

Università degli Studi di Napoli “Federico II”



DOTTORATO DI RICERCA in Biologia applicata XXV ciclo Curriculum Fisiologia

Effetto di tireomimetici selettivi e di tironamine sul metabolismo energetico e sul danno ossidativo di tessuti di ratto.

Coordinatore

Ch.mo Prof. Ezio Ricca

Tutore

Ch.ma Dott.ssa Paola Venditti

Candidata

Dott.ssa Gaetana Napolitano

Anno Accademico 2011/2012

Indice

Premessa pag.5

Introduzione pag.7

- Tiroide e sintesi degli ormoni tiroidei pag.7
- Funzioni dell'ormone tiroideo pag.9
 - Effetti sull'osso
 - Effetti sul cuore
 - Effetti sul tessuto adiposo
 - Effetti sul tessuto epatico
 - Ormone tiroideo ed ipofisi
 - Effetto sul cervello
- Recettori per l'ormone tiroideo pag.14
- Azioni non genomiche dell'ormone tiroideo pag.16
- Azioni genomiche e non genomiche dell'ormone tiroideo e respirazione mitocondriale pag.17
- Effetti benefici e deleteri dell'ormone tiroideo pag.20
- Sviluppo di analoghi dell'ormone tiroideo per l'isoforma recettoriale di tipo β pag.21
- Scoperta dell'agonista β -selettivo GC-1 pag.21
- Effetti del GC-1 pag.24
 - Effetti cardiaci
 - Effetti epatici
 - GC-1 e gli inibitori delle HMG-CoA reduttasi
 - Interazioni con l'ormone tireotropo TSH
 - Effetti sul tessuto osseo e sul tessuto muscolare scheletrico
 - Altri effetti
- Ormoni tiroidei e mitocondri pag.28
- Ormoni tiroidei e stress ossidativo pag.29
- Conseguenze funzionali dello stress ossidativo indotto dall'ormone tiroideo pag.31
- Tironamine pag.33
 - Struttura
 - Distribuzione tissutale e concentrazioni delle tironamine
- Effetti sistemici e locali delle tironamine pag.37
 - Riduzione del metabolismo da parte di 3-T₁AM
 - Ipotermia

- Effetto cronotropo negativo di T₀AM
- Iperglicemia
- Riduzione del quoziente respiratorio
- Chetonuria e riduzione della massa grassa
- Effetti centrali della somministrazione di 3-T₁AM e T₀AM
- Inibizione dei trasportatori delle monoamine
- Recettori delle tironamine pag.43
- Biosintesi, metabolismo e trasporto delle tironamine pag.44

Scopo della tesi pag.46

Materiali e metodi pag.48

- Materiali pag.48
- Animali pag.48
- Preparazione del tessuto pag.49
- Preparazione delle frazioni mitocondriali pag.49
- Consumo di ossigeno pag.50
- Attività dei complessi della catena respiratoria pag.51
 - Complesso I
 - Complesso II
 - Complesso III
 - Complesso IV
- Rilascio mitocondriale di H₂O₂ pag.55
- Danno ossidativo alle proteine pag.57
- Perossidazione lipidica pag.58
- Determinazione dell'espressione delle proteine NRF-1, NRF-2 e PGC-1 pag.59

Analisi statistica pag.61

Risultati pag.62

- Effetto dei trattamenti sui parametri corporei condizionati dallo stato tiroideo pag.62
- Attività della citocromo ossidasi tissutale pag.63
- Consumo di ossigeno tissutale pag.64
- Danno ossidativo tissutale pag.67
- Misura del consumo di ossigeno su sospensioni mitocondriali epatiche pag.68
- Attività dei complessi della catena respiratoria pag.69

- Attività della COX dell'omogenato e contenuto di proteine mitocondriali pag.70
- Rilascio mitocondriale di H₂O₂ pag.71
- Effetto di inibitori sul rilascio di H₂O₂ pag.72
- Danno ossidativo in preparati mitocondriali epatici pag.74
- Espressione delle proteine pag.75
- Consumo di ossigeno su sospensioni mitocondriali incubate con T₁AM e T₀AM pag.77
- Rilascio di H₂O₂ su sospensioni mitocondriali isolate da ratti ipotiroidei incubate con T₁AM e T₀AM misurato in presenza ed in assenza di inibitori pag.79
- Rilascio di H₂O₂ prodotta dalla deaminazione ossidativa di T₁AM e T₀AM catalizzata dalla MAO pag.82
- Effetto dell'inibitore della MAO, la pargilina, sul rilascio di H₂O₂ pag.83
- Attività dei complessi della catena respiratoria di mitocondri incubati con tironamine pag.86

