lugar se midió la velocidad de conducción del estímulo sonoro a través de los distintos núcleos auditivos. Este estudio indicó graves alteraciones en los ratones Dio2^{-/-} reflejadas en el análisis de tres parámetros: la latencia pico, la latencia interpico y la amplitud. Estos tres parámetros se determinaron mediante una intensidad de estimulación equivalente para todos los ratones

establecida entre 15 y 20 dB por encima del umbral auditivo (recomendable para realizar este tipo de estudios en modelos animales que presentan hipoacusia).

- La latencia pico de la onda I fue significativamente mayor, en un 17 %, en los ratones $Dio2^{-/-}$ ($t_{10}= 4,675$; $p= 0,001$) en comparación con los ratones wt. Este aumento en los valores de latencia pico en los ratones $Dio2^{-/-}$ también se observó en la latencia pico de la onda III (6,5 %; $t_{10}= 2,776$; $p= 0,02$). La latencia pico de la onda II también era un 4,8 % mayor en los ratones $Dio2^{-/-}$, aunque este aumento no era estadísticamente significativo ($t_{10}= 1,458$; $p= 0,176$). En la latencia pico de la onda IV tampoco se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos genotipos ($t_{10}= 0,246$; $p= 0,811$). El aumento de la latencia pico de la onda I en los ratones $Dio2^{-/-}$ sugiere un retraso en la generación de la señal nerviosa en el receptor (Figura 19 C).
- Todas las latencias interpico analizadas (I-II, II-IV y I-IV) estaban disminuidas significativamente en los ratones $Dio2^{-/-}$. La latencia interpico I-II era un 16,3 % menor ($t_{10}= 5,135$; $p= 0,000$), la latencia interpico II-IV un 7,6 % menor ($t_{10}= 3,789$; $p= 0,004$) y la latencia interpico I-IV un 10,4 % menor ($t_{10}= 6,398$; $p= 0,000$; Figura 19 D) en comparación con las latencias interpico de los ratones wt. La disminución de la latencia interpico I-II observada en los ratones $Dio2^{-/-}$ indica una mayor velocidad de transmisión del impulso nervioso a través de la vía auditiva.
- Los valores de amplitud pico de la onda I en los ratones $Dio2^{-/-}$ fueron significativamente inferiores (en un 85 %) a los observados en los ratones wt ($t_{11}= 7,345$; $p= 0,001$), mientras que en la amplitud pico de las ondas II y IV se registró un aumento de un 65,5 % y de un 34,3 % respectivamente en los ratones $Dio2^{-/-}$ ($t_{11}= 2,349$; $p= 0,039$; $t_{11}= 4,897$; $p\leq 0,000$ respectivamente) en comparación con los ratones wt. Sin embargo, la disminución de un 43,5 % de la amplitud pico de la onda III en los ratones $Dio2^{-/-}$ no fue estadísticamente significativa ($t_{11}= 1,565$; $p= 0,146$). Estos resultados sugieren una disminución del número de neuronas estimuladas a nivel del ganglio coclear-nervio auditivo en los ratones $Dio2^{-/-}$ (Figura 19 E) y también anomalías en el número de neuronas estimuladas en núcleos de relevo posteriores.

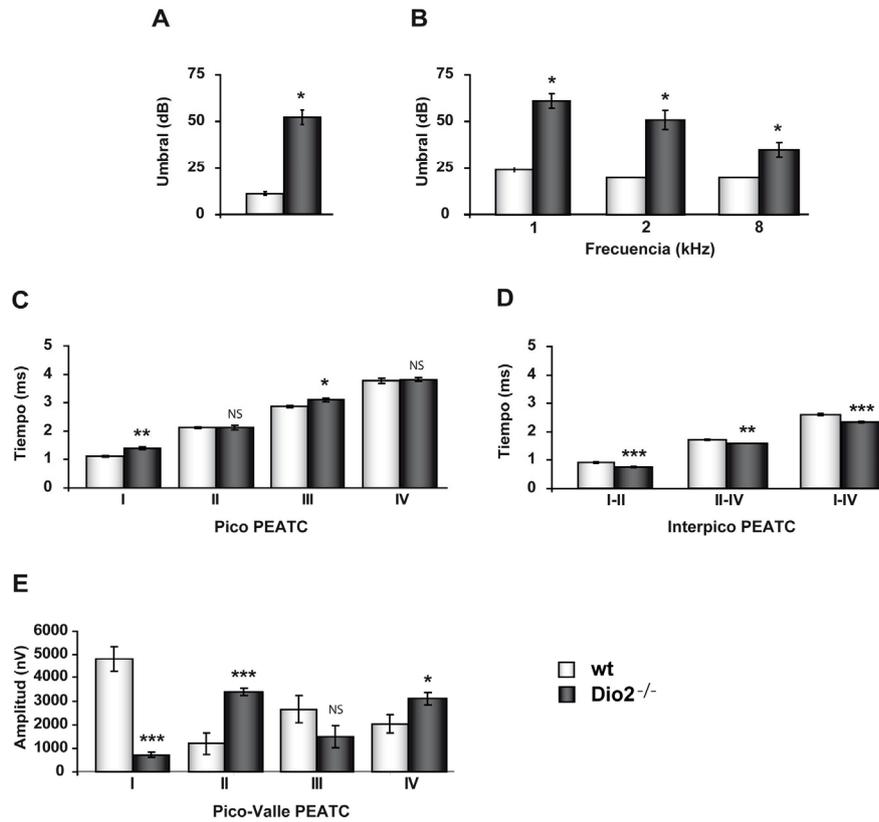


Figura 19. Análisis de la capacidad auditiva. **A)** Umbral auditivo en respuesta a “click”. **B)** Umbral auditivo tras estimulación con tonos puros de 1, 2 y 8 kHz. **C)** Latencia de las ondas I a IV. **D)** Latencias interpico I-II, II-IV y I-IV. **E)** Amplitud de los picos I a IV cuantificados mediante el parámetro pico-valle. Los resultados de los histogramas se representan como la media \pm el error estándar de 6 ratones wt y 7 ratones Dio2^{-/-} de 6 meses de edad. Diferencias respecto al grupo wt: * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; NS, no significativo.

Los resultados obtenidos muestran un mayor umbral auditivo tanto en respuesta a “click” como en respuesta a tonos puros (1, 2 y 8 kHz), un retraso en la generación de la señal nerviosa a nivel del receptor auditivo así como la presencia de un menor número de neuronas activadas en el ganglio coclear de los ratones Dio2^{-/-} en comparación con los wt. Por otra parte, la deficiencia de D2 induce un aumento en la velocidad de transmisión del impulso nervioso a través de la vía auditiva que probablemente se produzca para compensar el retraso de la señal originado a nivel del receptor.

En base a los resultados obtenidos se estableció una intensidad de 80 dB a una frecuencia de 8 kHz como las mejores condiciones para administrar el EC (estímulo sonoro) en el estudio de condicionamiento del miedo (ver apartado 4.2 de Resultados).

3.2 Prueba del rodillo giratorio

Para evaluar posibles alteraciones en la coordinación motora y el equilibrio debidas a la deficiencia de la D2, se realizó la prueba del rodillo giratorio a ratones wt y Dio2^{-/-} de 6 meses de edad. En esta tarea motora se utiliza un rodillo que es capaz de girar según un protocolo establecido (ver apartado 3.2 de Materiales y Métodos). Se coloca a los animales en el rodillo giratorio en la dirección contraria al movimiento y se registra el tiempo en el que cada animal permanece en el rodillo sin caerse (latencia de caída).

En la comparación de medias de cada uno de los ensayos realizados se observaron tiempos de latencia significativamente menores en el grupo Dio2^{-/-} en comparación con el grupo wt, en prácticamente todos los ensayos ($p \leq 0,05$; Figura 20A), a excepción de los 3 ensayos del primer día de entrenamiento y el segundo ensayo del segundo día de la prueba, en los que no se observaron diferencias significativas entre ambos genotipos ($p > 0,05$; Figura 20A). Los análisis estadísticos realizados con el valor del tiempo máximo de permanencia en el rodillo obtenido para cada ratón indicaron que la latencia de caída de los ratones Dio2^{-/-} era significativamente menor respecto a la de los ratones wt (entre un 30,9 y un 38,2 %) en todos los días en los que se realizó la prueba (primer día: $t_{11} = 2,88$; $p = 0,014$, segundo día: $t_{18} = 2,62$; $p = 0,017$ y tercer día: $t_{12} = 3,33$; $p = 0,006$; Figura 20 B).

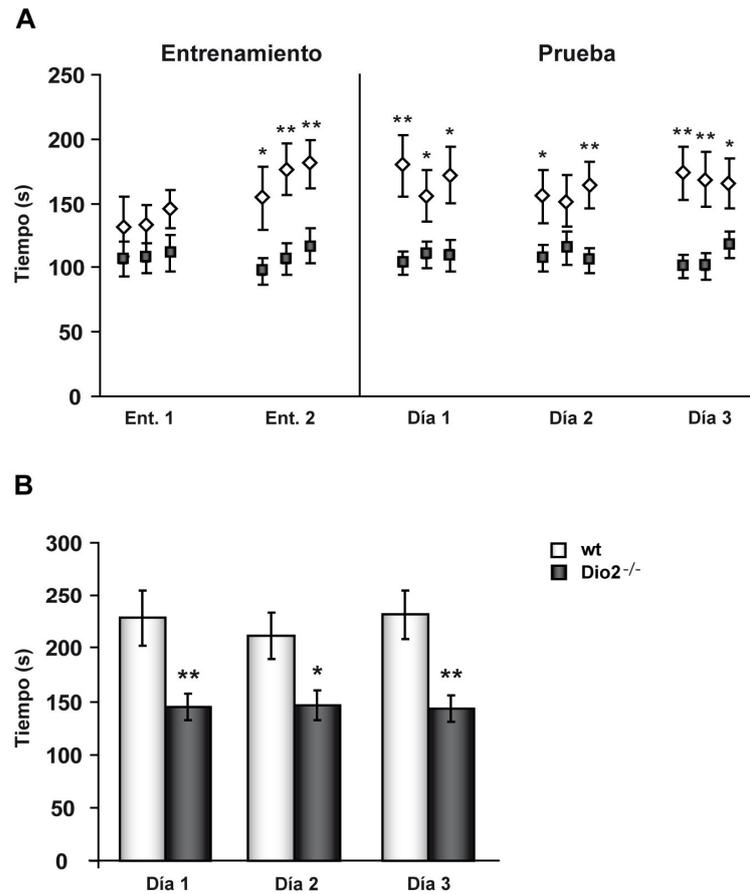


Figura 20. Prueba del rodillo giratorio. **A)** Representación de la latencia de caída de los 3 ensayos realizados en los dos días de entrenamiento y en los 3 días de realización de la prueba. **B)** Representación de los valores máximos de latencia de caída en los 3 días de realización de la prueba. Los resultados se representan como la media \pm el error estándar de 9 ratones wt y 11 ratones Dio2^{-/-} de 6 meses de edad. Diferencias respecto al grupo wt: * p< 0,05; ** p< 0,01.

Posteriormente se quiso evaluar si la administración de un tratamiento con HT a ratones Dio2^{-/-} era capaz de revertir las alteraciones observadas. Para ello, se diseñó un tratamiento hormonal con el fin de normalizar los niveles de T3 y T4 cerebrales sin provocar una hipotiroxinemia (ver apartado 1.2 de Materiales y Métodos). Los tiempos de latencia de caída de los ratones tratados con HT en comparación con el grupo wt eran de nuevo significativamente menores, pero en esta ocasión además, en todos los ensayos realizados ($p \leq 0,01$; Figura 21 A). Esto se debe en parte a que en esta segunda realización de la prueba los ratones wt mostraron el primer día del entrenamiento valores de permanencia en el rodillo superiores a los valores obtenidos en estos mismos animales en el experimento anterior (Figuras 20 A y 21 A). Los análisis estadísticos realizados con el valor del tiempo máximo de permanencia en el rodillo obtenido para cada ratón, también indicaron que la latencia de caída de los ratones Dio2^{-/-} + HT era significativamente menor respecto a la de los ratones

wt (entre un 37,3 y un 43 %) tanto el primer ($t_{11}= 3,26$; $p= 0,008$) como el segundo ($t_{12}= 4,56$; $p= 0,001$) y tercer día de la prueba ($t_{10}= 4,07$; $p= 0,002$; Figura 21 B).

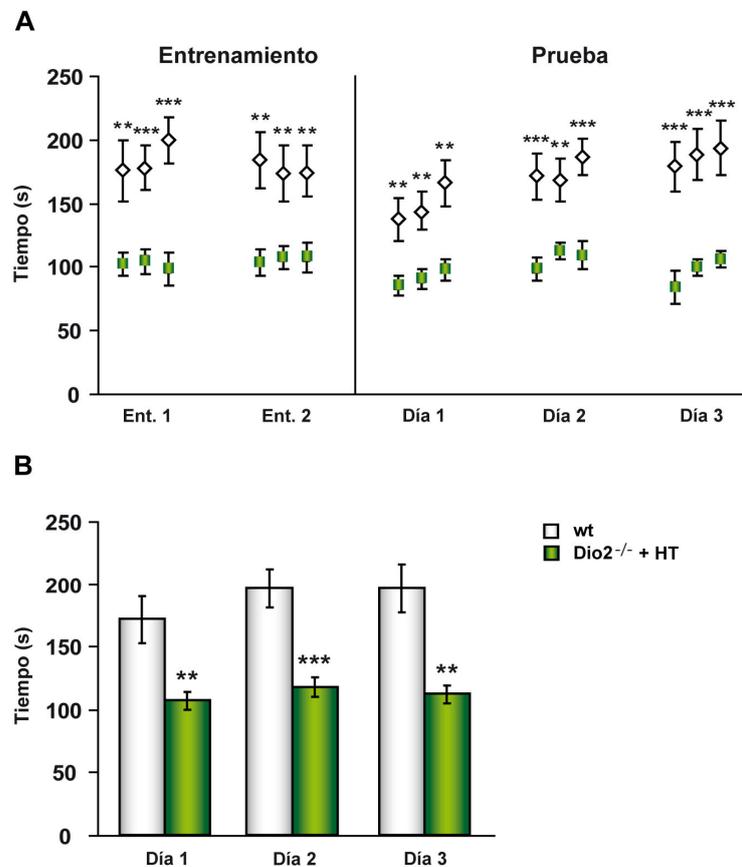


Figura 21. Prueba del rodillo giratorio. A) Representación de la latencia de caída de los 3 ensayos realizados en los dos días de entrenamiento y en los 3 días de realización de la prueba. B) Representación de los valores máximos de latencia de caída en los 3 días de realización de la prueba. Los resultados se representan como la media \pm el error estándar de 9 ratones wt y 11 ratones Dio2^{-/-} + HT de 6 meses de edad. Diferencias respecto al grupo wt: ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Para evaluar si las alteraciones observadas a los 6 meses de edad en los ratones Dio2^{-/-} se debían a anomalías del desarrollo o eran anomalías adquiridas con la edad, se realizó la prueba del rodillo giratorio a ratones de 3 meses de edad wt y Dio2^{-/-} con y sin tratamiento hormonal. En esta ocasión, se realizó la prueba en 3 grupos experimentales distintos y los resultados se analizaron estadísticamente con una ANOVA de una vía. Los análisis de cada uno de los ensayos realizados indicaron un efecto significativo del factor condición experimental para la latencia de caída únicamente en el primer ensayo del primer y segundo día de entrenamiento y del tercer día de prueba ($p \leq 0,05$; Figura 22 A). Los análisis *a posteriori* mostraron que la latencia de caída de los ratones wt y Dio2^{-/-} era similar ($p > 0,05$; Figura 22 A) mientras que la latencia de caída de los ratones Dio2^{-/-} + HT era estadísticamente inferior a la de los grupos wt y Dio2^{-/-} ($p \leq 0,05$; Figura 22 A). Cuando se analizaron los resultados

Resultados

teniendo en cuenta el valor del tiempo máximo de permanencia en el rodillo obtenido para cada ratón, los análisis indicaron que todos los grupos presentaban una latencia de caída similar en los 3 días de la prueba (primer día: $F_{2,29} = 1,048$; $p = 0,364$, segundo: $F_{2,29} = 2,461$; $p = 0,103$ y el tercer día de la prueba: $F_{2,29} = 3,138$; $p = 0,058$; Figura 22 B).

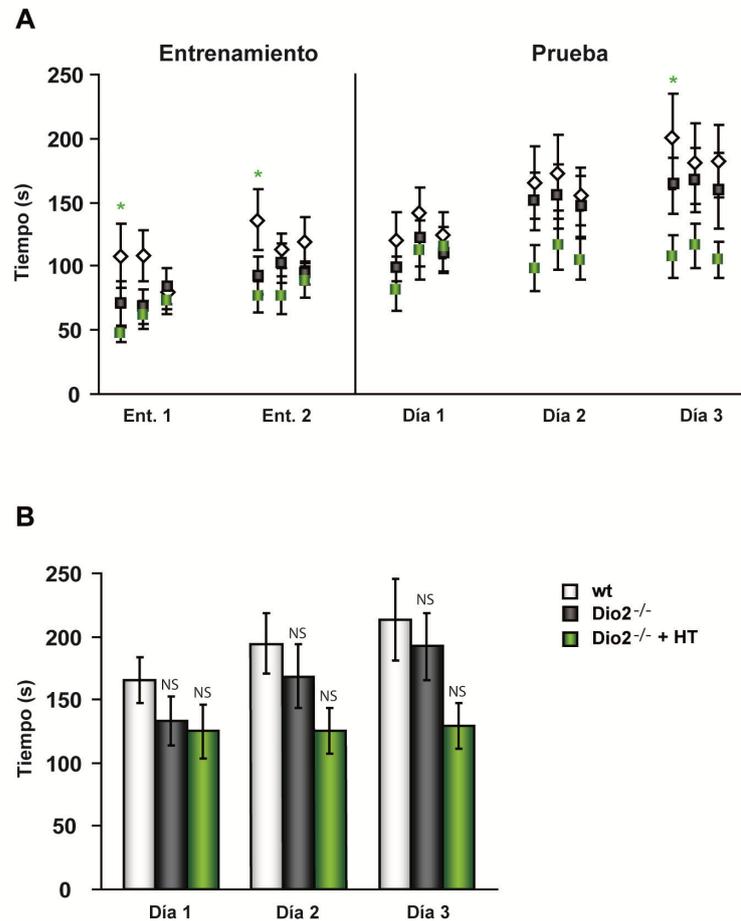


Figura 22. Prueba del rodillo giratorio. A) Representación de la latencia de caída de los 3 ensayos realizados en los dos días de entrenamiento y en los 3 días de realización de la prueba. B) Representación de los valores máximos de latencia de caída en los 3 días de realización de la prueba. Los resultados se representan como la media \pm el error estándar de 9 ratones wt, 11 ratones Dio2^{-/-} y 12 ratones Dio2^{-/-} + HT de 3 meses de edad. Diferencias respecto al grupo wt: * $p < 0,05$; NS, no significativo. Diferencias respecto al grupo Dio2^{-/-}: NS, no significativo.

Los resultados obtenidos muestran una grave alteración en la coordinación motora y/o equilibrio en los ratones Dio2^{-/-} a 6 meses de edad que repercute en la realización de la prueba. Sin embargo, la coordinación motora y el equilibrio de los ratones Dio2^{-/-} a 3 meses de edad no se encuentra alterada por la deficiencia de D2. Esto podría indicar que estas alteraciones se adquieren y/o agravan con la edad. El tratamiento hormonal utilizado no es capaz de revertir las alteraciones provocadas por la deficiencia de D2 en la realización de esta tarea motora a los 6 meses de edad.

3.3 Prueba del poste vertical

Para profundizar en los resultados obtenidos con los estudios anteriores se realizó una nueva tarea motora en animales de 3 y 6 meses de edad, la prueba del poste vertical. Esta tarea se utilizó para evaluar si la deficiencia de D2 alteraba el equilibrio, la fuerza de las extremidades anteriores y la habilidad de los ratones para agarrarse firmemente a una superficie. En esta tarea motora se coloca a los animales en un poste vertical con la cabeza posicionada hacia arriba y se valoran 3 parámetros: el porcentaje de ratones que son capaces de girar con éxito para descender, el tiempo que necesita cada animal para girar y el tiempo que emplea cada animal en descender.

El porcentaje de ratones que eran capaces de girar con éxito no estaba alterado por la deficiencia de D2 ni a 3 ni a 6 meses de edad ($p > 0,05$ en todos los ensayos realizados; Figura 23 A y B). Los ratones $Dio2^{-/-}$ de 3 meses de edad empleaban el mismo tiempo en girar y en descender por el poste que los ratones wt ($p > 0,05$ en todos los ensayos; Figura 23 C y D). A los 6 meses, tampoco se observaron diferencias en el tiempo que empleaban los ratones en girar entre ambos grupos experimentales ($p > 0,05$ en todos los ensayos; Figura 23 C). A los 6 meses de edad tampoco se observaron claras diferencias entre ambos genotipos en el tiempo que empleaban los animales para descender por el poste. Mientras que el primer día de la prueba los ratones $Dio2^{-/-}$ empleaban un tiempo para descender significativamente mayor ($t_{15} = 2,331$; $p = 0,034$; Figura 23 D) que los animales wt, el segundo día descendían empleando un tiempo menor en comparación con los ratones wt, sin que esta disminución fuera estadísticamente significativa ($t_{18} = 1,098$; $p = 0,287$; Figura 23 D).

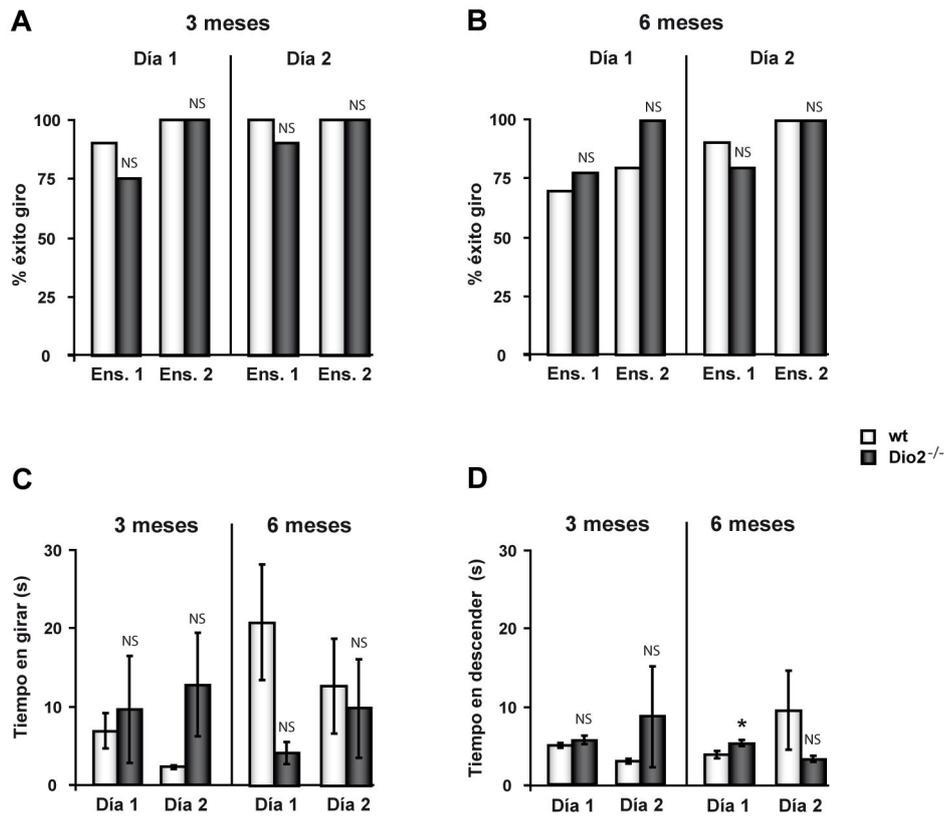


Figura 23. Prueba del poste vertical. **A)** Porcentaje de ratones de 3 meses de edad que son capaces de girar con éxito para descender. **B)** Porcentaje de ratones de 6 meses de edad que son capaces de girar con éxito para descender. **C)** Latencia de giro en ratones de 3 y 6 meses de edad. **D)** Latencia en descender en ratones de 3 y 6 meses de edad. Los resultados obtenidos de ratones de 3 meses (n=10 wt y n=9 Dio2^{-/-}) y 6 meses (n=11 wt y n=10 Dio2^{-/-}) de edad se representan en las figuras C y D como la media ± error estándar. Diferencias respecto al grupo wt: * p < 0,05; NS, no significativo

Estos resultados indican que la deficiencia de D2 no repercute ni en el equilibrio, ni en la habilidad de los animales para agarrarse firmemente a una superficie, ni tampoco parece provocar anomalías en la fuerza muscular de las extremidades anteriores. Sin embargo, hay que tener en cuenta que los parámetros cuantificados mostraron valores muy variables dentro del mismo grupo experimental, lo que posiblemente haya influido en gran medida en el análisis estadístico de los resultados.

3.4 Prueba de la reja

Esta prueba se realizó a ratones wt y $Dio2^{-/-}$ de 3 y 6 meses de edad para evaluar posibles alteraciones en el tono o fuerza muscular debidas a la deficiencia de D2. En esta prueba se evalúa el tiempo que son capaces los animales de permanecer agarrados a una reja una vez que ésta se ha colocado en posición invertida.

En la comparación de medias se observó que los ratones $Dio2^{-/-}$ de 3 y 6 meses de edad permanecían significativamente menos tiempo agarrados a la reja (un 31,5 % y un 46,8 % respectivamente) que los ratones wt (3 meses: $t_8= 2,4$; $p= 0,043$; 6 meses: $t_{19}= 3,03$; $p= 0,007$; Figura 24 A).

Se quiso evaluar si un tratamiento con HT en los mismos animales era capaz de revertir las alteraciones observadas debidas a la deficiencia de D2. Se utilizó el mismo protocolo de tratamiento hormonal que en el resto de estudios (ver apartado 1.2 de Materiales y Métodos). Los ratones $Dio2^{-/-}$ + HT de 3 y 6 meses de edad permanecían agarrados a la reja un tiempo significativamente menor (un 51,7 % y un 59,8 % respectivamente) que los ratones del grupo wt (3 meses: $t_9= 3,895$; $p= 0,004$; 6 meses: $t_{18}= 2,804$; $p= 0,012$; Figura 24 B).

Se analizó si la repetición de la prueba podía influir en el tiempo de agarre de los animales comparando los resultados obtenidos en los dos días de prueba con los ratones wt. No se encontraron diferencias significativas en el tiempo de agarre entre los 2 ensayos realizados ni a 3 ($t_9= 1$; $p= 0,343$) ni a 6 meses de edad ($t_{23}= 1,145$; $p= 0,264$). Estos resultados descartan que la repetición de la prueba en los mismos animales pudiera afectar a la evaluación de la misma.

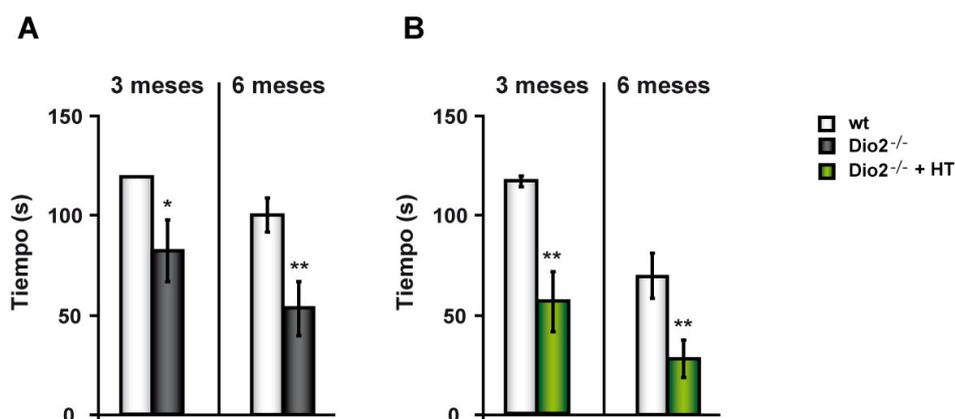


Figura 24. Prueba de la reja. A) Latencia de caída de la reja una vez invertida. Los resultados se representan como la media \pm el error estándar de 10-11 ratones wt y 9-10 ratones $Dio2^{-/-}$ de 3 y 6 meses de edad respectivamente. B) Latencia de caída de la reja una vez invertida. Los resultados se representan como la media \pm el error estándar de 10-11 ratones wt y 9-10 ratones $Dio2^{-/-}$ + HT de 3 y 6 meses de edad respectivamente. Diferencias respecto al grupo wt: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Estos resultados sugieren que la D2 tiene un papel muy importante para el correcto desarrollo de la fuerza muscular tanto a 3 como a 6 meses de edad y que el tratamiento hormonal utilizado no es capaz de revertir las alteraciones observadas.

3.5 Prueba de la impronta de pisadas

La prueba de la impronta de pisadas evalúa el patrón de la marcha de los animales y depende de un buen funcionamiento de distintas regiones cerebrales como el CB, los ganglios basales y la CTX. Esta prueba se utilizó para evaluar posibles alteraciones en la actividad locomotora de animales de 3 y 6 meses de edad debidas a la deficiencia de la D2. También se analizó la posible reversión de estas anomalías con un tratamiento con HT (ver apartado 1.2 de Materiales y Métodos).

Para ello se midieron 5 parámetros relacionados con la marcha: la distancia entre las pisadas de las extremidades anteriores y posteriores, el largo de la zancada de las extremidades anteriores y de las posteriores así como el solapamiento de las pisadas. También se midió la velocidad con la que los ratones recorrían el pasillo hasta el habitáculo oscuro (ver apartado 3.5 de Materiales y Métodos). Los resultados de todos estos parámetros se analizaron estadísticamente con un ANOVA de una vía y cuando se requirió se realizaron análisis *a posteriori* (Tabla 2).

ANOVA						
	A	B	C	D	E	F
3 meses	F _{2,71} = 52,003 p= 0,000	F _{2,71} = 4,853 p= 0,011	F _{2,71} = 11,150 p= 0,000	F _{2,71} = 9,495 p= 0,000	F _{2,71} = 6,056 p= 0,014	F _{2,71} = 4,509 p= 0,004
6 meses	F _{2,52} = 46,404 p= 0,000	F _{2,52} = 1,789 p= 0,177	F _{2,52} = 6,749 p= 0,02	F _{2,52} = 8,911 p= 0,000	F _{2,52} = 11,928 p= 0,000	F _{2,52} = 1,662 p= 0,2

Tabla 2. Valores del estudio estadístico de la impronta de pisadas. A) Velocidad empleada por cada animal en recorrer los 70 cm del pasillo. B) Amplitud entre las pisadas de las extremidades anteriores. C) Amplitud entre las pisadas de las extremidades posteriores. D) Longitud de la zancada anterior. E) Longitud de la zancada posterior. F) Solapamiento de pisadas de una huella delantera con la huella trasera.

Los análisis realizados indicaron que los ratones Dio2^{-/-} recorrían el pasillo un 41,7 % y un 46,5 % más lentamente que los ratones wt, tanto a 3 como a 6 meses de edad (p< 0,001; Figura 25 A y 26 A). La distancia entre las extremidades anteriores y posteriores a 3 meses de edad era un 12,8 % mayor en los ratones Dio2^{-/-} en comparación con los ratones wt (p < 0,05; Figura 25 B y C). A 6 meses de edad la distancia entre de ambas extremidades también estaba aumentada en los ratones Dio2^{-/-} (un 7,9 %)

siendo estadísticamente significativo el aumento de las extremidades posteriores ($p < 0,01$; Figura 26 B y C).

La longitud de la zancada anterior estaba significativamente disminuida un 7,8 % y un 8,7 % en los ratones $Dio2^{-/-}$ tanto a 3 como a 6 meses de edad respectivamente en comparación con los ratones wt ($p < 0,01$; Figura 25 D y 26 D). Sin embargo, la disminución de la longitud de la zancada posterior en los ratones $Dio2^{-/-}$ era mayor a 6 meses (un 9,9 %; $p < 0,001$; Figura 26 E) que a 3 meses de edad (un 7,3 %; $p < 0,01$; Figura 25 E). Los ratones wt tenían mayor solapamiento de las huellas delanteras y traseras de un mismo paso que los ratones $Dio2^{-/-}$, sin embargo, estas diferencias no eran estadísticamente significativas ($p > 0,05$; Figura 25 F y 26 F).

La administración de un tratamiento hormonal con HT a ratones $Dio2^{-/-}$ no revirtió ninguno de los parámetros alterados por la deficiencia de D2, ni a 3 ni a 6 meses de edad (Figuras 25 y 26).

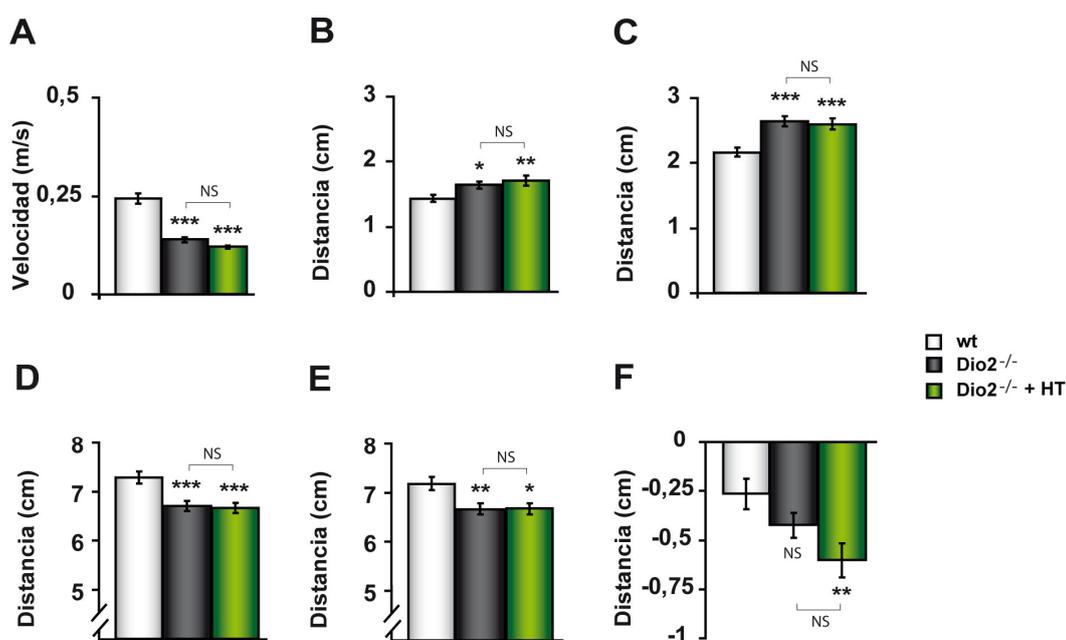


Figura 25. Prueba de la imprenta de pisadas en ratones de 3 meses de edad. A) Velocidad empleada por cada animal en recorrer los 70 cm del pasillo. B) Amplitud entre pisadas de las extremidades anteriores. C) Amplitud entre las pisadas de las extremidades posteriores. D) Longitud de la zancada anterior. E) Longitud de la zancada posterior. F) Solapamiento de pisadas de una huella delantera con una huella trasera. Los resultados se representan como la media \pm el error estándar de 23 ratones wt, 30 ratones $Dio2^{-/-}$ y 21 ratones $Dio2^{-/-}$ + HT. Diferencias respecto al grupo wt: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; NS, no significativo. Diferencias respecto al grupo $Dio2^{-/-}$: NS, no significativo.

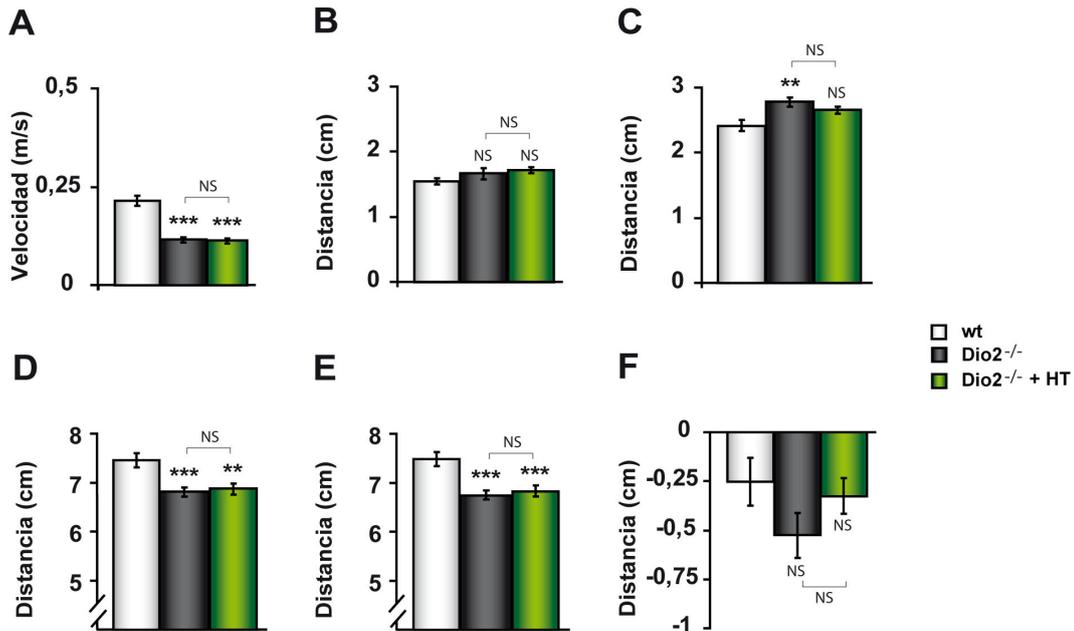


Figura 26. Prueba de la impronta de pisadas en ratones de 6 meses de edad. **A)** Velocidad a la que los ratones recorren el pasillo. **B)** Amplitud entre las pisadas de las extremidades anteriores. **C)** Amplitud entre las pisadas de las extremidades posteriores. **D)** Longitud de la zancada anterior. **E)** Longitud de la zancada posterior. **F)** Solapamiento de pisadas de una huella delantera con una huella trasera. Los resultados se representan como la media \pm el error estándar de 16 ratones wt, 19 ratones Dio2^{-/-} y 20 ratones Dio2^{-/-} + HT. Diferencias respecto al grupo wt: * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; NS, no significativo. Diferencias respecto al grupo Dio2^{-/-}: NS, no significativo.

Los resultados obtenidos indican una alteración a nivel locomotor en los ratones Dio2^{-/-} tanto a 3 como a 6 meses de edad, reflejada en una mayor distancia entre las extremidades tanto anteriores como sobre todo posteriores, así como una menor longitud de la zancada de ambas extremidades. Además, los ratones Dio2^{-/-} recorren el pasillo a una menor velocidad en comparación a los ratones wt. El tratamiento con HT utilizado no es suficiente para revertir las alteraciones descritas en los ratones Dio2^{-/-}.

3.6 Función neuromuscular

Para evaluar si las alteraciones observadas por la deficiencia de D2 en los estudios anteriores podían deberse a anomalías en la conducción nerviosa, se evaluó la velocidad de conducción nerviosa en ratones wt y Dio2^{-/-} de 3 y 6 meses de edad en el nervio ciático.

Para el cálculo de la velocidad de conducción nerviosa en primera instancia, se realizó la medición de varias distancias a partir de puntos de referencia (ciático-rótula, rótula-calcáneo, calcáneo-electrodo de registro en la extremidad y ciático-médula). No se observaron diferencias significativas en la medición de las distancias analizadas entre ambos grupos experimentales, ni a 3 ni a 6 meses de edad ($p > 0,05$ para todas las distancias; Tabla 3).

		Distancias (mm)			
		Ci-Ro	Ro-Ca	Ca-Ex	Ci-Me
3 meses	wt (n=6)	15,86 ± 0,5	13,73 ± 0,87	9,11 ± 0,34	5,80 ± 0,19
	Dio2 ^{-/-} (n=6)	15,36 ± 0,05 ^{NS}	14,77 ± 0,14 ^{NS}	7,11 ± 0,54 ^{NS}	6,49 ± 0,42 ^{NS}
6 meses	wt (n=7)	14,77 ± 0,28	15,06 ± 0,24	7,03 ± 0,28	5,77 ± 0,25
	Dio2 ^{-/-} (n=7)	15,3 ± 0,33 ^{NS}	15,54 ± 0,34 ^{NS}	7 ± 0,13 ^{NS}	6,84 ± 0,23 ^{NS}

Tabla 3. Valores de las distintas medidas de referencia. Las medidas de referencia utilizadas son: ciático-rótula (Ci-Ro), rótula-calcáneo (Ro-Ca), calcáneo-electrodo de registro en la extremidad (Ca-Ex) y ciático-médula (Ci-Me). Los resultados se muestran como el promedio ± error estándar. Diferencias respecto al grupo wt: NS, no significativo.

El análisis de las latencias, considerando la latencia como el tiempo que discurre desde que se produce la estimulación hasta la detección de la actividad eléctrica en los puntos de registro, no mostró diferencias significativas ni en la latencia de la onda directa ni en la latencia de la onda indirecta en ambas edades entre el grupo wt y el grupo Dio2^{-/-} ($p > 0,05$; Tabla 4).

		Latencias (ms)	
		Onda directa	Onda refleja
3 meses	wt (n=6)	0,32 ± 0	2,5 ± 0,08
	Dio2 ^{-/-} (n=6)	0,35 ± 0,0 ^{NS}	2,77 ± 0,10 ^{NS}
6 meses	wt (n=7)	0,32 ± 0	2,75 ± 0,15
	Dio2 ^{-/-} (n=7)	0,35 ± 0,02 ^{NS}	2,72 ± 0,08 ^{NS}

Tabla 4. Valores de latencia promedio de la onda directa y la onda indirecta. Los resultados muestran el promedio ± el error estándar de 6 ratones wt y 6 ratones Dio2^{-/-} de 3 meses de edad y de 7 ratones wt y 7 ratones Dio2^{-/-} de 6 meses de edad. Diferencias respecto al grupo wt: NS, no significativo.

del grupo wt, tanto a 3 como a 6 meses de edad. En la conducción nerviosa de la onda refleja tampoco se observaron diferencias significativas como consecuencia de la deficiencia de D2 en ratones de 3 y 6 meses de edad ($p > 0,05$; Tabla 5).

		Velocidad de conducción (m/s)	
		Onda directa	Onda refleja
3 meses	wt (n=6)	120,7 ± 4,55	20,18 ± 0,82
	Dio2 ^{-/-} (n=6)	110,03 ± 2,36 ^{NS}	18,22 ± 0,81 ^{NS}
6 meses	wt (n=7)	114,68 ± 1,12	17,7 ± 0,96
	Dio2 ^{-/-} (n=7)	111,1 ± 6,16 ^{NS}	18,4 ± 0,72 ^{NS}

Tabla 5. Valores de la velocidad de conducción de la onda directa y la onda refleja. Los resultados muestran el promedio ± el error estándar de 6 ratones wt y 6 ratones Dio2^{-/-} de 3 meses de edad y de 7 ratones wt y 7 ratones Dio2^{-/-} de 6 meses de edad. Diferencias respecto al grupo wt: NS, no significativo.

La velocidad de conducción nerviosa en el nervio ciático tanto de la onda directa (motora) como de la onda refleja (sensorial-motora) no se ve alterada por la deficiencia de D2. La deficiencia de D2 tampoco provoca alteraciones en el tamaño corporal del ratón que se reflejen en anomalías de las distancias anatómicas analizadas.