Discussione pag.87

Bibliografia pag.97

Premessa

E' noto che gli ormoni tiroidei, 3,5,3-triiodotironina (T_3) e tiroxina (T_4), influenzano numerosi processi fisiologici, quali la metamorfosi negli anfibi, lo sviluppo del sistema nervoso nei vertebrati, la crescita cellulare ed il metabolismo nei mammiferi (Utiger LEB et Utiger RD, 1991; Greenspan FS, 1997). La maggior parte di tali azioni sono mediate dal legame a recettori (recettori dell'ormone tiroideo o TR) che appartengono alla superfamiglia dei recettori nucleari ed agiscono come fattori di trascrizione ligando-dipendenti (Bassett JH et al., 2003). Recentemente sono stati sintetizzati analoghi di T_3 caratterizzati dall'assenza di atomi di alogeno nella molecola e dotati di selettività per TR-beta. Il primo composto sintetizzato, denominato GC-1, ha dimostrato in studi di legame una selettività per TR-beta 5-10 volte superiore al T_3 (Chiellini G et al., 1998). Somministrato ad animali di laboratorio, GC-1 conduce ad una riduzione dei livelli plasmatici di colesterolo confrontabile a quella prodotta dalla T_3 a concentrazioni che non modificano significativamente la funzione cardiaca (Trost SU et al., 2000; Grover GJ et al., 2004). Questa osservazione suggerisce che tireomimetici selettivi possano essere utilizzati in pazienti eutiroidei affetti da obesità o dislipidemie, per i quali esiste una indicazione teorica a sfruttare gli effetti di T_3 sul metabolismo lipidico (Taylor AH et al., 1997), ma ai quali l'ormone non può essere somministrato a causa dell'indice terapeutico non accettabile.

E' noto che nei vertebrati T_3 e T_4 , aumentano il metabolismo di carboidrati, lipidi e proteine ed accelerano la velocità metabolica basale aumentando le capacità respiratorie dei tessuti bersaglio. Come effetto collaterale di queste modificazioni si instaura nei tessuti una condizione di stress ossidativo legata all'aumento della produzione mitocondriale di specie reattive dell'ossigeno ed alla diminuzione della protezione antiossidante. Finora non era ancora stato studiato l'effetto dell'attivazione preferenziale di una isoforma recettoriale per l'ormone tiroideo piuttosto che un'altra sulle capacità aerobiche di tessuti bersaglio della T_3 e poiché GC-1 è in grado di indurre solo alcuni effetti caratteristici dell'ormone tiroideo a causa della sua capacità di discriminare tra i recettori nucleari α e β , sembra interessante indagare l'effetto della attivazione dell'isoforma β sulle capacità aerobiche e sulla produzione di ROS da parte di tessuti isolati da ratti resi ipotiroidei e successivamente sottoposti a trattamento con l'agonista.

Dati presenti in letteratura riportano anche che derivati decarbossilati degli ormoni tiroidei, le tironamine, presenti nel sangue ed in altri tessuti di uomo, ratto, topo e porcellino d'india, tra cui T_1AM , sono in grado di evocare in vivo rapide risposte (bradicardia ed ipotermia) di segno opposto a quelle indotte dalla somministrazione della T_3 . Le iodotironamine differiscono dagli ormoni tiroidei per l'assenza del gruppo carbossilico ed eventualmente di uno o più atomi di iodio. Il

dosaggio effettuato mediante spettrometria di massa accoppiata ad HPLC ha rivelato la presenza di T₁AM nel sangue ed in omogenati tissutali, mostrando che si tratta di un metabolita endogeno. La somministrazione di T₁AM esogena determina in generale risposte opposte a quelle prodotte, su scala temporale più lunga, dagli ormoni tiroidei. Nel topo l'iniezione intraperitoneale di T₁AM causa una riduzione transitoria della temperatura corporea (Scanlan TS et al., 2004), mentre nel cuore isolato di ratto determina una riduzione della portata cardiaca e della frequenza cardiaca (Scanlan TS et al., 2004; Chiellini G et al., 2007).

Si pensa che, come per le diiodotironine, i mitocondri rappresentino il principale bersaglio dei derivati dell'ormone tiroideo. Infatti, è noto che la membrana mitocondriale interna presenta dei siti di legame ad alta affinità per la 3,5-diiodotironina (3,5-T₂) e per la 3,3'-diiodotironina (3,3'-T₂) (Goglia et al., 1994) e che la somministrazione di tali sostanze a ratti ipotiroidei stimola la respirazione mitocondriale di fegato (Lanni et al., 1993). Tra gli effetti mitocondriali indotti dalla 3,5-T₂ e dalla 3,3'-T₂ vanno annoverati anche la termogenesi tiroidea (Cioffi F et al., 2010; Videla LA, 2010) e studi recenti hanno anche proposto meccanismi alternativi quali l'interferenza nella omeostasi del calcio (Cannon B et Nedergard J, 2010).

Finora non era ancora stato studiato l'effetto in vitro delle tironamine sul consumo di ossigeno e sulla produzione di specie reattive dell'ossigeno che è largamente dipendente dalla velocità del flusso di elettroni attraverso la catena respiratoria.

Alla luce di quanto detto finora, durante il mio dottorato ho approfondito gli studi sull'ormone tiroideo confrontando gli effetti di tireomimetici e di derivati della tiroxina sulla capacità respiratoria e l'estensione del danno ossidativo di tessuti di ratto e studiando il ruolo svolto dai mitocondri nelle modificazioni indotte a livello tissutale dalla T₃ e dai suoi mimetici.

Introduzione

Tiroide e sintesi degli ormoni tiroidei

L'ormone tiroideo è una importante molecola regolatrice in grado di coordinare una varietà di eventi che vanno dallo sviluppo embrionale al mantenimento dell'omeostasi negli adulti. Come una classica molecola di natura ormonale, essa viene prodotta in una ghiandola, la ghiandola tiroidea, e viene trasportata per via endocrina attraverso il sistema circolatorio verso i siti di azione dei tessuti bersaglio (Greenspan FS, 1997). L'ormone tiroideo è inizialmente sintetizzato nella ghiandola tiroidea come tiroxina (T₄) (**Figura 1**) e dopo la secrezione lega una proteina carrier, la tireoglobulina (TBG), grazie alla quale viene veicolato ai tessuti bersaglio. Qui, la T₄ viene captata dalle cellule e deiodinata nella forma attiva 3,5,3'-triiodotironina (T₃) (**Figura 1**). T₃ entra a questo punto nei nuclei delle cellule dove esplica le sue azioni tramite il legame a recettori nucleari che gli permettono di modulare la trascrizione di specifici geni.

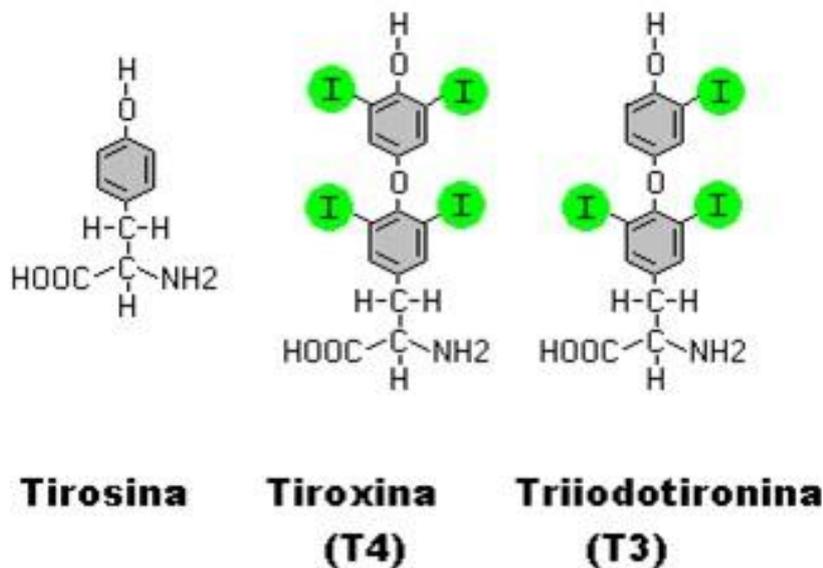


Figura 1: Ormoni tiroidei

Il livello degli ormoni tiroidei in circolo è regolato mediante un circuito a feedback negativo grazie alla presenza di specifici sensori localizzati a livello dell'asse ipotalamo-ipofisi che regolano il rilascio dell'ormone tireotropo (TSH) da parte della ghiandola pituitaria in risposta ad un

abbassamento dei livelli circolanti di ormone tiroideo (**Figura 2**). Una volta secreto, il TSH si lega a specifici recettori localizzati sulla superficie cellulare dei tireociti della ghiandola tiroidea e segnala a quest'ultima un incremento della produzione e della secrezione della T_4 .