4. INFLUENCIA DE LA D2 EN PRUEBAS COGNITIVAS

Estudios recientes del laboratorio han indicado que se requieren niveles eutiroideos de HT para que se desarrollen con normalidad distintos procesos de plasticidad cerebral en el cerebro adulto. Debido a las anomalías encontradas en los niveles de HT en las distintas regiones cerebrales estudiadas en los animales $Dio2^{-/-}$, decidimos evaluar el impacto de la deficiencia de D2 en distintos procesos de plasticidad del SNC adulto. En concreto, decidimos evaluar distintas capacidades de aprendizaje y memoria y procesos de plasticidad sináptica subyacentes a estas capacidades que se encuentran alteradas por un hipotiroidismo establecido en el adulto.

4.1 Prueba de Barnes

La prueba de Barnes se utiliza para evaluar capacidades de aprendizaje y memoria espacial y es dependiente de un buen funcionamiento de la HPC. Esta prueba se caracteriza por requerir poco esfuerzo físico, únicamente el requerido para explorar y encontrar el agujero de salida.

Esta prueba se realizó en ratones de 6 meses de edad wt y $Dio2^{-/-}$ entrenados durante tres días. Durante el periodo de entrenamiento la comparación de las medias del número de errores primarios (número de errores que cometen los ratones antes de encontrar el agujero donde está la salida) no mostró diferencias estadísticamente significativas entre ambas condiciones experimentales, tanto en el primer ($t_{15}= 0,619$; $p= 0,545$), como en el segundo ($t_{15}= 1,991$; $p= 0,065$) y tercer ($t_8= 1,866$; $p= 0,097$) día de entrenamiento (Figura 27 A). La comparación de las medias del número de errores primarios más el número de errores secundarios (número de errores que cometen los ratones después de encontrar el agujero donde está la salida) mostró que los ratones $Dio2^{-/-}$ cometían significativamente más errores en comparación a los ratones wt en el segundo ($t_9= 2,214$; $p= 0,053$) y tercer ($t_7= 2,424$; $p= 0,044$) día de entrenamiento pero no en el primero ($t_{15}= 1,527$; $p= 0,148$; Figura 27 B). Los análisis de la evolución de las curvas de errores primarios así como la evolución de las curvas de los errores primarios más secundarios en los 3 días de entrenamiento, no mostraron diferencias significativas entre ambos genotipos ($\chi^2_2= 0,647$; $p= 0,724$ y $\chi^2_2= 2,718$; $p= 0,257$ respectivamente; Figuras 27 A y B) analizando los resultados con un MLG de medidas repetidas.

Transcurridas 24 h desde la finalización del periodo de entrenamiento se procedió a la realización de la prueba. Para ello se tapó la salida que los ratones habían aprendido a localizar durante las sesiones de entrenamiento y se observó el comportamiento de los ratones durante 2 min. No se encontraron diferencias significativas entre los ratones wt y $Dio2^{-/-}$ en el número de errores primarios ($t_{17}= 0,174$; $p= 0,864$; Figura 27 C). Sin embargo, los ratones wt exploraron el doble de veces el agujero donde estaba situada la salida ($t_{17}= 2,839$; $p= 0,011$; Figura 27 D) en comparación con los ratones $Dio2^{-/-}$. Así mismo, los ratones wt también exploraron más del doble de veces los demás

Resultados

agujeros después de haber explorado el agujero de la salida ($t_{17}= 3,282$; $p= 0,004$; Figura 27 E). Los ratones $Dio2^{-/-}$ permanecieron un 18,8 % más de tiempo en el cuadrante dónde se encontraba la salida durante las sesiones de entrenamiento (Q1) que los ratones wt, sin que este aumento fuese estadísticamente significativo ($t_9= 1,041$; $p= 0,325$; Figura 27 F).

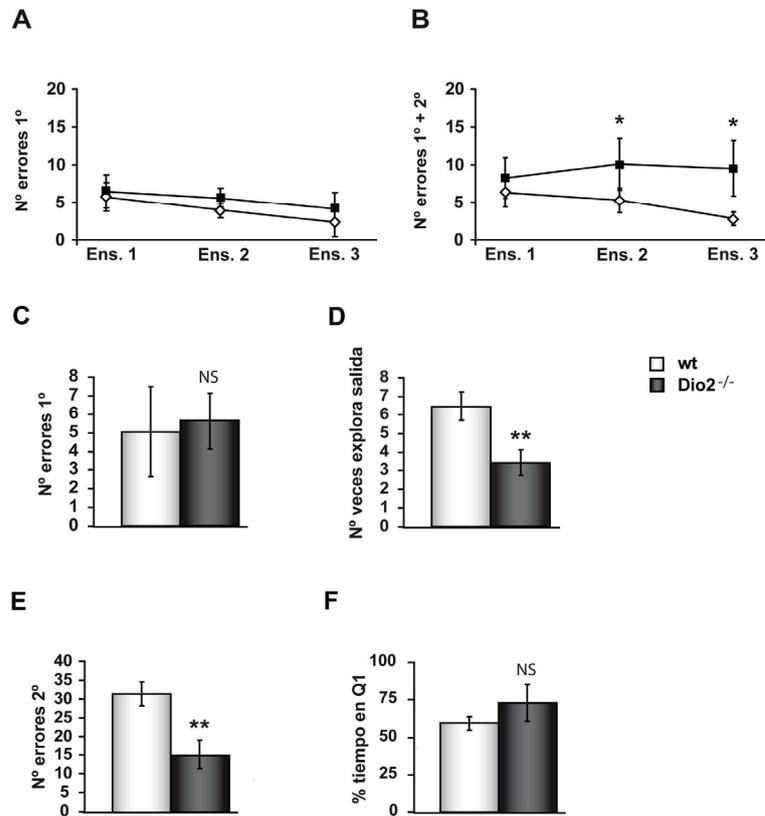


Figura 27. Prueba de Barnes. A) Número de errores primarios durante las sesiones de entrenamiento. B) Número de errores primarios más secundarios cometidos durante las sesiones de entrenamiento. C) Número de errores que cometen los ratones antes de encontrar el agujero de salida en la prueba. D) Número de veces que los ratones exploran el agujero de salida en la prueba. E) Número de errores que cometen los ratones después de encontrar el agujero de salida en la prueba. F) Porcentaje de tiempo que los ratones permanecen en el cuadrante 1 (Q1) en la prueba. Los resultados se representan como la media \pm el error estándar de 9 ratones wt y 10 ratones $Dio2^{-/-}$. Diferencias respecto al grupo wt: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; NS, no significativo.

Estos resultados indican que la deficiencia de D2 no produce alteraciones en esta tarea de aprendizaje y memoria espacial. Sin embargo, la capacidad exploratoria de los ratones $Dio2^{-/-}$ es mucho menor que la de los ratones wt. Además, los ratones $Dio2^{-/-}$ parecen no ser capaces o no estar interesados en desarrollar una nueva estrategia para buscar una escapatoria para refugiarse ante una situación a priori desapacible para los animales.

4.2 Prueba de condicionamiento del miedo

Para evaluar si la deficiencia de D2 podía afectar la formación y el procesamiento de memorias emocionales se realizaron las pruebas de condicionamiento del miedo al contexto y al tono en ratones de 6 meses de edad wt y $Dio2^{-/-}$. En esta prueba los ratones deben aprender a tener miedo ante un estímulo inocuo o estímulo condicionado (EC, en este caso un contexto o un tono) al asociarlo con un estímulo aversivo o estímulo no condicionado (ENC, en este caso una descarga eléctrica). En el momento en que los animales son expuestos de nuevo al contexto o al tono muestran una respuesta de miedo condicionado expresada como inmovilización del animal. El condicionamiento al tono depende de un correcto funcionamiento de la amígdala, mientras que el condicionamiento al contexto es sensible a lesiones producidas tanto en la amígdala como en la HPC (156).

Como se indica en el apartado 3.1 de Resultados, mediante la evaluación de la capacidad auditiva de los ratones $Dio2^{-/-}$ se diseñó el protocolo de administración del estímulo sonoro (EC) a utilizar en la prueba del condicionamiento.

También se comprobó si la deficiencia de D2 podía influir en la respuesta de los animales a la descarga eléctrica utilizada como estímulo aversivo (ENC) mediante la prueba de la sensibilidad a la descarga eléctrica. La evaluación de esta prueba se realizó analizando dos parámetros, el “flinch” y el “jump”. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en la sensibilidad a la descarga eléctrica entre ambos genotipos (“flinch”: $t_{15} = 0,178$; $p = 0,861$; “jump”: $t_{14} = 1,452$; $p = 0,179$; Figura 28).

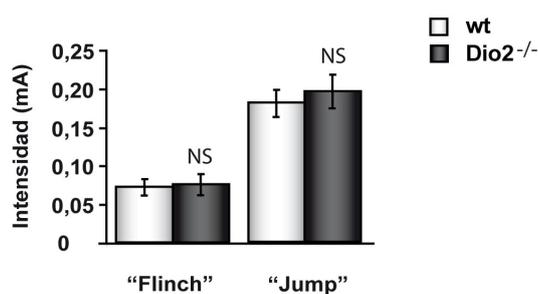


Figura 28. Prueba de sensibilidad a la descarga eléctrica. Representación de la sensibilidad a la descarga eléctrica mediante el “flinch” (movimiento sutil que realiza el ratón en el momento que empieza a detectar la descarga eléctrica) y el “jump” (salto realizado por el ratón en el momento que la descarga eléctrica produce una sensación aversiva). Los resultados se representan como la media \pm el error estándar de 9 ratones wt y 8 ratones $Dio2^{-/-}$ de 6 meses de edad. Diferencias respecto al grupo wt: NS, no significativo.

Una vez descartadas posibles diferencias en la sensibilidad a la descarga eléctrica, los ratones se sometieron a las sesiones de entrenamiento en las que se condicionaron tanto al tono como al contexto en el que se encontraban. No se observaron diferencias entre ambos genotipos en el

Resultados

entrenamiento (pre-descarga: ningún ratón presentó respuesta de inmovilización; post-descarga: $t_{15}=0,546$; $p=0,593$; Figura 29 A).

La prueba de condicionamiento del miedo al contexto se realizó 24 h después del entrenamiento (Figura 29 B). En esta prueba, cuando se volvieron a exponer los ratones al contexto la respuesta de inmovilización no se vio alterada por la deficiencia de D2 ($t_{15}=0,605$; $p=0,874$; Figura 29 B).

La prueba de condicionamiento del miedo al tono se realizó 48 h después del entrenamiento. No se observaron diferencias significativas entre los grupos durante los periodos pre-ono ($t_{12}=1,324$; $p=0,210$; Figura 29 C). Sin embargo, en presencia del tono los ratones $Dio2^{-/-}$ mostraron unos niveles de inmovilidad significativamente superiores en un 22 % en comparación con los ratones wt ($t_{15}=0,986$; $p=0,028$; Figura 29 C).

Posteriormente se evaluó la influencia de la deficiencia de la D2 en el proceso de extinción de la memoria de miedo. En ambos grupos experimentales la respuesta de inmovilización fue disminuyendo tras las 3 sesiones de extinción realizadas, alcanzándose un nivel de completa extinción en la tercera sesión (nivel de respuesta de inmovilización inferior al 20 %; Figura 29 D). La comparación de las medias de la respuesta de inmovilización mostró que no había diferencias debidas a la deficiencia de D2 ni en la primera ($t_{15}=0,913$; $p=0,376$), segunda ($t_{15}=1,606$; $p=0,129$) ni tercera ($t_{13}=0,245$; $p=0,810$; Figura 29 D) sesión de extinción. Los análisis de la evolución de las curvas de la respuesta de inmovilización durante las 3 sesiones de extinción, no mostraron diferencias significativas entre ambos genotipos ($\chi^2_2=1,631$; $p=0,442$) analizando los resultados con un MLG de medidas repetidas.

Tras la extinción de la respuesta de condicionamiento del miedo existe el fenómeno denominado recuperación espontánea de la memoria del miedo condicionado (30). Este fenómeno aparece en un periodo de tiempo corto después de la aplicación del protocolo de extinción. La recuperación espontánea se evaluó transcurridos 7 días desde la última sesión de extinción, exponiendo a los animales nuevamente al tono en el mismo contexto en el que realizaron las sesiones de extinción. La respuesta de inmovilización del grupo $Dio2^{-/-}$ era estadísticamente mayor de un 50 % de la respuesta observada en el grupo wt en presencia del tono (pre-ono: ningún ratón presentó respuesta de inmovilización; post-ono: $t_{15}=3,155$; $p=0,007$; Figura 29 E).

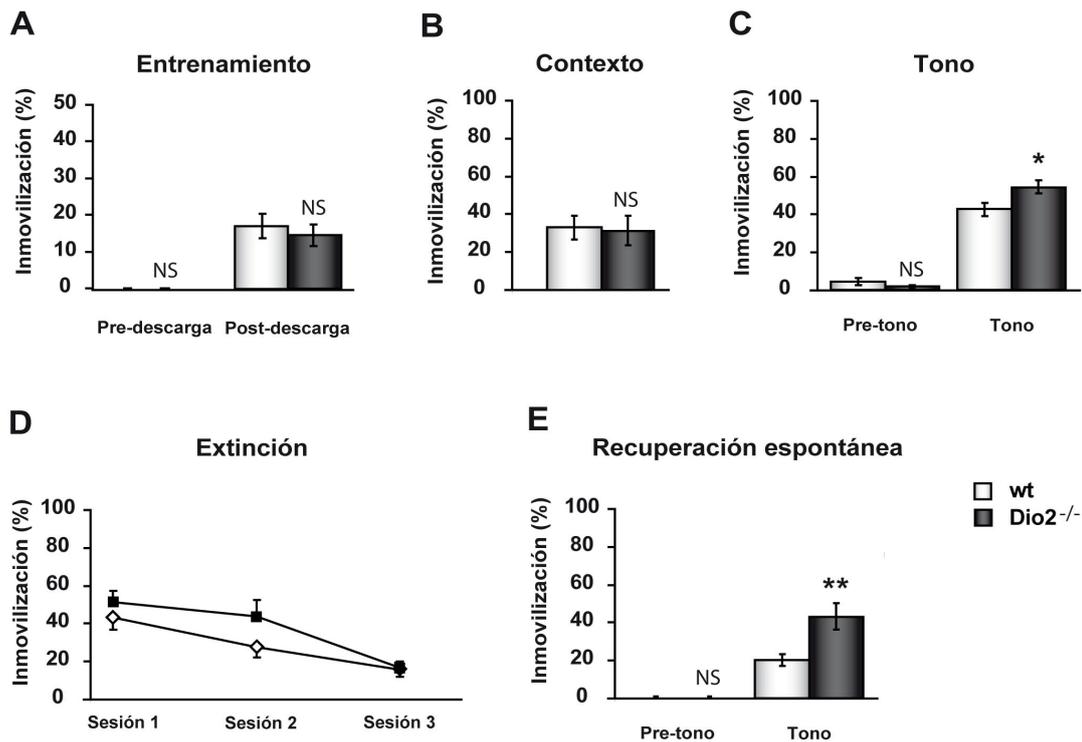


Figura 29. Prueba de condicionamiento del miedo. A) Entrenamiento para asociar el tono a la descarga eléctrica. B) Prueba de condicionamiento del miedo al contexto. C) Prueba de condicionamiento del miedo al tono. D) Sesiones de extinción. E) Prueba de la recuperación espontánea de la memoria del miedo condicionado. Los resultados se representan como la media de la respuesta de inmovilización \pm el error estándar de 9 ratones wt y 8 ratones Dio2^{-/-}. Diferencias respecto al grupo wt: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; NS, no significativo.

La explicación de los resultados obtenidos en la prueba de condicionamiento del miedo podrían deberse a una desregulación en el eje HHA. Para evaluar el funcionamiento del eje HHA se utilizó un segundo grupo experimental formado por ratones wt y Dio2^{-/-} de 6 meses de edad. A este nuevo grupo de ratones se les realizó un estrés físico que consistió en una descarga eléctrica de 0,7 mA idéntica a la utilizada en el condicionamiento del miedo. Tras la descarga se monitorizaron los niveles de corticosterona plasmáticos durante 90 min a distintos tiempos. La comparación de las medias de los niveles de corticosterona para cada uno de los tiempos analizados únicamente mostró diferencias estadísticamente significativas a los 15 min, observándose valores de corticosterona disminuidos un 39 % en los ratones Dio2^{-/-} ($t_{11} = 2,168$; $p = 0,052$; Figura 30 A). Los niveles de corticosterona en sangre de los ratones Dio2^{-/-}, medidos con el ABC, eran inferiores a un 24,9 % en comparación con los ratones wt, sin embargo esta disminución no era estadísticamente significativa ($t_{11} = 1,322$; $p = 0,214$; Figura 30 B). La evolución de las curvas de corticosterona durante los 90 min que duró la prueba, no mostró diferencias significativas entre ambos genotipos ($\chi^2_3 = 1,994$; $p = 0,574$), analizando los resultados con un MLG de medidas repetidas.

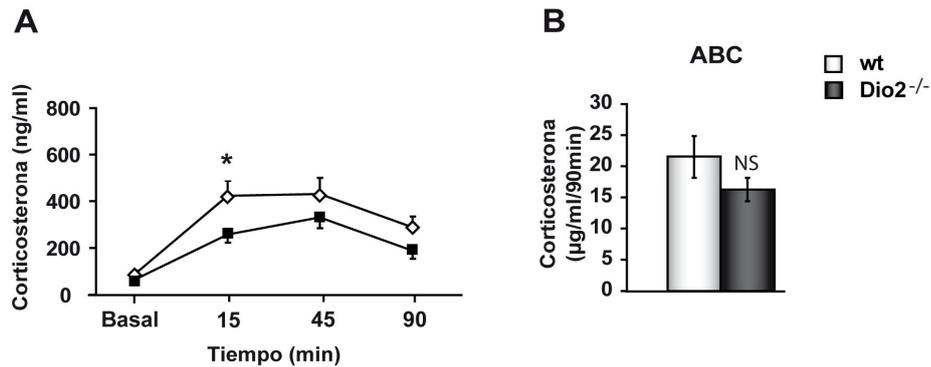


Figura 30. Respuesta de la activación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA) tras una descarga eléctrica. **A)** Monitorización de los niveles de corticosterona durante 90 min tras la aplicación de la descarga eléctrica. **B)** Niveles de corticosterona medidos mediante el área bajo la curva (ABC) de A. Los resultados se representan como la media \pm el error estándar de 9 ratones wt y 8 ratones Dio2^{-/-}. Diferencias respecto al grupo wt: * $p < 0,05$; NS, no significativo.

Los resultados obtenidos en estas pruebas indican que la memoria emocional dependiente del condicionamiento del miedo al tono, y por tanto de un buen funcionamiento de la amígdala, está potenciada por la deficiencia de la D2. Sin embargo, la deficiencia de D2 no altera la memoria del miedo al contexto en la que además de la amígdala participa la HPC. La recuperación espontánea del miedo está aumentada considerablemente debido a la deficiencia de D2. El posible mecanismo de la potenciación de la memoria emocional observada en los ratones Dio2^{-/-} no estaría asociada a un aumento en la liberación de corticosterona en respuesta al estímulo aversivo. Aunque no se observan diferencias estadísticamente significativas en la secreción de corticosterona en respuesta al estímulo aversivo, los ratones Dio2^{-/-} presentan una tendencia a tener niveles inferiores de secreción de corticosterona, por lo que no se pueden descartar alteraciones en la reactividad del eje HHA debidas a la deficiencia de D2.

5. INFLUENCIA DE LA D2 EN LA PLASTICIDAD SINÁPTICA ENTRE LAS FIBRAS COLATERALES DE SCHAFER Y LAS NEURONAS PIRAMIDALES DE LA REGIÓN CA1

La HPC es la única región cerebral de las que se han estudiado en esta tesis con niveles de HT reducidos, tanto de T3 como de T4, en aproximadamente un 50 %. Además, existen varios trabajos experimentales que demuestran que el hipotirodismo adulto en la región CA1 del hipocampo provoca alteraciones en los mecanismos de plasticidad sináptica (3, 6, 80). Por ello hemos utilizado ratones wt y $Dio2^{-/-}$ de 3 meses de edad para evaluar si la actividad de la D2 está implicada en mecanismos de plasticidad sináptica en la región CA1 del hipocampo.

5.1 Análisis del perfil de intensidades: curva estímulo/respuesta

Se estudiaron los cambios en la pendiente de los fEPSP a intensidades crecientes obteniendo así la curva estímulo/respuesta. Para ello se estimularon las fibras colaterales de Schaffer en el *stratum radiatum* de la región CA1 y se registraron los potenciales de campo en las dendritas de las células piramidales de CA1 en rodajas de tejido de ratones wt y $Dio2^{-/-}$. Los fEPSP que se obtienen en las condiciones experimentales utilizadas son el reflejo de la activación de los receptores glutamatergicos del tipo AMPA. Los resultados obtenidos, tanto en los ratones wt como en los ratones $Dio2^{-/-}$, mostraron un aumento en la pendiente de los fEPSP conforme se aumentaba la intensidad del estímulo hasta llegar a un valor máximo situado aproximadamente a una intensidad de 27 μ A. La comparación de las medias de la pendiente del fEPSP para cada una de las intensidades analizadas (de 10,6 a 30,7 μ A) no mostró diferencias estadísticamente significativas entre ambos genotipos ($p \geq 0,05$; Figura 31 A). La evolución de las curvas del perfil de intensidades tampoco mostró diferencias significativas entre ambos genotipos ($\chi^2_6 = 1,821$; $p = 0,935$) analizando los resultados con un MLG de medidas repetidas.

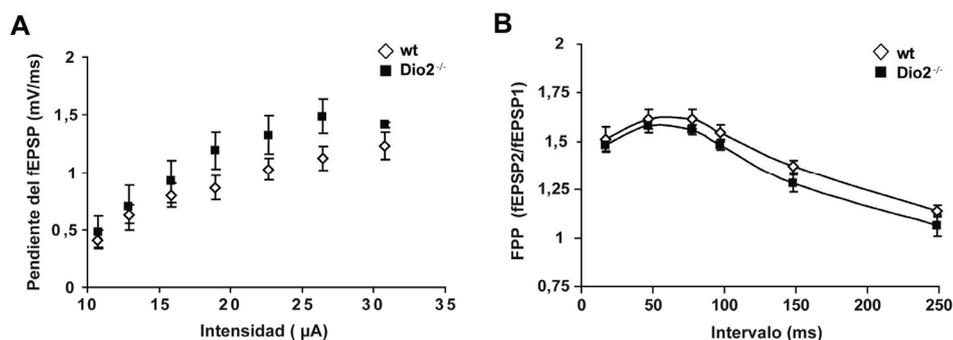


Figura 31. Transmisión sináptica basal en la sinapsis CA3-CA1. A) Curva estímulo/respuesta obtenida de rodajas de tejido de 10 ratones wt y 8 ratones $Dio2^{-/-}$ de 3 meses de edad. B) Gráfico en el que se representa el cociente de dividir el segundo fEPSP por el primer fEPSP generados por pares de estímulos separados por los intervalos de tiempo indicados en las abscisas. Los resultados obtenidos en rodajas de tejido de ratones de 3 meses de edad wt ($n=17$) y $Dio2^{-/-}$ ($n=18$) se representan como la media \pm error estándar. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos experimentales.

5.2 Análisis de la facilitación por pares de pulsos

La FPP es un fenómeno ocasionado por la maquinaria presináptica y se usa como medida indirecta de cambios en la probabilidad de liberación del neurotransmisor de la terminal presináptica (109, 186, 204). Se analizó si la deficiencia de D2 alteraba esta forma de plasticidad sináptica a corto plazo. Para ello se realizó la estimulación con pares de estímulos homosinápticos separados por intervalos de tiempo crecientes (20-250 ms). Se midió la variación de la pendiente de los fEPSP en respuesta a ambos pulsos y el grado de facilitación se expresó como la relación porcentual de la pendiente de la segunda respuesta postsináptica con respecto a la primera respuesta postsináptica. Tanto en los ratones wt como en los ratones Dio2^{-/-} la respuesta del segundo fEPSP fue creciendo hasta los 80 ms de intervalo inter-estímulos y a partir de los 100 ms se fue reduciendo. La comparación de las medias de la FPP para cada uno de los intervalos analizados no mostró diferencias estadísticamente significativas debidas a la deficiencia de la D2 en ninguno de los intervalos analizados ($p > 0,05$ en todos los intervalos; Figura 31 B). La evolución de las curvas de la FPP no mostró diferencias significativas entre ambos genotipos ($\chi^2_5 = 2,018$; $p = 0,847$) analizando los resultados con un MLG de medidas repetidas.

Conjuntamente los resultados de la curva estímulo/respuesta y la FPP indican el correcto funcionamiento de la eficacia sináptica y en particular de la maquinaria presináptica, en la sinapsis CA3-CA1 en los ratones deficientes para D2.

5.3 Depresión a largo plazo

Para la inducción de la LTD homosináptica es necesaria la activación de los receptores NMDA y hay estudios previos que indican que también son necesarios los receptores glutamatérgicos metabotrópicos (149). Se realizó esta prueba para ver si la deficiencia de D2 afectaba a la densidad, a la localización o a las propiedades cinéticas de los receptores implicados en este mecanismo de plasticidad sináptica que se induce con mayor facilidad en etapas juveniles.

Durante el protocolo de estimulación utilizado (1 Hz cada segundo durante 15 min) se generó una depresión de los fEPSP que se recuperó a los 10 min, obteniéndose valores similares a los registrados en el periodo basal indicando una ausencia de LTD en los ratones wt y Dio2^{-/-}. Los resultados analizados mediante un modelo ANOVA de dos vías de medidas repetidas no mostraron diferencias entre los genotipos ($p > 0,05$; Figura 32).

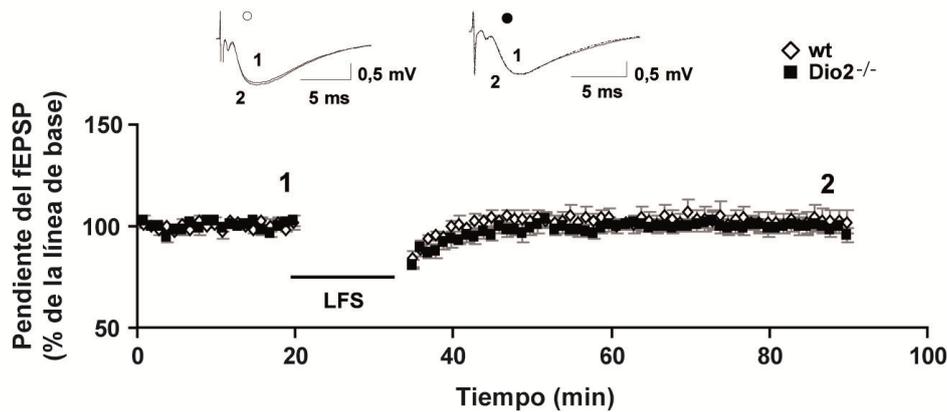


Figura 32. Inducción de la LTD en la vía CA3-CA1 mediante LFS. Los trazos de la parte superior muestran la media representativa de 8 fEPSPs consecutivos registrados a los tiempos indicados por los números en la gráfica. En la gráfica se representa la media \pm el error estándar de la pendiente de los fEPSPs de 8 ratones wt y 9 ratones Dio2^{-/-}. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre genotipos.

5.4 Potenciación a largo plazo

Para comprobar si la D2 tiene un papel importante en los procesos relacionados con la generación de LTP se realizaron dos estudios con diferentes protocolos de estimulación. En el primero la estimulación se realizó mediante HFS, mientras que en el segundo estudio la estimulación se realizó con TBS. La estimulación con TBS produce una potenciación menor que la estimulación con HFS y más similar a la fisiológica.

En la potenciación sináptica inducida mediante estimulación por HFS se pueden diferenciar 2 tipos de LTP, una E-LTP (1 HFS) y una L-LTP (3 HFS). En la inducción de la E-LTP las rodajas de hipocampo presentaron una potenciación sináptica que fue decayendo con el tiempo hasta su estabilización, alcanzando valores de respuesta sináptica cercanos a los observados en el periodo de registro basal. Los resultados, analizados mediante un modelo ANOVA de dos vías de medidas repetidas, mostraron valores de potenciación en los ratones Dio2^{-/-} similares a los obtenidos en el grupo wt ($p \geq 0,05$; Figura 33 A).

La L-LTP indujo valores de potenciación sináptica mayores a los observados en la E-LTP. Estos valores permanecían potenciados y estables respecto a la línea de base durante al menos 3 horas desde el último HFS. Se midieron las pendientes de los fEPSPs de 5 minutos consecutivos, a la hora, a las 2 h y a las 3 h posteriores al último HFS. El análisis de los resultados, mediante un modelo ANOVA de dos vías de medidas repetidas, no mostró diferencias significativas entre ambos grupos experimentales ($p \geq 0,05$; Figura 33 B).

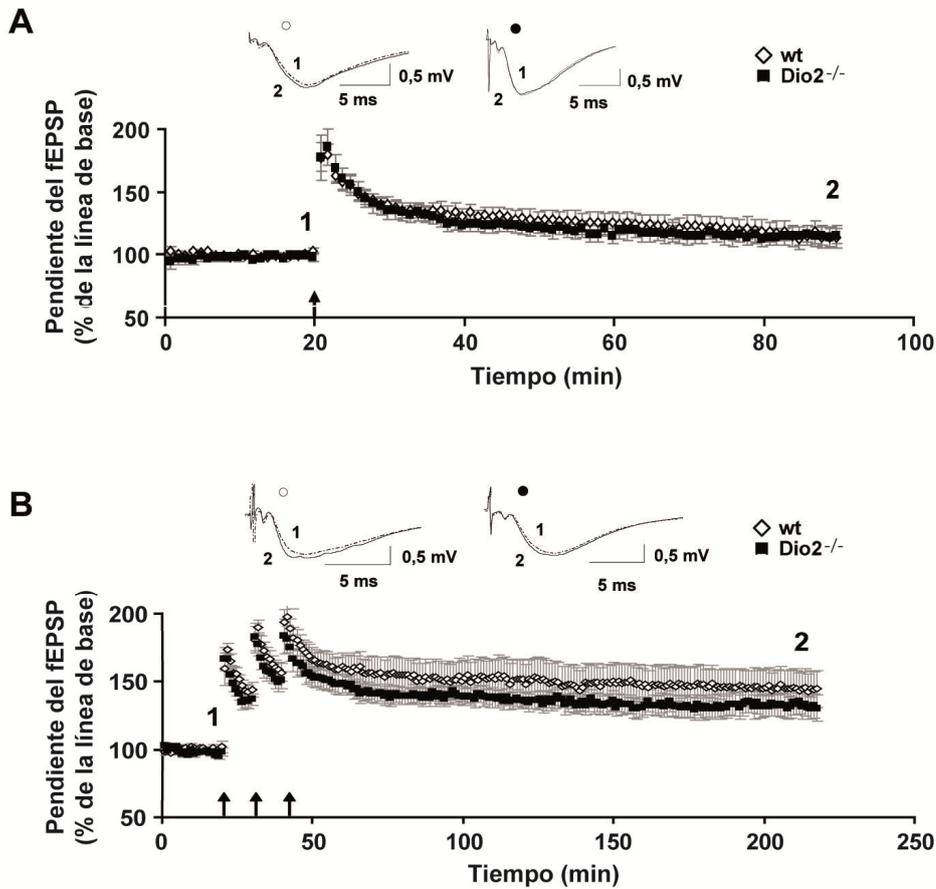


Figura 33. Inducción de la LTP en la vía CA3-CA1 mediante HFS. A) Inducción de E-LTP tras 1 HFS en 10 ratones wt y 8 ratones Dio2^{-/-}. **B)** Inducción de la L-LTP tras 3 HFS en 7 ratones wt y 8 ratones Dio2^{-/-}. Los trazos de la parte superior muestran la media representativa de 8 fEPSPs consecutivos registrados a los tiempos indicados por los números en la gráfica. En la gráfica se representa la media \pm el error estándar de la pendiente de los fEPSPs. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre genotipos.

La estimulación con 2 TBS indujo una potenciación sináptica de un 20 %, tomando como referencia la línea de base, manteniéndose constante durante por lo menos una hora en ambos grupos experimentales. El análisis de los resultados, mediante un modelo ANOVA de dos vías de medidas repetidas, no mostró diferencias significativas debidas a la deficiencia de D2 ($p > 0,05$; Figura 34 A). Posteriormente se procedió a la estimulación con 3 TBS, siendo el porcentaje de potenciación superior al observado en el protocolo anterior de 2 TBS (50 %). Con este protocolo de estimulación los resultados obtenidos, analizados mediante un modelo ANOVA de dos vías de medidas repetidas, tampoco reflejaron diferencias significativas entre ambas condiciones experimentales ($p \geq 0,05$; Figura 34 B).

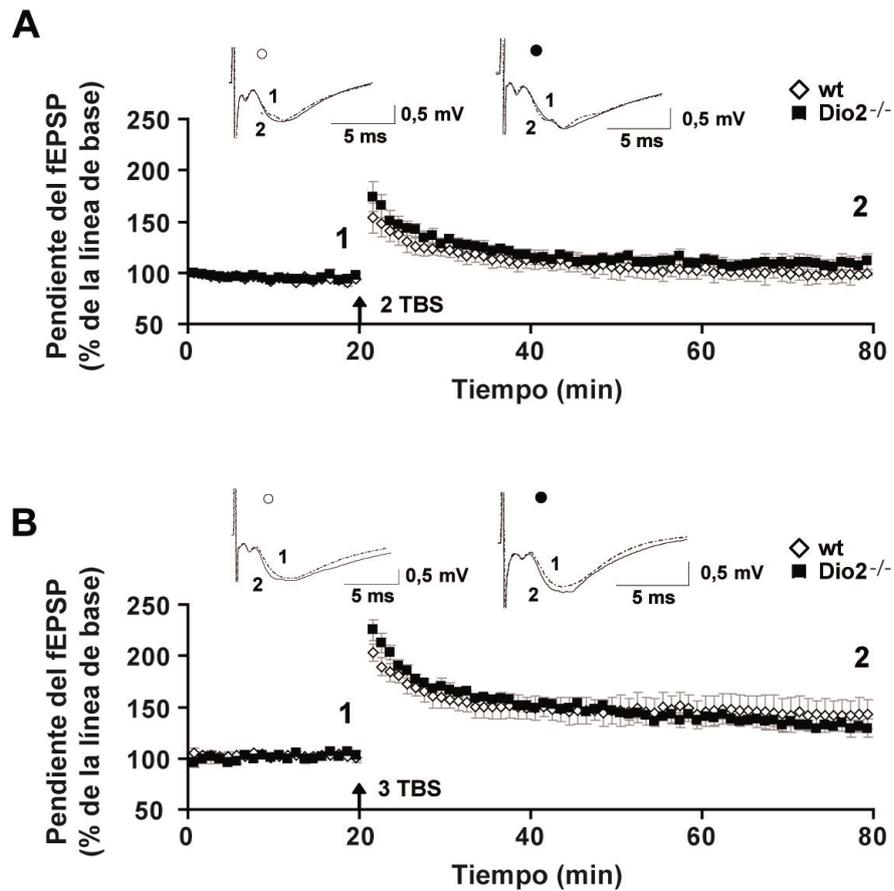


Figura 34. Inducción de la LTP en la vía CA3-CA1 mediante TBS. A) Inducción de LTP tras la aplicación de 2 TBS en 5 ratones wt y 5 ratones Dio2^{-/-}. **B)** Inducción de LTP tras la aplicación de 3 TBS en 7 ratones wt y 8 ratones Dio2^{-/-}. Los trazos de la parte superior muestran la media representativa de 8 fEPSPs consecutivos registrados a los tiempos indicados por los números en la gráfica. En la gráfica se representa la media \pm el error estándar de la pendiente de los fEPSPs. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre

Conjuntamente los resultados de la LTD y LTP indican que la deficiencia de D2 no altera la inducción de estas dos formas de plasticidad sináptica duradera en la sinapsis CA3-CA1 del hipocampo.

DISCUSIÓN



1. Homeostasis de las HT en plasma y SNC

El tiroides en condiciones fisiológicas normales secreta cantidades superiores de T4 (un 70 %) que de T3 (un 20 %) que viajan a los tejidos diana de HT unidas a proteínas transportadoras. La T3 es la hormona nuclearmente activa que modula patrones de expresión génica por unión a sus TRs (17). Existen dos enzimas capaces de desyodar la T4 a T3, éstas son la D1 y la D2 que tienen distintas propiedades cinéticas y presentan patrones de expresión y actividad específicos de tejido (18). La D1 presenta mayor actividad en órganos que permiten un rápido intercambio de las HT con el plasma, como pueden ser el hígado, la piel o el riñón. Por el contrario, la actividad de la D2 es predominante en tejidos de intercambio lento como el cerebro, la hipófisis y el BAT.

Los resultados de los niveles plasmáticos de HT obtenidos en esta tesis en ratones $Dio2^{-/-}$ de 3 meses de edad mostrando niveles eutiroides de T3 y niveles incrementados al doble de los eutiroides de T4, corroboran los datos publicados previamente utilizando ratones $Dio2^{-/-}$ de 2 a 3,5 meses de edad (51, 74, 127, 180). Se ha propuesto que los elevados niveles de T4 en los ratones $Dio2^{-/-}$ serían consecuencia de una disminución en la desyodación de T4 por ausencia de la actividad de la D2 en los tejidos periféricos y no por una disminución de la actividad de la D1 (180). Los niveles eutiroides de T3 de los ratones $Dio2^{-/-}$ son más difíciles de entender. Una posible explicación sería que la T3 producida en los tejidos por acción de la D2 no contribuiría al mantenimiento de los niveles plasmáticos de T3. Sin embargo, estudios más recientes realizados en humanos y en animales de experimentación en condiciones de eutiroidismo concluyen que una fracción importante de T3 plasmática es el resultado de la actividad de la D2 (122, 144). Otra posible explicación de los niveles eutiroides de T3 sería una estimulación de la secreción de T3 *per se* de la glándula tiroides inducida por el aumento de la TSH observada en los ratones $Dio2^{-/-}$ (180). También, la presencia de una mayor cantidad de sustrato (T4) podría ser suficiente para el mantenimiento de los niveles plasmáticos de T3 gracias a la actividad de la D1, aunque los niveles de actividad de la D1 en el hígado y el tiroides no se encuentran modificados en condiciones de deficiencia de D2 (180).

Estudios clásicos indican que la mayoría de T3 cerebral (un 80 %) se genera localmente a partir de T4 por acción de la D2 (46). Además, diversas evidencias indican que la actividad de la D2 es fundamental para el mantenimiento de la homeostasis de HT cerebrales. Entre ellas, la disminución de los niveles de T4 produce un aumento en la actividad y en la expresión de la D2 cerebral con el fin de mantener la homeostasis de los niveles cerebrales de T3 (13, 87, 147).

La importancia de la D2 en la generación intracerebral de T3 se manifiesta también en nuestros resultados que son los primeros que analizan los niveles de HT en condiciones de deficiencia de D2 en el cerebro adulto. En los animales deficientes para la D2, a pesar de presentar niveles plasmáticos

eutiroides de T3, los niveles de T3 en varias regiones cerebrales no son comparables a los de los ratones wt. Nuestros resultados sugieren además que hay una jerarquía dependiente de región cerebral en cuanto a la modulación de la disponibilidad de T3 en ausencia de actividad D2. A pesar de que en condiciones de eutiroidismo el 80 % de la T3 cerebral se genera localmente por acción de la D2, en ausencia de la actividad de la D2 las concentraciones de T3 son variables en las distintas regiones cerebrales estudiadas, sin que disminuyan en más de un 50 % en ninguna de ellas. Los resultados en CTX indican una disminución de T3 y un aumento de T4 en los ratones $Dio2^{-/-}$ coincidiendo con estudios previos realizados en ratones hembra $Dio2^{-/-}$ a P15 (75). Sorprendentemente, los niveles de HT en la HPC, determinados por primera vez en ratones $Dio2^{-/-}$, indicaron una disminución de alrededor de un 50 % tanto de T3 como de T4. La disminución de la T3 en CTX y la HPC podría ser debida a una mayor actividad de la D3 que puede desyodar tanto la T4 como la T3 a 3, 3'-diyodotironina y a rT3. La actividad de la D3 en CTX de ratones $Dio2^{-/-}$ a P15 es comparable a la de los ratones wt (74, 75). Sin embargo, en los estudios realizados en CTX en animales de 2,5 meses de edad se ha descrito un aumento considerable de la actividad de la D3 en comparación a los animales wt que podría explicar esta disminución de T3 en CTX, pero que no explicaría los niveles elevados de T4 en esta región. La actividad D1 como responsable de los niveles cerebrales de T3 y T4 en los ratones $Dio2^{-/-}$ se descarta porque tanto en CTX como en la HPC no se ha cuantificado actividad D1 apreciable tampoco en los animales wt. Con estos resultados, lo más probable es que la disminución de T3 y el aumento de T4 en CTX de ratones $Dio2^{-/-}$ se deba a la deficiencia de producción local de T3 a partir de T4 por acción de la D2. En el caso de la HPC, parece factible pensar que la actividad de la D3 podría estar aumentada induciendo una mayor degradación de T4 y T3, aunque hasta el momento en ningún estudio se han cuantificado los niveles de actividad de la D3 en esta región. Los datos obtenidos en CTX y en la HPC deberían ser corroborados determinando la actividad D3 en ambas regiones. Además, en el caso de la HPC debería aumentarse la muestra de estudio. A diferencia de la CTX y la HPC, el CB de ratones deficientes para D2 presenta niveles eutiroides de T3, indicando una menor dependencia de la D2 para el mantenimiento de los niveles de la HT nuclearmente activa. Esto podría explicarse por la elevada actividad de la D1 encontrada en el CB también en los animales wt, que podría estar generando T3 en esta región a partir de T4, lo que también explicaría los niveles disminuidos de T4 en esta región.

Los niveles de HT cuantificados en las distintas regiones cerebrales encontrados en los ratones $Dio2^{-/-}$ podrían ser el resultado de cambios en la modulación del transporte de HT. Estudios anteriores en los que se ha caracterizado el patrón de expresión de la D2 en el SNC han permitido formular la hipótesis de la existencia de una cooperación paracrina entre astrocitos y neuronas. En esta hipótesis, en los astrocitos se generaría T3 por acción de la D2 y esta T3 sería utilizada a nivel local por las neuronas tras ser transportada a su interior gracias a transportadores específicos como el transportador MCT8 (88, 95). El que los niveles de T3 estén solo reducidos al 50 % en la CTX y la HPC podría indicar que en ausencia de D2 se activan mecanismos compensatorios que permiten que los niveles de T3 en las

distintas regiones cerebrales no dependen exclusivamente de la generación local de T3. Las distintas regiones cerebrales podrían obtener un mayor cantidad de T3 directamente desde el plasma y/o desde el LCR de la obtenida normalmente en condiciones de eutiroidismo. Los posibles mecanismos compensatorios no parecen estar relacionados con la actividad del transportador de HT MCT8, dado que los niveles de expresión de este transportador no se modifican en el cerebro de ratones *Dio2^{-/-}*, al menos a P15 (75), edad dentro del periodo en el que se han cuantificado niveles cerebrales máximos de generación de T3 por desyodación de T4 (102). En cualquier caso, para profundizar en los posibles efectos compensatorios por cambios en el transporte de HT habría que analizar la participación de los otros transportadores importantes para la disponibilidad de T3 y T4 intracerebrales, como el MCT10 y los pertenecientes a otras familias (LAT, OATP) (39, 95, 99).