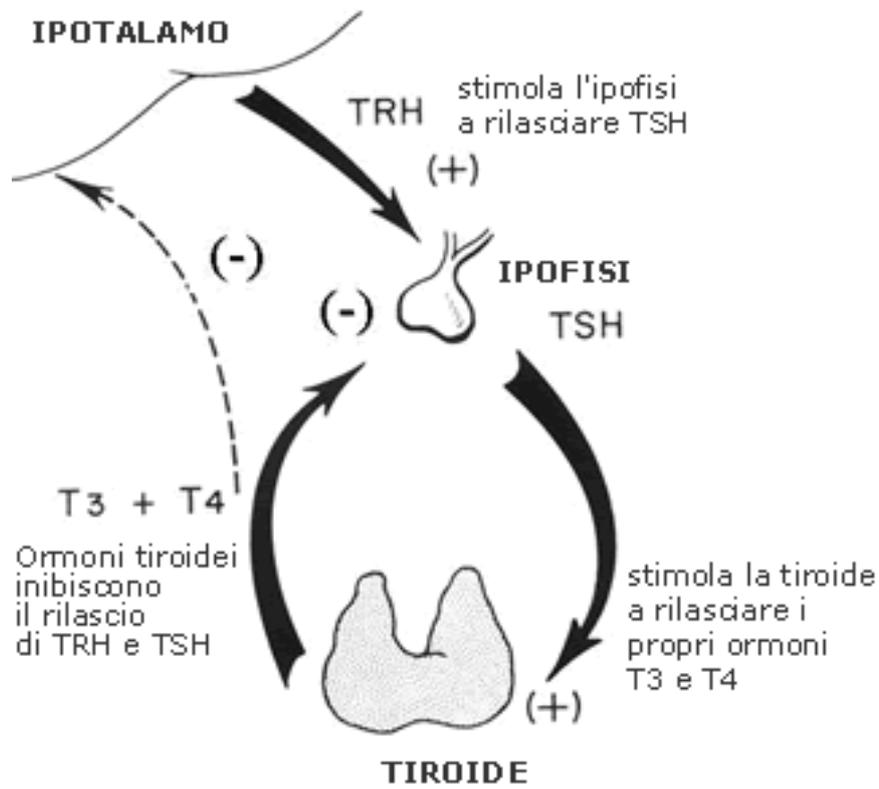


Figura 2: Regolazione del rilascio degli ormoni tiroidei

Funzioni dell'ormone tiroideo

L'ormone tiroideo media una notevole varietà di funzioni regolatorie che influenzano la crescita, lo sviluppo e l'omeostasi metabolica (Lazar MA et al.,1993). Infatti, esso rappresenta uno dei principali regolatori della velocità metabolica basale ed esplica questo effetto attraverso il controllo del consumo di ossigeno nella maggior parte dei tessuti (Silva JE, 1995). Nel fegato, l'ormone tiroideo controlla le riserve lipidiche ed il metabolismo dei grassi (Engelken Sf et al.,1981; Hansson P et al.,1983; Valdermarsson S et al., 1983; Scarabottolo L et al., 1986). Nel cuore regola le funzioni cardiache, in particolare la frequenza cardiaca (Klein I, 1990). Nel tessuto adiposo bruno, l'ormone tiroideo controlla la termogenesi adattativa o capacità di produrre calore a riposo (Lowell BB et al., 2000). Durante lo sviluppo, invece, esso è essenziale per la crescita muscolare e scheletrica e per lo sviluppo del sistema nervoso (Munoz A et al., 1997).