2. Metabolismo de la glucosa

Nuestros resultados no revelaron diferencias debidas a la deficiencia de la D2 en el peso corporal de animales jóvenes y adultos a ninguna de las edades estudiadas (3, 4, 5, 6 y 12 meses), en animales estabulados a 22 °C y con una dieta normal. Esto está en concordancia con estudios realizados en ratones *Dio2^{-/-}* por otros laboratorios (38, 127, 180). La normalidad en el peso corporal de los ratones deficientes para D2, incluso a 1 año de edad como indican nuestros estudios, es sorprendente dado que modelos murinos con disfuncionalidad del BAT son muy sensibles tanto al incremento como a la pérdida de peso corporal (38, 127) y una de las funciones mejor caracterizadas de la D2 es su implicación en la regulación de la respuesta termogénica del BAT (20-22). De hecho, estudios realizados en ratones *Dio2^{-/-}* expuestos al frío (4 °C) han puesto de manifiesto una disfuncionalidad del BAT reflejada en un aumento de la lipólisis y una disminución de la lipogénesis y una incapacidad de mantener la temperatura corporal mediante la generación de calor procedente del BAT. Los animales *Dio2^{-/-}* expuestos al frío únicamente son capaces de sobrevivir incrementando su capacidad de tiriteo (52, 56). Christoffolette, 2004 #1098}.

Los niveles de glucosa en sangre en condiciones de alimentación y tras 24 h de ayuno no se encuentran alterados por la deficiencia de D2 en animales de 3 meses de edad. Sin embargo, los resultados obtenidos en el GTT y ITT indicarían que la deficiencia de D2 induce un fenotipo de mayor tolerancia a la glucosa y mayor sensibilidad a la insulina. En el GTT, la curva de glucosa de los ratones *Dio2^{-/-}* en los 180 min que duró el experimento estaba por debajo de la curva de los ratones wt. El ITT, administrando una dosis de insulina de 0,75 U/kg de peso corporal, mostró niveles de glucosa en los ratones *Dio2^{-/-}* inferiores en un 36 % respecto a los ratones wt. Posteriormente se repitió la prueba con una dosis menor de insulina (0,23 U/kg) para comprobar si había una respuesta a la insulina

dependiente de la dosis administrada. Incluso con una dosis 3 veces menor de insulina de la utilizada habitualmente en este tipo de pruebas, los niveles de glucosa en los ratones $Dio2^{-/-}$ seguían siendo inferiores (en un 14,3 %) a los niveles de los ratones wt.

Nuestro resultados del GTT concuerdan con los publicados por el grupo de investigación del Dr. Bianco y cols. (38), donde observaron una disminución considerable de los niveles de glucosa en los ratones $Dio2^{-/-}$ en prácticamente todos los tiempos analizados en las dos horas siguientes a la administración de glucosa también en animales de 3 meses de edad.

Sin embargo, nuestros resultados no coinciden con los estudios publicados por la Dra. Zavacki y cols. (127) utilizando el mismo modelo de ratón deficiente para D2, aunque en animales de 2 meses de edad. En estos estudios, los ratones $Dio2^{-/-}$ presentan unos niveles ligeramente superiores de glucosa en sangre tras un periodo de 14 h de ayuno. Además, los ratones $Dio2^{-/-}$ no tienen alteraciones en el GTT y sin embargo los resultados del ITT indicarían un fenotipo de resistencia a la insulina al detectarse una menor captación de glucosa por los tejidos periféricos tras administrar una dosis de insulina de 0,5 U/kg de peso corporal. Las diferencias de los resultados entre este estudio y el nuestro probablemente se deban a las diferencias experimentales, como por ejemplo la edad de los animales y el tiempo de ayuno utilizado antes de la administración de glucosa y de insulina (14 horas frente a 24 h y 4h respectivamente en nuestros estudios). Las diferencias en el tiempo de ayuno podrían modular de diferente manera los mecanismos contrarreguladores de la acción de la insulina. Entre estos elementos contrarreguladores se encuentran los corticosteroides (25). Con respecto a este punto, es de destacar el que hayamos cuantificado una tendencia a liberar niveles inferiores de corticosterona en respuesta a una activación del eje HHA tras un estímulo aversivo (descarga eléctrica) en los ratones $Dio2^{-/-}$.

Por otra parte, la homeostasis de la glucosa en sangre también depende de los tejidos diana que responden a la insulina, los dos más importantes son el hígado y el músculo. Entre los primeros procesos que se producen tras la unión de la insulina a sus receptores de membrana está la activación de la vía de señalización de la PI3K/Akt. La activación de Akt se produce por la fosforilación de la treonina 308 y de la serina 473 (110). Estudios realizados en ratones deficientes para Akt 2 (una isoforma de Akt denominada PKB β) han mostrado la importancia de este gen para el mantenimiento de la homeostasis de glucosa en sangre (49). Mutaciones en Akt 2 también se han relacionado con un fenotipo de resistencia a la insulina (49, 76). Son muchos los trabajos que reflejan un aumento de la fosforilación de Akt en tejidos periféricos tras la estimulación con insulina, así como una menor fosforilación de Akt en tejidos como el músculo, en fenotipos de resistencia periférica a la insulina y en diabetes (174, 196).

En los estudios realizados en cerebro no se pudo cuantificar un aumento de la señalización por insulina cuantificando el estado de fosforilación de Akt. Los resultados obtenidos no se pudieron interpretar debido a que la fosforilación basal de Akt en el cerebro de los animales inyectados con suero

salino estaba tan elevada como la cuantificada en los animales inyectados con insulina, tanto en ratones wt como en ratones $Dio2^{-/-}$. En hígado y músculo si que se pudo cuantificar una estimulación de la fosforilación de Akt tras la administración de insulina. En estos dos tejidos, la estimulación de la fosforilación de Akt no estaba alterada por la deficiencia de D2, lo que apoyaría fuertemente, junto con los resultados obtenidos en el GTT y el ITT, el que los ratones $Dio2^{-/-}$ no presentan un fenotipo de resistencia periférica a la insulina. Hay que tener en cuenta además, que *in vivo*, utilizando esta metodología es probablemente muy difícil obtener un aumento en la fosforilación de Akt como indicador de una mayor sensibilidad a la insulina y por tanto de su señalización. Estudios previos en humanos analizando la posible asociación de polimorfismos de la D2 con resistencia a la insulina muestran resultados contradictorios e inconsistentes (35, 61, 67, 84, 133, 155).

Por todo lo anterior, sería necesario realizar más estudios para concluir si la deficiencia de D2 induce un fenotipo de resistencia o de mayor sensibilidad a la insulina. Entre estos estudios estaría la prueba de secreción de insulina para evaluar la funcionalidad del páncreas y estudios *in vitro* con miocitos y/o hepatocitos para profundizar en el papel de la D2 en la señalización de insulina en hígado y músculo.

3. Pruebas neurosensoriales y sensoriomotoras

Las alteraciones en las habilidades motoras de los animales deficientes para D2 podrían deberse a anomalías en la velocidad de conducción nerviosa que afectasen a la contractibilidad muscular. El estudio de la velocidad de conducción nerviosa en el nervio ciático no mostró alteraciones debidas a la deficiencia de D2 ni a 3 ni a 6 meses de edad. Esto indicaría que no hay alteraciones ni en la mielinización ni en el diámetro axonal del nervio estudiado, observaciones que podrían extenderse muy probablemente al resto del sistema nervioso periférico. Para el cálculo de la velocidad de conducción nerviosa se usaron varias medidas corporales de referencia en las que no se observaron alteraciones en los ratones $Dio2^{-/-}$. Los resultados de estas mediciones concuerdan con la similitud encontrada en la evolución del peso corporal de los animales de ambos genotipos y apoyan la inexistencia de alteraciones en el tamaño corporal debidas a la deficiencia de D2.

A pesar de que el tamaño y peso corporal de los ratones $Dio2^{-/-}$ es similar al de los ratones wt, fenotípicamente los ratones $Dio2^{-/-}$ presentan un deterioro de las extremidades posteriores reflejado con un menor alzamiento del tronco inferior respecto del suelo que se puede observar visualmente a partir de los 6 meses de edad. Para evaluar cuantitativamente este deterioro se realizó la prueba de la impronta de pisadas y los resultados obtenidos mostraron graves alteraciones en el patrón de la marcha debidas a la deficiencia de D2. Estas alteraciones se manifiestan en los ratones $Dio2^{-/-}$ con una mayor distancia entre las extremidades, tanto anteriores como sobre todo posteriores al caminar, y con una disminución

en el largo de la zancada de ambas extremidades. La disminución en el largo de la zancada de las extremidades anteriores y posteriores probablemente esté relacionada con la disminución en la velocidad para recorrer el pasillo que presentan los ratones *Dio2^{-/-}*.

Basándonos en los resultados descritos anteriormente, planteamos la hipótesis de que el aumento de la distancia entre las extremidades anteriores y sobre todo de las posteriores en los ratones *Dio2^{-/-}* podría deberse, entre otras causas, a una deficiencia del tono o fuerza muscular.

El músculo esquelético es un tejido que expresa D2 y es diana de las HT (19). Estudios realizados en los últimos 4 años han descrito que una gran cantidad de genes implicados en la función fisiológica del músculo se encuentran regulados tanto positiva como negativamente por el estado tiroideo (183, 191). *MyoD* es un gen muscular que participa en el proceso de regeneración muscular y está considerado el gen más importante en el desarrollo miogénico. Recientemente se ha demostrado que la D2, mediante la generación local de T3, está asociada a la correcta transcripción de *MyoD* (58). En ratones *Dio2^{-/-}* la expresión de *MyoD* así como la de otros genes que responden a T3 se encuentra disminuida (58). A pesar de los niveles eutiroideos de T3 en suero, los miocitos de estos animales deficientes en D2 muestran un fenotipo hipotiroideo de expresión génica. En cultivo de mioblastos primarios se ha observado que FoxO3 (de sus siglas en inglés Forkhead box transcription factor) induce la expresión de D2 favoreciendo así, a nivel local en el músculo, el aumento intracelular de T3 para un correcto desarrollo y regeneración muscular (58). Todos estos estudios muestran un papel muy importante de la D2 en el músculo y de una manera indirecta estarían apoyando nuestra hipótesis de que las alteraciones que observamos en el patrón de la marcha de los animales deficientes para D2 se deban a una posible pérdida del tono o fuerza muscular.

Con la finalidad de evaluar la posible implicación de la D2 en el tono o la fuerza muscular realizamos distintas pruebas específicas para ratones. La prueba del poste vertical se utilizó para evaluar la fuerza muscular de las extremidades anteriores así como el equilibrio de los animales. Los resultados de esta prueba parecen indicar que tanto la fuerza muscular de las extremidades anteriores como el equilibrio no están alterados en los ratones *Dio2^{-/-}* ni a 3 ni a 6 meses de edad. Sin embargo, por la gran variabilidad de los datos obtenidos en esta prueba, decidimos complementar estos resultados con los de otras pruebas. Por ello, se utilizó también la prueba de la reja, en la que se evalúa cuantitativamente de una manera indirecta la fuerza muscular, en este caso tanto de las extremidades anteriores como posteriores. Durante el desarrollo de esta prueba los ratones *Dio2^{-/-}* no tenían la misma habilidad que los ratones wt para desplazarse por la reja cuando estaba invertida. Además, la latencia de caída de la reja era mucho menor que la de los ratones wt, tanto a los 3 como a los 6 meses de edad. Los resultados de ambas pruebas corroboran los resultados obtenidos en la prueba de la imprenta de pisadas en los que se observaba una mayor alteración de las extremidades posteriores en los ratones *Dio2^{-/-}*. Por los trabajos citados anteriormente que describen en condiciones de deficiencia de D2 un fenotipo hipotiroideo del

músculo asociado a alteraciones en el desarrollo y en la regeneración muscular, y por los resultados obtenidos en estas 2 pruebas, parece muy probable que la deficiencia de D2 este implicada en una pérdida del tono o la fuerza muscular que probablemente influya en el patrón de la marcha de los ratones *Dio2^{-/-}*. Aunque no se puede descartar que anomalías en otras regiones del SNC como el CB, los ganglios basales y la CTX, todas ellas regiones diana de HT, también pueden contribuir a la manifestación de los trastornos de la marcha en condiciones de deficiencia de D2.

También se evaluaron posibles alteraciones tanto en el equilibrio como en la coordinación motora en los ratones *Dio2^{-/-}* con la prueba del rodillo giratorio. A 3 meses de edad no se cuantificaron diferencias debidas a la deficiencia de D2 mientras que a 6 meses de edad se encontraron importantes alteraciones en la realización de la prueba. Los ratones *Dio2^{-/-}* realizaban la prueba con una menor habilidad y con una latencia de caída mucho menor que la de los ratones wt. Además, observando el comportamiento de los animales, el motivo de la caída de los ratones wt y los ratones *Dio2^{-/-}* parecía ser distinto. Mientras que los ratones wt caían del rodillo porque no eran capaces de mantenerse en él cuando aumentaba la velocidad a la que éste giraba, los ratones *Dio2^{-/-}* se caían a velocidades menores que los ratones wt por la falta de agarre de las extremidades posteriores. Aunque el CB es la principal estructura cerebral implicada en las alteraciones relacionadas con el equilibrio evaluadas con la prueba del rodillo giratorio, nuestra hipótesis para explicar las alteraciones en la realización de esta prueba de los ratones *Dio2^{-/-}* se centran en la pérdida de fuerza muscular debida a la deficiencia de la D2. El músculo está compuesto por dos tipos de fibras musculares, las fibras de tipo I y las fibras de tipo II. Las fibras de tipo I tienen una actividad de la D2 5 veces superior a la de las fibras de tipo II. La actividad de la D2 en condiciones de hipotiroidismo está además aumenta 3 veces en las fibras de tipo I, sin que se produzcan cambios en los niveles de ARNm (128). Cabe destacar que las fibras de tipo I predominan en los músculos posturales (músculos del tronco), cuya actividad es continua. Por este motivo creemos que la pérdida de fuerza muscular de los ratones *Dio2^{-/-}* durante la realización de la prueba del rodillo giratorio se debe probablemente a la fatiga de las fibras musculares de tipo I y no a posibles alteraciones a nivel del CB. El que en la prueba del poste vertical no hubiese diferencias entre ambos genotipos también iría a favor de un buen funcionamiento del CB en condiciones de deficiencia de D2. Además, los niveles eutiroides de T3 en el CB, probablemente mantenidos por la elevada actividad D1 cuantificada en esta región, reforzarían el correcto desarrollo y funcionalidad de esta estructura, aunque sería importante analizar histológicamente el CB de ratones adultos deficientes para D2 para verificarlo.

Por último, el tratamiento hormonal utilizado no fue suficiente para revertir las alteraciones observadas en ninguna de las pruebas. Ello a pesar de haber administrado una dosis 3 veces superior a la fisiológica de T3 y una dosis fisiológica de T4 para mantener los niveles plasmáticos eutiroides de HT. Esto podría indicar que las alteraciones inducidas por la deficiencia de D2 se producen más tempranamente en el desarrollo y son resistentes a su reversión en estadios adultos o que las dosis de

HT o el tiempo del tratamiento utilizado no fueron adecuados o suficientes. También podría ocurrir que la T3 administrada no hubiese llegado en suficiente cantidad al tejido muscular debido a alteraciones en los mecanismos implicados en la disponibilidad de T3 en este tejido. De hecho, el que los ratones $Dio2^{-/-}$ presenten niveles plasmáticos eutiroides de T3 indicaría que el fenotipo hipotiroideo encontrado en el músculo se debería a la falta de la generación local de T3 y que muy posiblemente los animales con tratamiento de HT sigan presentando un hipotiroidismo a nivel local en el músculo.

Para profundizar en estas cuestiones se van a determinar los niveles de HT en el músculo de animales $Dio2^{-/-}$ con y sin tratamiento hormonal. El músculo es un tejido en donde todavía no se han cuantificado los niveles de HT en animales $Dio2^{-/-}$ y la determinación de los niveles de HT en los animales tratados nos darían información de la eficacia del tratamiento hormonal. También sería importante determinar los niveles plasmáticos de HT en ratones $Dio2^{-/-}$ con tratamiento hormonal, aunque parece razonable pensar que los niveles de T3 en los animales con tratamiento hormonal en ningún caso serían inferiores a los niveles eutiroides de los animales sin tratar. Actualmente también estamos trabajando en la medición de los niveles de HT en distintas regiones cerebrales y en distintos tejidos de los animales tratados con HT para determinar la eficacia del tratamiento en la normalización de los niveles de HT.

4. Aprendizaje y memoria

4.1 Prueba de Barnes

Estudios clínicos indican que el hipotiroidismo en el adulto produce déficits en la concentración y en la memoria a corto plazo (32, 91, 115, 132, 175). También se han descrito desordenes en el aprendizaje, en la atención y en la habilidad visuoespacial en personas de edad avanzada con hipotiroidismo (150). En ratas tiroidectomizadas en estadios adultos se ha demostrado que el hipotiroidismo produce graves alteraciones en capacidades de aprendizaje y memoria dependientes de la HPC evaluadas con la prueba del laberinto de agua de brazos radiales (en inglés, radial arm water maze) (4, 5, 79).

En estudios previos realizados en machos de 2,5 meses de edad la deficiencia de D2 no modifica la realización de la prueba del laberinto de agua de Morris cuando la plataforma está sumergida (75). Sin embargo, si tras la finalización de la prueba del laberinto de agua de Morris con la plataforma sumergida se colocaba la plataforma de forma visible, los ratones $Dio2^{-/-}$ tardaban más tiempo en subirse a la plataforma. Además, si tras la finalización de la prueba del laberinto de agua de

Morris con la plataforma sumergida se quitaba la plataforma y se volvía a realizar la prueba, los ratones $Dio2^{-/-}$ permanecían menos tiempo en el cuadrante donde se ubicaba la plataforma sumergida (Q1) en comparación con los ratones wt. En la ejecución de la prueba de escape del agua los animales son introducidos por primera vez en el agua con una plataforma visible y se evalúa el tiempo que necesitan para subir a la plataforma para escapar de una situación estresante, en este caso el agua. Los ratones $Dio2^{-/-}$ en esta prueba empleaban más tiempo que los ratones wt en subirse a la plataforma y por tanto en escapar de la situación estresante. Este comportamiento también justificaría el menor tiempo que permanecen los ratones $Dio2^{-/-}$ en el cuadrante donde se ubicaba la plataforma sumergida durante la realización de la prueba del laberinto de agua de Morris. Conjuntamente estos resultados podrían indicar una falta de motivación, de ansiedad o de estrés en los animales deficientes para la D2. Sin embargo, los autores de estos estudios concluyen que los niveles de ansiedad y de exploración (evaluados con la prueba del campo abierto y la del laberinto en cruz elevado) no estaban alterados por la deficiencia de D2. Aunque los animales $Dio2^{-/-}$ en estos estudios mostraron una tendencia a presentar menores niveles de ansiedad y menor capacidad exploratoria.

Por los resultados anteriores, y debido a que la inmersión en el agua aumenta el nivel de estrés de los animales, decidimos evaluar la influencia de la D2 en las capacidades de memoria y aprendizaje espacial utilizando la prueba de Barnes. Esta prueba también evalúa capacidades de aprendizaje y memoria dependientes de un buen funcionamiento de la HPC, pero requiere poco esfuerzo físico y está considerada poco estresante para los animales. Nuestros resultados indican que la deficiencia de D2 no altera la memoria espacial ya que los ratones $Dio2^{-/-}$ cometen el mismo número de errores primarios (errores antes de encontrar el agujero de salida) que los ratones wt, tanto durante las sesiones de entrenamiento como el día de la prueba. Además, en el día de la prueba los ratones $Dio2^{-/-}$ permanecen el mismo porcentaje de tiempo que los ratones wt en el cuadrante donde se encontraba el agujero de salida (Q1), lo que también indica que la deficiencia de D2 no induce alteraciones en la memoria espacial. Sin embargo, el aumento en el número de errores primarios más secundarios realizado por los ratones $Dio2^{-/-}$ durante las sesiones de entrenamiento reflejaría una falta de motivación en los animales para refugiarse una vez encontrado el agujero de salida. El día de realización de la prueba los ratones $Dio2^{-/-}$ exploraron un menor número de veces el agujero de salida y además realizaron un menor número de errores secundarios. La falta de motivación descrita anteriormente, debida a la deficiencia de D2, justificaría este menor nivel exploratorio en busca de una nueva estrategia para resolver una situación *a priori* desapacible para un ratón. Además, datos no incluidos en esta tesis doctoral indicaron un aumento muy significativo en el tiempo que los ratones $Dio2^{-/-}$ permanecen en el tablero antes de introducirse en el agujero de salida. Esto corroboraría la falta de motivación que presentan estos animales por refugiarse a pesar de haber encontrado el lugar donde hacerlo.

En resumen, nuestros resultados corroboran los resultados publicados por la Dra. Galton y cols. confirmando que la deficiencia de D2 no altera la memoria espacial. Sin embargo, creemos que la

deficiencia de D2 puede estar induciendo una posible falta de motivación e influir en las capacidades de estrés y ansiedad de los animales y que repercute en la realización de las pruebas cognitivas. Por este motivo, actualmente estamos realizando más pruebas para poder evaluar estas alteraciones funcionales en los ratones $Dio2^{-/-}$.

4.2 Prueba de condicionamiento del miedo

La prueba de condicionamiento del miedo es una prueba que evalúa el aprendizaje y la memoria emocional asociada al miedo. Para la realización de esta prueba los ratones deben asociar un estímulo inocuo condicionado (un contexto o un tono) a un estímulo aversivo no condicionado (una descarga eléctrica). En primer lugar evaluamos la capacidad auditiva de los ratones debido a que estudios previos indicaban que la deficiencia de D2 inducía una hipoacusia moderada en ratones $Dio2^{-/-}$ a 1 y 3 meses de edad (143). Nuestros resultados de los PEATC en ratones $Dio2^{-/-}$ de 6 meses de edad corroboran estos hallazgos, mostrando también una hipoacusia moderada en estos animales. Para asegurar la percepción del tono por todos los animales en la prueba de condicionamiento del miedo al tono, se analizó el umbral auditivo obtenido en respuesta a la estimulación con tonos puros. Por estos resultados se determinó que la mejor intensidad de estimulación para el desarrollo de la prueba de condicionamiento del miedo era 80 dB a una frecuencia de 8 kHz.

Nuestros resultados indican que la deficiencia de D2 no afecta al proceso de aprendizaje necesario para asociar el estímulo aversivo con la información contextual y auditiva. La deficiencia de D2 tampoco afecta a la memoria del miedo al contexto, pero sin embargo, induce una potenciación de la memoria del miedo al tono cuantificada por una mayor respuesta de inmovilización en los ratones $Dio2^{-/-}$ ante la presencia del tono a las 48 h del condicionamiento. Además, los ratones $Dio2^{-/-}$ tenían una respuesta de extinción al miedo ligeramente disminuida y una mayor respuesta de inmovilización ante la presencia del estímulo aversivo en la recuperación espontánea de la memoria del miedo condicionado. Estos resultados están en concordancia con el único estudio realizado hasta la fecha de similares características utilizando ratas adultas tiroidectomizadas (136).

La prueba de condicionamiento del miedo al contexto depende tanto de un buen funcionamiento de la amígdala como de la HPC y la prueba del condicionamiento al sonido fundamentalmente de un buen funcionamiento de la amígdala. La HPC interviene en la formación de una representación integrada del contexto (126, 156) y la amígdala en la generación de la respuesta de inmovilización del animal ante el estímulo aversivo. Nuestros resultados de la prueba de sensibilidad a la descarga eléctrica descartaron posibles alteraciones en la percepción sensorial del estímulo no condicionado debidas a la deficiencia de D2. Estudios previos en la prueba de campo abierto también descartan que unos elevados

niveles de ansiedad en los animales deficientes de D2 pudieran explicar esta mayor potenciación de la memoria del miedo al sonido (75). Conjuntamente estos resultados indican que la deficiencia de D2 no altera la función de la HPC en el establecimiento de memorias emocionales, pero sí que induce una mayor sensibilidad al establecimiento y al procesamiento de memorias traumáticas muy probablemente relacionadas con lesiones o alteraciones en la amígdala.

Existen mecanismos patológicos que relacionan el hipotiroidismo con la potenciación de la memoria del miedo condicionado. Esta asociación es el resultado de una mayor actividad de la amígdala por alteraciones en la expresión génica en esta región debidas al hipotiroidismo. La T3 modula la expresión génica por unión a los receptores nucleares específicos TRs. En hipotiroidismo, la alteración en la transcripción de genes diana de T3 se debe mayoritariamente a la represión de la transcripción (142). Se ha demostrado que el hipotiroidismo provoca cambios en la expresión de TRs en regiones específicas (42, 172). Así mismo, la amígdala es una región cerebral con alta expresión de TRs (159). Recientemente se ha demostrado que el hipotiroidismo induce una disminución específica de la expresión de TR β 1 en el núcleo lateral y basolateral de la amígdala (LA/BLA), seguramente en compensación a la deficiencia de T3 (136). A diferencia de los bajos niveles plasmáticos de T3 en hipotiroidismo, la concentración plasmática de T3 en ratones Dio2^{-/-} no se ve alterada. Estos resultados indicarían que los niveles de T3 en la amígdala de los ratones Dio2^{-/-} no son suficientes y generan un fenotipo hipotiroideo en esta región. Para comprobar esta hipótesis deberían realizarse más estudios, como la determinación de HT y/o alteraciones en la expresión de genes sensibles a T3 e importantes en la señalización de T3 en esta región. Sin embargo, algunos de estos estudios presentan dificultades técnicas por el pequeño tamaño de la amígdala y por la composición anatómica de la misma.

La consolidación de la memoria, la extinción y la recuperación de experiencias emocionalmente desagradables se debe a la activación de los receptores de corticosteroides, por un lado los GR y por otro los MR, en el LA/BLA (165, 201). La liberación de glucocorticoides, debida a las sesiones de entrenamiento en el condicionamiento al miedo, tiene una elevada implicación en la consolidación de la memoria aversiva (41, 43). Los glucocorticoides se liberan previa estimulación del eje HHA en respuesta a un estímulo aversivo (163). En hipotiroidismo se han descrito expresión de GR y MR elevadas en el LA/BLA y niveles plasmáticos de corticosterona también elevados en respuesta al estímulo aversivo (136). Por ello, se ha propuesto que el mecanismo de la potenciación del miedo en hipotiroidismo se podría explicar por un aumento en la señalización de corticosterona por unión a receptores GR y MR en el LA/BLA. La deficiencia de D2 no induce una mayor liberación de corticosterona en respuesta a un estímulo aversivo, lo que estaría de acuerdo con los estudios mencionados anteriormente, en los que no se encuentran niveles elevados de ansiedad en los animales Dio2^{-/-} (75). Por ello, un aumento de la activación del eje HHA tras un estímulo aversivo no sería el mecanismo responsable de la potenciación de la memoria emocional como ocurre en el hipotiroidismo adulto (136).

5. Plasticidad sináptica en la región CA1 del hipocampo

La estimulación sináptica de las fibras colaterales de Schaffer (sinapsis entre las células piramidales de las regiones CA3 y CA1 del hipocampo) genera potenciales sinápticos excitadores mediados por la activación de receptores de glutamato de tipo AMPA. Cuando estas sinapsis se someten a patrones de estimulación determinados se provocan potenciaciones sinápticas duraderas (LTPs y LTDs) que están consideradas como los mecanismos celulares que subyacen a los procesos de memoria y aprendizaje (129).

Existen numerosas evidencias experimentales que demuestran que el hipotiroidismo en el adulto provoca alteraciones en los mecanismos de plasticidad sináptica así como déficit en los fenómenos nemónicos (3, 71).

Por la reducción de los niveles de T3 en distintas regiones del SNC (incluido el hipocampo) en los ratones $Dio2^{-/-}$, como por los estudios electrofisiológicos publicados en hipotiroidismo adulto (niveles bajos de T3 y de T4), hemos querido estudiar el efecto que tiene la falta de actividad D2 en la transmisión sináptica basal y en los procesos de plasticidad sináptica.

Nuestros resultados *in vitro* de la curva estímulo/respuesta muestran que las respuestas sinápticas, mediadas por receptores AMPA, tienen la misma eficacia sináptica en respuesta a una intensidad de estimulación creciente en los ratones $Dio2^{-/-}$ y en los ratones wt. Tampoco se observaron alteraciones en la liberación del neurotransmisor glutamato en los ratones deficientes para D2, ya que no se detectaron diferencias significativas en el cociente de FPP (protocolo que detecta cambios en la liberación de neurotransmisor) entre ambos genotipos. Estos resultados concuerdan con estudios previos del laboratorio, realizados *in vivo* con ratas hipotiroideas adultas donde tampoco observaban alteraciones en la FPP (71). Sin embargo, nuestros resultados están en desacuerdo con los obtenidos por otro grupo de investigación en los que observan como la FPP en estudios *in vitro* en la sinapsis CA3-CA1 está completamente alterada en ratas hipotiroideas (189). La disminución de aproximadamente un 40 % de T3 a nivel local en el hipocampo, junto con los niveles plasmáticos de T3 eutiroides podrían ser la razón de la correcta eficacia sináptica y de la maquinaria presináptica observada tanto en la curva estímulo/respuesta como en la FPP.

La deficiencia de D2 no parece afectar ni a la inducción ni al mantenimiento de varios tipos de fenómenos de plasticidad sináptica duradera, como son la E-LTP, la L-LTP y la LTD. Tanto la E-LTP, la L-LTP como la LTD requieren para su inducción de la activación de los receptores NMDA.

Con la finalidad de descartar que los protocolos de estimulación utilizados pudieran estar produciendo una saturación sináptica que enmascararse posibles alteraciones debidas a la deficiencia

de D2, realizamos una segunda tanda de experimentos induciendo la LTP con un protocolo de estimulación de menor intensidad (TBS) de la producida por los HFS. La inducción de la LTP usando 2 y 3 TBS no mostró diferencias ni en la potenciación, ni en su mantenimiento, debidas a la deficiencia de D2.

En condiciones de hipotiroidismo adulto se ha demostrado que, la deficiencia de T3 y T4 no permite la generación de la LTP (3, 6, 71, 78). Estudios realizados, utilizando como modelo de hipotiroidismo ratas tiroidectomizadas demuestran que la administración de un tratamiento hormonal con T4 es capaz de revertir por completo los niveles de potenciación sináptica posteriores al HFS (5, 6).

Los niveles de HT en la HPC de ratones $Dio2^{-/-}$ en esta tesis muestran niveles de T3 y T4 reducidos a nivel local, mientras que en plasma los niveles de T4 se encuentran aumentados al doble. La no afectación en los ratones $Dio2^{-/-}$ de la capacidad de plasticidad sináptica en la HPC contrasta con las alteraciones que se observan en condiciones de hipotiroidismo. Esto posiblemente se deba a que niveles de HT disminuidos en un 50 % podrían ser suficientes para el correcto funcionamiento de la HPC. Además, la reciente aceptación de acciones extragenómicas de T4 podría explicar la ausencia de alteraciones en plasticidad sináptica en la región CA1 del hipocampo (53, 54). Actualmente diversos estudios indican que la T4 podría estar modulando proteínas implicadas en procesos de plasticidad sináptica (5).

CONCLUSIONES



1. La deficiencia de D2 altera las concentraciones intracerebrales de T3 y T4 y los niveles plasmáticos de T4. La deficiencia de D2 no altera los niveles plasmáticos de T3, sin embargo las concentraciones de T3 en las distintas regiones cerebrales se encuentran mayoritariamente disminuidas. La deficiencia de D2 induce un aumento de 2 veces tanto en los niveles plasmáticos de T4 como en las concentraciones de T4 en la corteza cerebral, la única región con concentraciones elevadas de T4 en los ratones deficientes para D2. Sin embargo, la deficiencia de D2 disminuye las concentraciones de T4 en la formación hipocámpal y el cerebelo. La actividad de la D1 no se modifica en condiciones de deficiencia de D2 en ninguna de las regiones cerebrales estudiadas, a pesar de las alteraciones en las concentraciones de HT en estas regiones.
2. Los ratones deficientes para D2 tienen mayor tolerancia a la glucosa y mayor sensibilidad a la insulina. Este aumento en la sensibilidad a la insulina no se ha asociado con alteraciones en la señalización de la insulina, evaluada mediante el análisis de la fosforilación de Akt.
3. La deficiencia de D2 en el estadio adulto induce un aumento en el umbral auditivo tanto en respuesta a “click” como en respuesta a tonos puros (1, 2 y 8 kHz), genera un retraso de la señal nerviosa a nivel del receptor auditivo, una disminución en el número de neuronas activadas a nivel del gánglio coclear y un aumento de la velocidad de transmisión del impulso nervioso a través de la vía auditiva. El incremento de la velocidad probablemente se produzca para compensar el retraso de la señal nerviosa originado a nivel del receptor.
4. La deficiencia de D2 no altera la velocidad de conducción nerviosa en el nervio ciático evaluada mediante el análisis de la onda directa (motora) y de la onda refleja (sensorial-motora).
5. La deficiencia de D2 provoca una disminución del tono o fuerza muscular que se agrava con la edad y que repercute en la ejecución de las distintas tareas motoras evaluadas. A nivel locomotor esta pérdida del tono o fuerza muscular debida a la deficiencia de D2 se manifiesta en alteraciones en el patrón de la marcha de los animales. Los ratones deficientes en D2 muestran un aumento en la amplitud entre las extremidades tanto anteriores como sobretodo posteriores, así como en una menor longitud de la zancada de ambas extremidades al caminar.

6. La evaluación de la coordinación motora y/o el equilibrio mediante la tarea motora del rodillo giratorio muestra graves alteraciones debidas a la deficiencia de D2 a los 6 meses de edad, sin encontrarse alteraciones en las habilidades motoras de los animales a los 3 meses de edad. La deficiencia de D2 sin embargo no altera la ejecución de la prueba del poste vertical, otra prueba que también evalúa la coordinación motora de los animales, ni a 3 ni a 6 meses de edad. En conjunto, la disminución del tono y la fuerza muscular provocada por la deficiencia en D2 que se agrava con la edad, explicaría las alteraciones en la ejecución de la prueba del rodillo giratorio, aunque tampoco pueden descartarse disfunciones en distintas estructuras del SN implicadas en la coordinación motora y el equilibrio.

7. Para estudiar la posible reversión de las alteraciones motoras se diseñó un tratamiento hormonal con T3 y T4 con el fin de recuperar los niveles hormonales de los tejidos sin provocar hipotiroxinemia. Ninguna de las alteraciones motoras provocadas por la deficiencia de D2 pudo recuperarse o revertirse con el tratamiento de HT utilizado.

8. La deficiencia de D2 no produce alteraciones en el aprendizaje y en la memoria espacial. Sin embargo, la deficiencia de D2 disminuye tanto la capacidad exploratoria como la capacidad para desarrollar una nueva estrategia para resolver situaciones *a priori* desapacibles para un ratón.

9. La deficiencia de D2 altera el procesamiento de la memoria emocional dependiente de la amígdala, potenciándola, retrasando su extinción y aumentando considerablemente la recuperación espontánea de esta memoria del miedo condicionado. El mecanismo de esta potenciación no está relacionado con un aumento en la liberación de corticosterona en respuesta al estímulo aversivo, como ocurre en condiciones de hipotiroidismo. En cambio, la deficiencia de D2 no altera el procesamiento de la memoria del miedo al contexto, que es dependiente de un buen funcionamiento tanto de la formación hipocampal como de la amígdala, lo que indica que la participación de la formación hipocampal en esta tarea no está modificada por la deficiencia de D2.

10. La deficiencia de D2 no altera ni la eficacia sináptica ni la inducción de dos formas de plasticidad sináptica duradera como son la LTD y la LTP en la sinapsis CA3-CA1 del hipocampo.

BIBLIOGRAFÍA



1. **Abel, T., P. V. Nguyen, M. Barad, T. A. Deuel, E. R. Kandel, and R. Bourtchouladze.** 1997. Genetic demonstration of a role for PKA in the late phase of LTP and in hippocampus-based long-term memory. *Cell* **88**:615-626.
2. **Alvarez-Buylla, A., and D. A. Lim.** 2004. For the long run: maintaining germinal niches in the adult brain. *Neuron* **41**:683-686.
3. **Alzoubi, K. H., A. M. Aleisa, and K. A. Alkadhi.** 2007. Adult-onset hypothyroidism facilitates and enhances LTD: reversal by chronic nicotine treatment. *Neurobiol Dis* **26**:264-272.
4. **Alzoubi, K. H., A. M. Aleisa, N. Z. Gerges, and K. A. Alkadhi.** 2006. Nicotine reverses adult-onset hypothyroidism-induced impairment of learning and memory: Behavioral and electrophysiological studies. *J Neurosci Res* **84**:944-953.
5. **Alzoubi, K. H., N. Z. Gerges, A. M. Aleisa, and K. A. Alkadhi.** 2009. Levothyroxin restores hypothyroidism-induced impairment of hippocampus-dependent learning and memory: Behavioral, electrophysiological, and molecular studies. *Hippocampus* **19**:66-78.
6. **Alzoubi, K. H., N. Z. Gerges, and K. A. Alkadhi.** 2005. Levothyroxin restores hypothyroidism-induced impairment of LTP of hippocampal CA1: electrophysiological and molecular studies. *Exp Neurol* **195**:330-341.
7. **Andersen, P., S. H. Sundberg, O. Sveen, and H. Wigström.** 1977. Specific long-lasting potentiation of synaptic transmission in hippocampal slices. *Nature* **266**:736-737.
8. **Appelhof, B. C., R. P. Peeters, W. M. Wiersinga, T. J. Visser, E. M. Wekking, J. Huyser, A. H. Schene, J. G. Tijssen, W. J. Hoogendijk, and E. Fliers.** 2005. Polymorphisms in type 2 deiodinase are not associated with well-being, neurocognitive functioning, and preference for combined thyroxine/3,5,3'-triiodothyronine therapy. *J Clin Endocrinol Metab* **90**:6296-6299.
9. **Banke, T. G., D. Bowie, H. Lee, R. L. Huganir, A. Schousboe, and S. F. Traynelis.** 2000. Control of GluR1 AMPA receptor function by cAMP-dependent protein kinase. *J Neurosci* **20**:89-102.
10. **Barlow, C., S. Hirotsune, R. Paylor, M. Liyanage, M. Eckhaus, F. Collins, Y. Shiloh, J. N. Crawley, T. Ried, D. Tagle, and A. Wynshaw-Boris.** 1996. Atm-deficient mice: a paradigm of ataxia telangiectasia. *Cell* **86**:159-171.
11. **Barnes, C. A.** 1988. Aging and the physiology of spatial memory. *Neurobiol Aging* **9**:563-568.
12. **Bassett, J. H., A. Boyde, P. G. Howell, R. H. Bassett, T. M. Galliford, M. Archanco, H. Evans, M. A. Lawson, P. Croucher, D. L. St Germain, V. A. Galton, and G. R. Williams.** 2010. Optimal bone strength and mineralization requires the type 2 iodothyronine deiodinase in osteoblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**:7604-7609.
13. **Bates, J. M., D. L. St Germain, and V. A. Galton.** 1999. Expression profiles of the three iodothyronine deiodinases, D1, D2, and D3, in the developing rat. *Endocrinology* **140**:844-851.
14. **Baumgartner, A., L. Hiedra, G. Pinna, M. Eravci, H. Prengel, and H. Meinhold.** 1998. Rat brain type II 5'-iodothyronine deiodinase activity is extremely sensitive to stress. *J Neurochem* **71**:817-826.
15. **Becker, K. B., K. C. Stephens, J. C. Davey, M. J. Schneider, and V. A. Galton.** 1997. The type 2 and type 3 iodothyronine deiodinases play important roles in coordinating development in *Rana catesbeiana* tadpoles. *Endocrinology* **138**:2989-2997.

16. **Bergh, J. J., H. Y. Lin, L. Lansing, S. N. Mohamed, F. B. Davis, S. Mousa, and P. J. Davis.** 2005. Integrin alphaVbeta3 contains a cell surface receptor site for thyroid hormone that is linked to activation of mitogen-activated protein kinase and induction of angiogenesis. *Endocrinology* **146**:2864-2871.
17. **Bernal, J.** 2005. Thyroid hormones and brain development. *Vitam Horm* **71**:95-122.
18. **Bianco, A. C., and B. W. Kim.** 2006. Deiodinases: implications of the local control of thyroid hormone action. *J Clin Invest* **116**:2571-2579.
19. **Bianco, A. C., D. Salvatore, B. Gereben, M. J. Berry, and P. R. Larsen.** 2002. Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases. *Endocr Rev* **23**:38-89.
20. **Bianco, A. C., and J. E. Silva.** 1988. Cold exposure rapidly induces virtual saturation of brown adipose tissue nuclear T3 receptors. *Am J Physiol* **255**:E496-503.
21. **Bianco, A. C., and J. E. Silva.** 1987. Intracellular conversion of thyroxine to triiodothyronine is required for the optimal thermogenic function of brown adipose tissue. *J Clin Invest* **79**:295-300.
22. **Bianco, A. C., and J. E. Silva.** 1987. Nuclear 3,5,3'-triiodothyronine (T3) in brown adipose tissue: receptor occupancy and sources of T3 as determined by in vivo techniques. *Endocrinology* **120**:55-62.
23. **Bito, H., K. Deisseroth, and R. W. Tsien.** 1996. CREB phosphorylation and dephosphorylation: a Ca(2+)- and stimulus duration-dependent switch for hippocampal gene expression. *Cell* **87**:1203-1214.
24. **Bliss, T. V., and A. R. Gardner-Medwin.** 1973. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the unanaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol* **232**:357-374.
25. **Bolli, G. B., and C. G. Fanelli.** 1999. Physiology of glucose counterregulation to hypoglycemia. *Endocrinol Metab Clin North Am* **28**:467-493, v.
26. **Bouet, V., T. Freret, J. Toutain, D. Divoux, M. Boulouard, and P. Schumann-Bard.** 2007. Sensorimotor and cognitive deficits after transient middle cerebral artery occlusion in the mouse. *Exp Neurol* **203**:555-567.
27. **Boyages, S. C.** 1996. The neuromuscular system and brain in hypothyroidism, p. 631-633. *In* L. Braverman and R. Utiger (ed.), *Werner and Ingbar's "The Thyroid: A fundamental and clinical text"*, 7th ed. Lippincott-Ravm, Philadelphia.
28. **Bozon, B., S. Davis, and S. Laroche.** 2003. A requirement for the immediate early gene zif268 in reconsolidation of recognition memory after retrieval. *Neuron* **40**:695-701.
29. **Bradley, D. J., H. C. Towle, and W. S. Young, 3rd.** 1992. Spatial and temporal expression of alpha- and beta-thyroid hormone receptor mRNAs, including the beta 2-subtype, in the developing mammalian nervous system. *J Neurosci* **12**:2288-2302.
30. **Brooks, D. C., and M. E. Bouton.** 1993. A retrieval cue for extinction attenuates spontaneous recovery. *J Exp Psychol Anim Behav Process* **19**:77-89.
31. **Burek, M. J., and R. W. Oppenheim.** 1996. Programmed cell death in the developing nervous system. *Brain Pathol* **6**:427-446.

32. **Burmeister, L. A., M. Ganguli, H. H. Dodge, T. Toczek, S. T. DeKosky, and R. D. Nebes.** 2001. Hypothyroidism and cognition: preliminary evidence for a specific defect in memory. *Thyroid* **11**:1177-1185.
33. **Butler, P. W., S. M. Smith, J. D. Linderman, R. J. Brychta, A. T. Alberobello, O. M. Dubaz, J. A. Luzon, M. C. Skarulis, C. S. Cochran, R. A. Wesley, F. Pucino, and F. S. Celi.** 2010. The Thr92Ala 5' type 2 deiodinase gene polymorphism is associated with a delayed triiodothyronine secretion in response to the thyrotropin-releasing hormone-stimulation test: a pharmacogenomic study. *Thyroid* **20**:1407-1412.
34. **Campos-Barros, A., L. L. Amma, J. S. Faris, R. Shailam, M. W. Kelley, and D. Forrest.** 2000. Type 2 iodothyronine deiodinase expression in the cochlea before the onset of hearing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:1287-1292.
35. **Canani, L. H., C. Capp, J. M. Dora, E. L. Meyer, M. S. Wagner, J. W. Harney, P. R. Larsen, J. L. Gross, A. C. Bianco, and A. L. Maia.** 2005. The type 2 deiodinase A/G (Thr92Ala) polymorphism is associated with decreased enzyme velocity and increased insulin resistance in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* **90**:3472-3478.
36. **Canani, L. H., M. A. Leie, W. E. Machado, C. Capp, and A. L. Maia.** 2007. Type 2 deiodinase Thr92Ala polymorphism is not associated with arterial hypertension in type 2 diabetes mellitus patients. *Hypertension* **49**:e47; author reply e48.
37. **Capet, C., A. Jégo, P. Denis, D. Noel, I. Clerc, A. C. Cornier, H. Lefebvre, H. Levesque, P. Chassagne, E. Bercoff, and J. Doucet.** 2000. [Is cognitive change related to hypothyroidism reversible with replacement therapy?]. *Rev Med Interne* **21**:672-678.
38. **Castillo, M., J. A. Hall, M. Correa-Medina, C. Ueta, H. Won Kang, D. E. Cohen, and A. C. Bianco.** 2011. Disruption of thyroid hormone activation in type 2 deiodinase knockout mice causes obesity with glucose intolerance and liver steatosis only at thermoneutrality. *Diabetes* **60**:1082-1089.
39. **Ceballos, A., M. M. Belinchón, E. Sánchez-Mendoza, C. Grijota-Martínez, A. M. Dumitrescu, S. Refetoff, B. Morte, and J. Bernal.** 2009. Importance of monocarboxylate transporter 8 for the blood-brain barrier-dependent availability of 3,5,3'-triiodo-L-thyronine. *Endocrinology* **150**:2491-2496.
40. **Cediél, R., R. Riquelme, J. Contreras, A. Díaz, and I. Varela-Nieto.** 2006. Sensorineural hearing loss in insulin-like growth factor I-null mice: a new model of human deafness. *Eur J Neurosci* **23**:587-590.
41. **Conrad, C. D., M. L. Mauldin-Jourdain, and R. J. Hobbs.** 2001. Metyrapone reveals that previous chronic stress differentially impairs hippocampal-dependent memory. *Stress* **4**:305-318.
42. **Constantinou, C., M. Margarity, and T. Valcana.** 2005. Region-specific effects of hypothyroidism on the relative expression of thyroid hormone receptors in adult rat brain. *Mol Cell Biochem* **278**:93-100.
43. **Cordero, M. I., J. J. Merino, and C. Sandi.** 1998. Correlational relationship between shock intensity and corticosterone secretion on the establishment and subsequent expression of contextual fear conditioning. *Behav Neurosci* **112**:885-891.
44. **Costa, A. C., and M. J. Grybko.** 2005. Deficits in hippocampal CA1 LTP induced by TBS but not HFS in the Ts65Dn mouse: a model of Down syndrome. *Neurosci Lett* **382**:317-322.

45. **Costa, A. C., K. Walsh, and M. T. Davisson.** 1999. Motor dysfunction in a mouse model for Down syndrome. *Physiol Behav* **68**:211-220.
46. **Crantz, F. R., and P. R. Larsen.** 1980. Rapid thyroxine to 3,5,3'-triiodothyronine conversion and nuclear 3,5,3'-triiodothyronine binding in rat cerebral cortex and cerebellum. *J Clin Invest* **65**:935-938.
47. **Cross, D. A., D. R. Alessi, P. Cohen, M. Andjelkovich, and B. A. Hemmings.** 1995. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* **378**:785-789.
48. **Cheng, S. Y., J. L. Leonard, and P. J. Davis.** 2010. Molecular aspects of thyroid hormone actions. *Endocr Rev* **31**:139-170.
49. **Cho, H., J. Mu, J. K. Kim, J. L. Thorvaldsen, Q. Chu, E. B. Crenshaw, 3rd, K. H. Kaestner, M. S. Bartolomei, G. I. Shulman, and M. J. Birnbaum.** 2001. Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKB beta). *Science* **292**:1728-1731.
50. **Christie, B. R., and H. A. Cameron.** 2006. Neurogenesis in the adult hippocampus. *Hippocampus* **16**:199-207.
51. **Christoffolete, M. A., R. Arrojo e Drigo, F. Gazoni, S. M. Tente, V. Goncalves, B. S. Amorim, P. R. Larsen, A. C. Bianco, and A. M. Zavacki.** 2007. Mice with impaired extrathyroidal thyroxine to 3,5,3'-triiodothyronine conversion maintain normal serum 3,5,3'-triiodothyronine concentrations. *Endocrinology* **148**:954-960.
52. **Christoffolete, M. A., C. C. Linardi, L. de Jesus, K. N. Ebina, S. D. Carvalho, M. O. Ribeiro, R. Rabelo, C. Curcio, L. Martins, E. T. Kimura, and A. C. Bianco.** 2004. Mice with targeted disruption of the Dio2 gene have cold-induced overexpression of the uncoupling protein 1 gene but fail to increase brown adipose tissue lipogenesis and adaptive thermogenesis. *Diabetes* **53**:577-584.
53. **Davis, P. J., J. L. Leonard, and F. B. Davis.** 2008. Mechanisms of nongenomic actions of thyroid hormone. *Front Neuroendocrinol* **29**:211-218.
54. **Davis, P. J., A. Shih, H. Y. Lin, L. J. Martino, and F. B. Davis.** 2000. Thyroxine promotes association of mitogen-activated protein kinase and nuclear thyroid hormone receptor (TR) and causes serine phosphorylation of TR. *J Biol Chem* **275**:38032-38039.
55. **Dayer, A. G., A. A. Ford, K. M. Cleaver, M. Yassaee, and H. A. Cameron.** 2003. Short-term and long-term survival of new neurons in the rat dentate gyrus. *J Comp Neurol* **460**:563-572.
56. **de Jesus, L. A., S. D. Carvalho, M. O. Ribeiro, M. Schneider, S. W. Kim, J. W. Harney, P. R. Larsen, and A. C. Bianco.** 2001. The type 2 iodothyronine deiodinase is essential for adaptive thermogenesis in brown adipose tissue. *J Clin Invest* **108**:1379-1385.
57. **del Ser Quijano, T., C. Delgado, S. Martínez Espinosa, and C. Vázquez.** 2000. [Cognitive deficiency in mild hypothyroidism]. *Neurologia* **15**:193-198.
58. **Dentice, M., A. Marsili, R. Ambrosio, O. Guardiola, A. Sibilio, J. H. Paik, G. Minchiotti, R. A. DePinho, G. Fenzi, P. R. Larsen, and D. Salvatore.** 2010. The FoxO3/type 2 deiodinase pathway is required for normal mouse myogenesis and muscle regeneration. *J Clin Invest* **120**:4021-4030.

59. **Desvergne, B.** 1994. How do thyroid hormone receptors bind to structurally diverse response elements? *Molecular and cellular endocrinology* **100**:125-131.
60. **Djuricic, B., R. Berger, and W. Paschen.** 1994. Protein synthesis and energy metabolism in hippocampal slices during extended (24 hours) recovery following different periods of ischemia. *Metab Brain Dis* **9**:377-389.
61. **Dora, J. M., W. E. Machado, J. Rheinheimer, D. Crispim, and A. L. Maia.** 2010. Association of the type 2 deiodinase Thr92Ala polymorphism with type 2 diabetes: case-control study and meta-analysis. *Eur J Endocrinol* **163**:427-434.
62. **Dumitrescu, A. M., X. H. Liao, R. E. Weiss, K. Millen, and S. Refetoff.** 2006. Tissue-specific thyroid hormone deprivation and excess in monocarboxylate transporter (mct) 8-deficient mice. *Endocrinology* **147**:4036-4043.
63. **Ehlers, M. D.** 2000. Reinsertion or degradation of AMPA receptors determined by activity-dependent endocytic sorting. *Neuron* **28**:511-525.
64. **Eriksson, P. S., E. Perfilieva, T. Bjork-Eriksson, A. M. Alborn, C. Nordborg, D. A. Peterson, and F. H. Gage.** 1998. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med* **4**:1313-1317.
65. **Escámez, M. J., A. Guadaño-Ferraz, A. Cuadrado, and J. Bernal.** 1999. Type 3 iodothyronine deiodinase is selectively expressed in areas related to sexual differentiation in the newborn rat brain. *Endocrinology* **140**:5443-5446.
66. **Escobar-Morreale, H. F., F. E. del Rey, M. J. Obregón, and G. M. de Escobar.** 1996. Only the combined treatment with thyroxine and triiodothyronine ensures euthyroidism in all tissues of the thyroidectomized rat. *Endocrinology* **137**:2490-2502.
67. **Estivalet, A. A., L. B. Leiria, J. M. Dora, J. Rheinheimer, A. P. Boucas, A. L. Maia, and D. Crispim.** 2011. D2 Thr92Ala and PPARgamma2 Pro12Ala polymorphisms interact in the modulation of insulin resistance in type 2 diabetic patients. *Obesity (Silver Spring)* **19**:825-832.
68. **Fanselow, M. S., and J. E. LeDoux.** 1999. Why we think plasticity underlying Pavlovian fear conditioning occurs in the basolateral amygdala. *Neuron* **23**:229-232.
69. **Fanselow, M. S., and A. M. Poulos.** 2005. The neuroscience of mammalian associative learning. *Annu Rev Psychol* **56**:207-234.
70. **Feldman, S., and J. Weidenfeld.** 1996. Involvement of amygdalar alpha adrenoceptors in hypothalamo-pituitary-adrenocortical responses. *Neuroreport* **7**:3055-3057.
71. **Fernández-Lamo, I., A. Montero-Pedrazuela, J. M. Delgado-García, A. Guadaño-Ferraz, and A. Gruart.** 2009. Effects of thyroid hormone replacement on associative learning and hippocampal synaptic plasticity in adult hypothyroid rats. *Eur J Neurosci* **30**:679-692.
72. **Flamant, F., A. L. Poguet, M. Plateroti, O. Chassande, K. Gauthier, N. Streichenberger, A. Mansouri, and J. Samarut.** 2002. Congenital hypothyroid Pax8(-/-) mutant mice can be rescued by inactivating the TRalpha gene. *Mol Endocrinol* **16**:24-32.
73. **Gaiarsa, J. L., O. Caillard, and Y. Ben-Ari.** 2002. Long-term plasticity at GABAergic and glycinergic synapses: mechanisms and functional significance. *Trends Neurosci* **25**:564-570.

74. **Galton, V. A., M. J. Schneider, A. S. Clark, and D. L. St Germain.** 2009. Life without thyroxine to 3,5,3'-triiodothyronine conversion: studies in mice devoid of the 5'-deiodinases. *Endocrinology* **150**:2957-2963.
75. **Galton, V. A., E. T. Wood, E. A. St Germain, C. A. Withrow, G. Aldrich, G. M. St Germain, A. S. Clark, and D. L. St Germain.** 2007. Thyroid hormone homeostasis and action in the type 2 deiodinase-deficient rodent brain during development. *Endocrinology* **148**:3080-3088.
76. **Garofalo, R. S., S. J. Orena, K. Rafidi, A. J. Torchia, J. L. Stock, A. L. Hildebrandt, T. Coskran, S. C. Black, D. J. Brees, J. R. Wicks, J. D. McNeish, and K. G. Coleman.** 2003. Severe diabetes, age-dependent loss of adipose tissue, and mild growth deficiency in mice lacking Akt2/PKB beta. *J Clin Invest* **112**:197-208.
77. **Gereben, B., A. M. Zavacki, S. Ribich, B. W. Kim, S. A. Huang, W. S. Simonides, A. Zeold, and A. C. Bianco.** 2008. Cellular and molecular basis of deiodinase-regulated thyroid hormone signaling. *Endocr Rev* **29**:898-938.
78. **Gerges, N. Z., and K. A. Alkadhi.** 2004. Hypothyroidism impairs late LTP in CA1 region but not in dentate gyrus of the intact rat hippocampus: MAPK involvement. *Hippocampus* **14**:40-45.
79. **Gerges, N. Z., K. H. Alzoubi, C. R. Park, D. M. Diamond, and K. A. Alkadhi.** 2004. Adverse effect of the combination of hypothyroidism and chronic psychosocial stress on hippocampus-dependent memory in rats. *Behav Brain Res* **155**:77-84.
80. **Gerges, N. Z., J. L. Stringer, and K. A. Alkadhi.** 2001. Combination of hypothyroidism and stress abolishes early LTP in the CA1 but not dentate gyrus of hippocampus of adult rats. *Brain Res* **922**:250-260.
81. **Glass, C. K., and M. G. Rosenfeld.** 2000. The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes Dev* **14**:121-141.
82. **Gordon, J. T., F. L. Crutchfield, A. S. Jennings, and M. B. Dratman.** 1982. Preparation of lipid-free tissue extracts for chromatographic determination of thyroid hormones and metabolites. *Arch Biochem Biophys* **216**:407-415.
83. **Gould, E., C. S. Woolley, and B. S. McEwen.** 1991. The hippocampal formation: morphological changes induced by thyroid, gonadal and adrenal hormones. *Psychoneuroendocrinology* **16**:67-84.
84. **Grarup, N., M. K. Andersen, C. H. Andreasen, A. Albrechtsen, K. Borch-Johnsen, T. Jorgensen, J. Auwerx, O. Schmitz, T. Hansen, and O. Pedersen.** 2007. Studies of the common DIO2 Thr92Ala polymorphism and metabolic phenotypes in 7342 Danish white subjects. *J Clin Endocrinol Metab* **92**:363-366.
85. **Grozovsky, R., S. Ribich, M. L. Rosene, M. A. Mulcahey, S. A. Huang, M. E. Patti, A. C. Bianco, and B. W. Kim.** 2009. Type 2 deiodinase expression is induced by peroxisomal proliferator-activated receptor-gamma agonists in skeletal myocytes. *Endocrinology* **150**:1976-1983.
86. **Grunstein, M.** 1997. Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature* **389**:349-352.

87. **Guadaño-Ferraz, A., M. J. Escámez, E. Rausell, and J. Bernal.** 1999. Expression of type 2 iodothyronine deiodinase in hypothyroid rat brain indicates an important role of thyroid hormone in the development of specific primary sensory systems. *J Neurosci* **19**:3430-3439.
88. **Guadaño-Ferraz, A., M. J. Obregón, D. L. St Germain, and J. Bernal.** 1997. The type 2 iodothyronine deiodinase is expressed primarily in glial cells in the neonatal rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:10391-10396.
89. **Gumieniak, O., T. S. Perlstein, J. S. Williams, P. N. Hopkins, N. J. Brown, B. A. Raby, and G. H. Williams.** 2007. Ala92 type 2 deiodinase allele increases risk for the development of hypertension. *Hypertension* **49**:461-466.
90. **Guo, T. W., F. C. Zhang, M. S. Yang, X. C. Gao, L. Bian, S. W. Duan, Z. J. Zheng, J. J. Gao, H. Wang, R. L. Li, G. Y. Feng, D. St Clair, and L. He.** 2004. Positive association of the DIO2 (deiodinase type 2) gene with mental retardation in the iodine-deficient areas of China. *J Med Genet* **41**:585-590.
91. **Haggerty, J. J., Jr., J. C. Garbutt, D. L. Evans, R. N. Golden, C. Pedersen, J. S. Simon, and C. B. Nemeroff.** 1990. Subclinical hypothyroidism: a review of neuropsychiatric aspects. *Int J Psychiatry Med* **20**:193-208.
92. **Heemstra, K. A., H. Hoftijzer, W. M. van der Deure, R. P. Peeters, N. A. Hamdy, A. Pereira, E. P. Corssmit, J. A. Romijn, T. J. Visser, and J. W. Smit.** 2010. The type 2 deiodinase Thr92Ala polymorphism is associated with increased bone turnover and decreased femoral neck bone mineral density. *J Bone Miner Res* **25**:1385-1391.
93. **Heemstra, K. A., H. C. Hoftijzer, W. M. van der Deure, R. P. Peeters, E. Fliers, B. C. Appelhof, W. M. Wiersinga, E. P. Corssmit, T. J. Visser, and J. W. Smit.** 2009. Thr92Ala polymorphism in the type 2 deiodinase is not associated with T4 dose in athyroid patients or patients with Hashimoto thyroiditis. *Clin Endocrinol (Oxf)* **71**:279-283.
94. **Hernández, A., and M. J. Obregón.** 1996. T3 potentiates the adrenergic stimulation of type II 5'-deiodinase activity in cultured rat brown adipocytes. *Am J Physiol* **271**:E15-23.
95. **Heuer, H., M. K. Maier, S. Iden, J. Mittag, E. C. Friesema, T. J. Visser, and K. Bauer.** 2005. The monocarboxylate transporter 8 linked to human psychomotor retardation is highly expressed in thyroid hormone-sensitive neuron populations. *Endocrinology* **146**:1701-1706.
96. **Huang, H., L. Cai, B. F. Remo, and D. D. Brown.** 2001. Timing of metamorphosis and the onset of the negative feedback loop between the thyroid gland and the pituitary is controlled by type II iodothyronine deiodinase in *Xenopus laevis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:7348-7353.
97. **Huang, Y. Y., and E. R. Kandel.** 1994. Recruitment of long-lasting and protein kinase A-dependent long-term potentiation in the CA1 region of hippocampus requires repeated tetanization. *Learn Mem* **1**:74-82.
98. **Iglesias, R., J. A. Fernández, T. Mampel, M. J. Obregón, and F. Villarroya.** 1987. Iodothyronine 5'-deiodinase activity in rat brown adipose tissue during development. *Biochim Biophys Acta* **923**:233-240.
99. **Jansen, J., E. C. Friesema, C. Milici, and T. J. Visser.** 2005. Thyroid hormone transporters in health and disease. *Thyroid* **15**:757-768.
100. **Jensovsky, J., E. Ruzicka, N. Spackova, and B. Hejdukova.** 2002. Changes of event related potential and cognitive processes in patients with subclinical hypothyroidism after thyroxine treatment. *Endocr Regul* **36**:115-122.

101. **Kandel, E. R.** 2001. The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. *Science* **294**:1030-1038.
102. **Kaplan, M. M., and K. A. Yaskoski.** 1981. Maturational patterns of iodothyronine phenolic and tyrosyl ring deiodinase activities in rat cerebrum, cerebellum, and hypothalamus. *J Clin Invest* **67**:1208-1214.
103. **Kempermann, G.** 2002. Why new neurons? Possible functions for adult hippocampal neurogenesis. *J Neurosci* **22**:635-638.
104. **Kessels, H. W., and R. Malinow.** 2009. Synaptic AMPA receptor plasticity and behavior. *Neuron* **61**:340-350.
105. **Köhrle, J.** 2002. Iodothyronine deiodinases. *Methods Enzymol* **347**:125-167.
106. **Kwakkel, J., H. C. van Beeren, M. T. Ackermans, M. C. Platvoet-Ter Schiphorst, E. Fliers, W. M. Wiersinga, and A. Boelen.** 2009. Skeletal muscle deiodinase type 2 regulation during illness in mice. *J Endocrinol* **203**:263-270.
107. **Lang, P. J., and M. Davis.** 2006. Emotion, motivation, and the brain: reflex foundations in animal and human research. *Prog Brain Res* **156**:3-29.
108. **Laughlin, S. B., and T. J. Sejnowski.** 2003. Communication in neuronal networks. *Science* **301**:1870-1874.
109. **Lauri, S. E., M. Palmer, M. Segerstrale, A. Vesikansa, T. Taira, and G. L. Collingridge.** 2007. Presynaptic mechanisms involved in the expression of STP and LTP at CA1 synapses in the hippocampus. *Neuropharmacology* **52**:1-11.
110. **Lawlor, M. A., and D. R. Alessi.** 2001. PKB/Akt: a key mediator of cell proliferation, survival and insulin responses? *J Cell Sci* **114**:2903-2910.
111. **Lazar, M. A.** 1993. Thyroid hormone receptors: multiple forms, multiple possibilities. *Endocrine reviews* **14**:184-193.
112. **LeDoux, J.** 2007. The amygdala. *Curr Biol* **17**:R868-874.
113. **LeDoux, J. E.** 1995. Emotion: clues from the brain. *Annu Rev Psychol* **46**:209-235.
114. **Lee, H. K., M. Barbarosie, K. Kameyama, M. F. Bear, and R. L. Huganir.** 2000. Regulation of distinct AMPA receptor phosphorylation sites during bidirectional synaptic plasticity. *Nature* **405**:955-959.
115. **Leentjens, A. F., and E. J. Kappers.** 1995. Persistent cognitive defects after corrected hypothyroidism. *Psychopathology* **28**:235-237.
116. **Leonard, J. L., and I. N. Rosenberg.** 1980. Iodothyronine 5'-deiodinase from rat kidney: substrate specificity and the 5'-deiodination of reverse triiodothyronine. *Endocrinology* **107**:1376-1383.
117. **Li, Q., L. Sachs, Y. B. Shi, and A. P. Wolffe.** 1999. Modification of Chromatin Structure by the Thyroid Hormone Receptor. *Trends Endocrinol Metab* **10**:157-164.
118. **Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall.** 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**:265-275.

119. **Madeira, M. D., A. Cadete-Leite, J. P. Andrade, and M. M. Paula-Barbosa.** 1991. Effects of hypothyroidism upon the granular layer of the dentate gyrus in male and female adult rats: a morphometric study. *J Comp Neurol* **314**:171-186.
120. **Madeira, M. D., N. Sousa, M. T. Lima-Andrade, F. Calheiros, A. Cadete-Leite, and M. M. Paula-Barbosa.** 1992. Selective vulnerability of the hippocampal pyramidal neurons to hypothyroidism in male and female rats. *J Comp Neurol* **322**:501-518.
121. **Mai, W., M. F. Janier, N. Alliola, L. Quignodon, T. Chuzel, F. Flamant, and J. Samarut.** 2004. Thyroid hormone receptor alpha is a molecular switch of cardiac function between fetal and postnatal life. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:10332-10337.
122. **Maia, A. L., B. W. Kim, S. A. Huang, J. W. Harney, and P. R. Larsen.** 2005. Type 2 iodothyronine deiodinase is the major source of plasma T3 in euthyroid humans. *J Clin Invest* **115**:2524-2533.
123. **Malenka, R. C., J. A. Kauer, D. J. Perkel, M. D. Mauk, P. T. Kelly, R. A. Nicoll, and M. N. Waxham.** 1989. An essential role for postsynaptic calmodulin and protein kinase activity in long-term potentiation. *Nature* **340**:554-557.
124. **Maren, S.** 2001. Neurobiology of Pavlovian fear conditioning. *Annu Rev Neurosci* **24**:897-931.
125. **Maren, S.** 2005. Synaptic mechanisms of associative memory in the amygdala. *Neuron* **47**:783-786.
126. **Maren, S., and W. Holt.** 2000. The hippocampus and contextual memory retrieval in Pavlovian conditioning. *Behav Brain Res* **110**:97-108.
127. **Marsili, A., C. Aguayo-Mazzucato, T. Chen, A. Kumar, M. Chung, E. P. Lunsford, J. W. Harney, T. Van-Tran, E. Gianetti, W. Ramadan, C. Chou, S. Bonner-Weir, P. R. Larsen, J. E. Silva, and A. M. Zavacki.** 2011. Mice with a targeted deletion of the type 2 deiodinase are insulin resistant and susceptible to diet induced obesity. *PLoS One* **6**:e20832.
128. **Marsili, A., W. Ramadan, J. W. Harney, M. Mulcahey, L. A. Castroneves, I. M. Goemann, S. M. Wajner, S. A. Huang, A. M. Zavacki, A. L. Maia, M. Dentice, D. Salvatore, J. E. Silva, and P. R. Larsen.** 2010. Type 2 iodothyronine deiodinase levels are higher in slow-twitch than fast-twitch mouse skeletal muscle and are increased in hypothyroidism. *Endocrinology* **151**:5952-5960.
129. **Martin, S. J., P. D. Grimwood, and R. G. Morris.** 2000. Synaptic plasticity and memory: an evaluation of the hypothesis. *Annu Rev Neurosci* **23**:649-711.
130. **McCall, A. L.** 2004. Cerebral glucose metabolism in diabetes mellitus. *Eur J Pharmacol* **490**:147-158.
131. **McEwen, B. S., and L. P. Reagan.** 2004. Glucose transporter expression in the central nervous system: relationship to synaptic function. *Eur J Pharmacol* **490**:13-24.
132. **Mennemeier, M., R. D. Garner, and K. M. Heilman.** 1993. Memory, mood and measurement in hypothyroidism. *J Clin Exp Neuropsychol* **15**:822-831.
133. **Mentuccia, D., L. Proietti-Pannunzi, K. Tanner, V. Bacci, T. I. Pollin, E. T. Poehlman, A. R. Shuldiner, and F. S. Celi.** 2002. Association between a novel variant of the human type 2 deiodinase gene Thr92Ala and insulin resistance: evidence of interaction with the Trp64Arg variant of the beta-3-adrenergic receptor. *Diabetes* **51**:880-883.

134. **Mentuccia, D., M. J. Thomas, G. Coppotelli, L. J. Reinhart, B. D. Mitchell, A. R. Shuldiner, and F. S. Celi.** 2005. The Thr92Ala deiodinase type 2 (DIO2) variant is not associated with type 2 diabetes or indices of insulin resistance in the old order of Amish. *Thyroid* **15**:1223-1227.
135. **Meulenbelt, I., J. L. Min, S. Bos, N. Riyazi, J. J. Houwing-Duistermaat, H. J. van der Wijk, H. M. Kroon, M. Nakajima, S. Ikegawa, A. G. Uitterlinden, J. B. van Meurs, W. M. van der Deure, T. J. Visser, A. B. Seymour, N. Lakenberg, R. van der Breggen, D. Kremer, C. M. van Duijn, M. Kloppenburg, J. Loughlin, and P. E. Slagboom.** 2008. Identification of DIO2 as a new susceptibility locus for symptomatic osteoarthritis. *Hum Mol Genet* **17**:1867-1875.
136. **Montero-Pedrazuela, A., I. Fernández-Lamo, M. Alieva, I. Pereda-Pérez, C. Venero, and A. Guadaño-Ferraz.** 2011. Adult-onset hypothyroidism enhances fear memory and upregulates mineralocorticoid and glucocorticoid receptors in the amygdala. *PLoS One* **6**:e26582.
137. **Montero-Pedrazuela, A., C. Venero, R. Lavado-Autric, I. Fernández-Lamo, J. M. García-Verdugo, J. Bernal, and A. Guadaño-Ferraz.** 2006. Modulation of adult hippocampal neurogenesis by thyroid hormones: implications in depressive-like behavior. *Mol Psychiatry* **11**:361-371.
138. **Monzani, F., P. Del Guerra, N. Caraccio, C. A. Pruneti, E. Pucci, M. Luisi, and L. Baschieri.** 1993. Subclinical hypothyroidism: neurobehavioral features and beneficial effect of L-thyroxine treatment. *Clin Investig* **71**:367-371.
139. **Morreale de Escobar, G., R. Calvo, F. Escobar del Rey, and M. J. Obregón.** 1994. Thyroid hormones in tissues from fetal and adult rats. *Endocrinology* **134**:2410-2415.
140. **Morreale de Escobar, G., R. Pastor, M. J. Obregón, and F. Escobar del Rey.** 1985. Effects of maternal hypothyroidism on the weight and thyroid hormone content of rat embryonic tissues, before and after onset of fetal thyroid function. *Endocrinology* **117**:1890-1900.
141. **Morte, B., A. Ceballos, D. Díez, C. Grijota-Martínez, A. M. Dumitrescu, C. Di Cosmo, V. A. Galton, S. Refetoff, and J. Bernal.** 2010. Thyroid hormone-regulated mouse cerebral cortex genes are differentially dependent on the source of the hormone: a study in monocarboxylate transporter-8- and deiodinase-2-deficient mice. *Endocrinology* **151**:2381-2387.
142. **Morte, B., J. Manzano, T. Scanlan, B. Vennström, and J. Bernal.** 2002. Deletion of the thyroid hormone receptor alpha 1 prevents the structural alterations of the cerebellum induced by hypothyroidism. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:3985-3989.
143. **Ng, L., R. J. Goodyear, C. A. Woods, M. J. Schneider, E. Diamond, G. P. Richardson, M. W. Kelley, D. L. Germain, V. A. Galton, and D. Forrest.** 2004. Hearing loss and retarded cochlear development in mice lacking type 2 iodothyronine deiodinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:3474-3479.
144. **Nguyen, T. T., F. Chapa, and J. J. DiStefano, 3rd.** 1998. Direct measurement of the contributions of type I and type II 5'-deiodinases to whole body steady state 3,5,3'-triiodothyronine production from thyroxine in the rat. *Endocrinology* **139**:4626-4633.
145. **Nicoll, R. A., and B. E. Alger.** 1981. A simple chamber for recording from submerged brain slices. *J Neurosci Methods* **4**:153-156.

146. **Obregón, M. J., G. Morreale de Escobar, and F. Escobar del Rey.** 1978. Concentrations of triiodo-L-thyronine in the plasma and tissues of normal rats, as determined by radioimmunoassay: comparison with results obtained by an isotopic equilibrium technique. *Endocrinology* **103**:2145-2153.
147. **Obregón, M. J., C. Ruiz de Oña, R. Calvo, F. Escobar del Rey, and G. Morreale de Escobar.** 1991. Outer ring iodothyronine deiodinases and thyroid hormone economy: responses to iodine deficiency in the rat fetus and neonate. *Endocrinology* **129**:2663-2673.
148. **Ogawa, N., Y. Hirose, S. Ohara, T. Ono, and Y. Watanabe.** 1985. A simple quantitative bradykinesia test in MPTP-treated mice. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* **50**:435-441.
149. **Oliet, S. H., R. C. Malenka, and R. A. Nicoll.** 1997. Two distinct forms of long-term depression coexist in CA1 hippocampal pyramidal cells. *Neuron* **18**:969-982.
150. **Osterweil, D., K. Syndulko, S. N. Cohen, P. D. Pettler-Jennings, J. M. Hershman, J. L. Cummings, W. W. Tourtellotte, and D. H. Solomon.** 1992. Cognitive function in non-demented older adults with hypothyroidism. *J Am Geriatr Soc* **40**:325-335.
151. **Pallier, P. N., C. J. Drew, and A. J. Morton.** 2009. The detection and measurement of locomotor deficits in a transgenic mouse model of Huntington's disease are task- and protocol-dependent: influence of non-motor factors on locomotor function. *Brain Res Bull* **78**:347-355.
152. **Panicker, V., P. Saravanan, B. Vaidya, J. Evans, A. T. Hattersley, T. M. Frayling, and C. M. Dayan.** 2009. Common variation in the DIO2 gene predicts baseline psychological well-being and response to combination thyroxine plus triiodothyronine therapy in hypothyroid patients. *J Clin Endocrinol Metab* **94**:1623-1629.
153. **Pare, D., G. J. Quirk, and J. E. Ledoux.** 2004. New vistas on amygdala networks in conditioned fear. *J Neurophysiol* **92**:1-9.
154. **Peeters, R. P., A. W. van den Beld, H. Attalki, H. Toor, Y. B. de Rijke, G. G. Kuiper, S. W. Lamberts, J. A. Janssen, A. G. Uitterlinden, and T. J. Visser.** 2005. A new polymorphism in the type II deiodinase gene is associated with circulating thyroid hormone parameters. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **289**:E75-81.
155. **Peeters, R. P., W. M. van der Deure, A. W. van den Beld, H. van Toor, S. W. Lamberts, J. A. Janssen, A. G. Uitterlinden, and T. J. Visser.** 2007. The Asp727Glu polymorphism in the TSH receptor is associated with insulin resistance in healthy elderly men. *Clin Endocrinol (Oxf)* **66**:808-815.
156. **Phillips, R. G., and J. E. LeDoux.** 1992. Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. *Behav Neurosci* **106**:274-285.
157. **Pitkanen, A., M. Pikkarainen, N. Nurminen, and A. Ylinen.** 2000. Reciprocal connections between the amygdala and the hippocampal formation, perirhinal cortex, and postrhinal cortex in rat. A review. *Ann N Y Acad Sci* **911**:369-391.
158. **Plateroti, M., K. Gauthier, C. Domon-Dell, J. N. Freund, J. Samarut, and O. Chassande.** 2001. Functional interference between thyroid hormone receptor alpha (TRalpha) and natural truncated TRDeltaalpha isoforms in the control of intestine development. *Mol Cell Biol* **21**:4761-4772.
159. **Puymirat, J., M. Mieke, R. Marchand, L. Sarlieve, and J. H. Dussault.** 1991. Immunocytochemical localization of thyroid hormone receptors in the adult rat brain. *Thyroid* **1**:173-184.

160. **Rami, A., A. J. Patel, and A. Rabie.** 1986. Thyroid hormone and development of the rat hippocampus: morphological alterations in granule and pyramidal cells. *Neuroscience* **19**:1217-1226.
161. **Rami, A., A. Rabie, and A. J. Patel.** 1986. Thyroid hormone and development of the rat hippocampus: cell acquisition in the dentate gyrus. *Neuroscience* **19**:1207-1216.
162. **Roberts, C. G., and P. W. Ladenson.** 2004. Hypothyroidism. *Lancet* **363**:793-803.
163. **Rodrigues, S. M., J. E. LeDoux, and R. M. Sapolsky.** 2009. The influence of stress hormones on fear circuitry. *Annu Rev Neurosci* **32**:289-313.
164. **Rodrigues, S. M., G. E. Schafe, and J. E. LeDoux.** 2004. Molecular mechanisms underlying emotional learning and memory in the lateral amygdala. *Neuron* **44**:75-91.
165. **Roosendaal, B., B. S. McEwen, and S. Chattarji.** 2009. Stress, memory and the amygdala. *Nat Rev Neurosci* **10**:423-433.
166. **Rosene, M. L., G. Wittmann, R. Arrojo e Drigo, P. S. Singru, R. M. Lechan, and A. C. Bianco.** 2010. Inhibition of the type 2 iodothyronine deiodinase underlies the elevated plasma TSH associated with amiodarone treatment. *Endocrinology* **151**:5961-5970.
167. **Rovet, J. F.** 2002. Congenital hypothyroidism: an analysis of persisting deficits and associated factors. *Child Neuropsychol* **8**:150-162.
168. **Rovet, J. F.** 1999. Long-term neuropsychological sequelae of early-treated congenital hypothyroidism: effects in adolescence. *Acta Paediatr Suppl* **88**:88-95.
169. **Ruiz de Oña, C., G. Morreale de Escobar, R. Calvo, F. Escobar del Rey, and M. J. Obregón.** 1991. Thyroid hormones and 5'-deiodinase in the rat fetus late in gestation: effects of maternal hypothyroidism. *Endocrinology* **128**:422-432.
170. **Ruiz de Oña, C., M. J. Obregón, F. Escobar del Rey, and G. Morreale de Escobar.** 1988. Developmental changes in rat brain 5'-deiodinase and thyroid hormones during the fetal period: the effects of fetal hypothyroidism and maternal thyroid hormones. *Pediatr Res* **24**:588-594.
171. **Sachs, L. M., S. Damjanovski, P. L. Jones, Q. Li, T. Amano, S. Ueda, Y. B. Shi, and A. Ishizuya-Oka.** 2000. Dual functions of thyroid hormone receptors during *Xenopus* development. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* **126**:199-211.
172. **Sadow, P. M., O. Chassande, E. K. Koo, K. Gauthier, J. Samarut, J. Xu, B. W. O'Malley, and R. E. Weiss.** 2003. Regulation of expression of thyroid hormone receptor isoforms and coactivators in liver and heart by thyroid hormone. *Mol Cell Endocrinol* **203**:65-75.
173. **Sajikumar, S., S. Navakkode, and J. U. Frey.** 2005. Protein synthesis-dependent long-term functional plasticity: methods and techniques. *Curr Opin Neurobiol* **15**:607-613.
174. **Saltiel, A. R., and C. R. Kahn.** 2001. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* **414**:799-806.
175. **Samuels, M. H., K. G. Schuff, N. E. Carlson, P. Carello, and J. S. Janowsky.** 2007. Health status, mood, and cognition in experimentally induced subclinical hypothyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* **92**:2545-2551.
176. **Sanai, N., A. D. Tramontin, A. Quiñones-Hinojosa, N. M. Barbaro, N. Gupta, S. Kunwar, M. T. Lawton, M. W. McDermott, A. T. Parsa, J. Manuel-García Verdugo, M. S. Berger,**

- and A. Alvarez-Buylla.** 2004. Unique astrocyte ribbon in adult human brain contains neural stem cells but lacks chain migration. *Nature* **427**:740-744.
177. **Sango, K., M. P. McDonald, J. N. Crawley, M. L. Mack, C. J. Tiff, E. Skop, C. M. Starr, A. Hoffmann, K. Sandhoff, K. Suzuki, and R. L. Proia.** 1996. Mice lacking both subunits of lysosomal beta-hexosaminidase display gangliosidosis and mucopolysaccharidosis. *Nat Genet* **14**:348-352.
178. **Sap, J., A. Muñoz, J. Schmitt, H. Stunnenberg, and B. Vennström.** 1989. Repression of transcription mediated at a thyroid hormone response element by the v-erb-A oncogene product. *Nature* **340**:242-244.
179. **Saravanan, P., W. F. Chau, N. Roberts, K. Vedhara, R. Greenwood, and C. M. Dayan.** 2002. Psychological well-being in patients on 'adequate' doses of l-thyroxine: results of a large, controlled community-based questionnaire study. *Clin Endocrinol (Oxf)* **57**:577-585.
180. **Schneider, M. J., S. N. Fiering, S. E. Pallud, A. F. Parlow, D. L. St Germain, and V. A. Galton.** 2001. Targeted disruption of the type 2 selenodeiodinase gene (DIO2) results in a phenotype of pituitary resistance to T4. *Mol Endocrinol* **15**:2137-2148.
181. **Shors, T. J., D. A. Townsend, M. Zhao, Y. Kozorovitskiy, and E. Gould.** 2002. Neurogenesis may relate to some but not all types of hippocampal-dependent learning. *Hippocampus* **12**:578-584.
182. **Silva, J. E., and P. Matthews.** 1984. Thyroid hormone metabolism and the source of plasma triiodothyronine in 2-week-old rats: effects of thyroid status. *Endocrinology* **114**:2394-2405.
183. **Simonides, W. S., and C. van Hardeveld.** 2008. Thyroid hormone as a determinant of metabolic and contractile phenotype of skeletal muscle. *Thyroid* **18**:205-216.
184. **Surks, M. I., and J. H. Oppenheimer.** 1977. Concentration of L-thyroxine and L-triiodothyronine specifically bound to nuclear receptors in rat liver and kidney. Quantitative evidence favoring a major role of T3 in thyroid hormone action. *The Journal of clinical investigation* **60**:555-562.
185. **Swanson, L. W.** 2003. The amygdala and its place in the cerebral hemisphere. *Ann N Y Acad Sci* **985**:174-184.
186. **Thomson, A. M.** 2000. Facilitation, augmentation and potentiation at central synapses. *Trends Neurosci* **23**:305-312.
187. **Torlontano, M., C. Durante, I. Torrente, U. Crocetti, G. Augello, G. Ronga, T. Montesano, L. Travascio, A. Verrienti, R. Bruno, S. Santini, P. D'Arcangelo, B. Dallapiccola, S. Filetti, and V. Trischitta.** 2008. Type 2 deiodinase polymorphism (threonine 92 alanine) predicts L-thyroxine dose to achieve target thyrotropin levels in thyroidectomized patients. *J Clin Endocrinol Metab* **93**:910-913.
188. **van der Deure, W. M., R. P. Peeters, A. G. Uitterlinden, A. Hofman, M. M. Breteler, J. Witteman, and T. J. Visser.** 2009. Impact of thyroid function and polymorphisms in the type 2 deiodinase on blood pressure: the Rotterdam Study and the Rotterdam Scan Study. *Clin Endocrinol (Oxf)* **71**:137-144.
189. **Vara, H., B. Martínez, A. Santos, and A. Colino.** 2002. Thyroid hormone regulates neurotransmitter release in neonatal rat hippocampus. *Neuroscience* **110**:19-28.

190. **Venero, C., A. Guadaño-Ferraz, A. I. Herrero, K. Nordström, J. Manzano, G. M. de Escobar, J. Bernal, and B. Vennström.** 2005. Anxiety, memory impairment, and locomotor dysfunction caused by a mutant thyroid hormone receptor alpha1 can be ameliorated by T3 treatment. *Genes Dev* **19**:2152-2163.
191. **Visser, W. E., K. A. Heemstra, S. M. Swagemakers, Z. Ozgur, E. P. Corssmit, J. Burggraaf, W. F. van Ijcken, P. J. van der Spek, J. W. Smit, and T. J. Visser.** 2009. Physiological thyroid hormone levels regulate numerous skeletal muscle transcripts. *J Clin Endocrinol Metab* **94**:3487-3496.
192. **Wang, D., X. Xia, Y. Liu, A. Oetting, R. L. Walker, Y. Zhu, P. Meltzer, P. A. Cole, Y. B. Shi, and P. M. Yen.** 2009. Negative regulation of TSHalpha target gene by thyroid hormone involves histone acetylation and corepressor complex dissociation. *Mol Endocrinol* **23**:600-609.
193. **Wang, Y. Y., S. Morimoto, C. K. Du, Q. W. Lu, D. Y. Zhan, T. Tsutsumi, T. Ide, Y. Miwa, F. Takahashi-Yanaga, and T. Sasaguri.** 2010. Up-regulation of type 2 iodothyronine deiodinase in dilated cardiomyopathy. *Cardiovasc Res* **87**:636-646.
194. **Weeke, J., and H. Orskov.** 1973. Synthesis of 125I monolabelled 3, 5, 3'-triiodothyronine and thyroxine of maximum specific activity for radioimmunoassay. *Scand J Clin Lab Invest* **32**:357-360.
195. **Weeke, J., and H. Orskov.** 1975. Ultrasensitive radioimmunoassay for direct determination of free triiodothyronine concentration in serum. *Scand J Clin Lab Invest* **35**:237-244.
196. **White, M. F.** 2003. Insulin signaling in health and disease. *Science* **302**:1710-1711.
197. **Whybrow, P. C.** 1996. Behavioral and psychiatric manifestations of hypothyroidism, p. 866-870. *In* L. Braverman and R. Utiger (ed.), *Werner and Ingbar's "The thyroid: a fundamental and clinical text"*, 7th ed. Lippincott-Ravm, Philadelphia.
198. **Wilensky, A. E., G. E. Schafe, M. P. Kristensen, and J. E. LeDoux.** 2006. Rethinking the fear circuit: the central nucleus of the amygdala is required for the acquisition, consolidation, and expression of Pavlovian fear conditioning. *J Neurosci* **26**:12387-12396.
199. **Williams, A. J., H. Robson, M. H. Kester, J. P. van Leeuwen, S. M. Shalet, T. J. Visser, and G. R. Williams.** 2008. Iodothyronine deiodinase enzyme activities in bone. *Bone* **43**:126-134.
200. **Wrutniak-Cabello, C., F. Casas, and G. Cabello.** 2001. Thyroid hormone action in mitochondria. *J Mol Endocrinol* **26**:67-77.
201. **Yang, Y. L., P. K. Chao, and K. T. Lu.** 2006. Systemic and intra-amygdala administration of glucocorticoid agonist and antagonist modulate extinction of conditioned fear. *Neuropsychopharmacology* **31**:912-924.
202. **Yen, P. M.** 2001. Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. *Physiol Rev* **81**:1097-1142.
203. **Yorns, W. R., Jr., J. H. Blaise, and J. D. Bronzino.** 2004. Frequency-dependent changes in the paired-pulse index in the hippocampus of the freely moving adult male rat. *Exp Neurol* **186**:104-108.
204. **Zucker, R. S., and W. G. Regehr.** 2002. Short-term synaptic plasticity. *Annu Rev Physiol* **64**:355-405.