Effetti sull'osso

L'ormone tiroideo svolge un ruolo critico per la crescita e lo sviluppo dell'osso. Studi biochimici hanno dimostrato che esso può influenzare l'espressione di diversi markers sierici che riflettono modificazioni dei processi di formazione e riassorbimento dell'osso (Allain TJ et McGregor AM, 1993; Osekilde L et al., 1990; Ross DS, 1994). Infatti, l'ormone tiroideo incrementa negli osteoblasti i livelli di fosfatasi alcalina ed osteocalcina. Inoltre, in pazienti affetti da ipertiroidismo, una patologia caratterizzata da elevati livelli circolanti di ormone tiroideo, risultano incrementati anche i livelli di idrossiprolina urinaria e piridinio urinario. Queste osservazioni suggeriscono che l'ormone tiroideo stimola sia gli osteoblasti che gli osteoclasti. A conferma di ciò, è noto che i pazienti ipertiroidei presentano una maggiore calcificazione e formazione dell'osso associata ad un aumentato riassorbimento osseo (Meunier PJ et al., 1972; Mosekilde et al.,1990). Inoltre, l'intervallo che intercorre tra la formazione e la successiva mineralizzazione dell'osteoido è molto breve ed è associato ad una riduzione dello spessore delle trabecole dell'osso. Tale effetto si accompagna anche ad un aumento della porosità e ad una diminuzione dello spessore della regione corticale dell'osso con conseguente osteoporosi e fratture ossee (Ross DS, 1994; Greenspan SL et Greenspan FS, 1999). E' noto anche che l'ormone tiroideo è in grado di inibire la crescita dei condrociti e di stimolare il loro differenziamento in coltura (Ishikawa Y et al., 1998). L'ormone tiroideo può esplicare le sue azioni a livello osseo sia attraverso la stimolazione del fattore di crescita insulino-simile di tipo I (IGF-1) sia grazie ad un effetto diretto sui geni bersaglio. Mundy et

al. (1976) hanno dimostrato che la T₃ ha un effetto diretto sul riassorbimento osseo su organi in colltura, suggerendo che il secondo meccanismo è altamente probabile in vivo. Sebbene l'attività degli osteoblasti e degli osteoclasti sia incrementata dall'ormone tiroideo, attualmente si sa poco riguardo la trascrizione dei geni bersaglio in queste cellule. Esistono numerose proteine osteoblasti che sono stimulate dall'ormone tiroideo, appartenenti soprattutto alla matrice, tra cui la fosfatasi alcalina, l'osteocalcina ed il collagene (Klaushofer K et al., 1995; Allain TJ et McGregor AM, 1993). Tuttavia, non è noto se l'ormone tiroideo possa agire direttamente nella regolazione della trascrizione di questi geni bersaglio.

Effetti sul cuore

L'ormone tiroideo provoca un abbassamento della resistenza vascolare sistemica, un aumento del volume ematico ed esercita effetti inotropi e cronotropi positivi (Klein I et Ojamaa K, 1998). La combinazione degli effetti esercitati sia a livello cardiaco che a livello della circolazione portano ad un aumento della gittata cardiaca. Infatti, è noto che pazienti affetti da ipotiroidismo, condizione patologica caratterizzata da bassi livelli circolanti di ormone tiroideo, presentano una gittata cardiaca bassa, una diminuzione del volume ematico ed un aumento della resistenza periferica, mentre in pazienti ipertiroidi si assiste ad un aumento dell'output circolatorio (Klein et al, 1998). Questi cambiamenti nelle funzioni cardiache dipendono dalla regolazione diretta, da parte dell'ormone tiroideo, della trascrizione di geni localizzati all'interno del tessuto cardiaco e da effetti indiretti dovuti a cambiamenti emodinamici. E' riportato in letteratura, infatti, che l'ormone tiroideo aumenta nel complesso la sintesi delle proteine cardiache (Dillmann WH, 1990; Dillmann WH, 1996). Inoltre, esso regola la trascrizione di geni che codificano per proteine coinvolte in ruoli critici della funzionalità cardiaca, come quelli codificanti per la catena pesante della miosina (MHC) (Dillmann WH, 1990). Diverse evidenze sperimentali indicano che l'ormone tiroideo svolge un ruolo fondamentale anche sulla velocità del rilassamento cardiaco che si realizza durante la diastole. Tale velocità è legata alla concentrazione intracellulare di calcio ed alla attività della Ca²⁺-ATPasi del reticolo sarcoplasmatico SERCA2. L'ATPasi è una pompa ionica in grado di rimuovere il calcio dal citosol e trasferirlo nel reticolo sarcoplasmatico durante la diastole. Questa diminuzione della concentrazione di calcio intracelulare generata durante la sistole, porta poi al rilassamento muscolare. E' riportato che ratti ipotiroidi presentano bassi livelli di espressione di mRNA per SERCA2 che, invece, aumentano durante la stimolazione con l'ormone tiroideo (Rohrer DK et Dillmann WH, 1988). Queste osservazioni suggeriscono che l'induzione della ATPasi possa spiegare l'aumento dell'output cardiaco indotto dall'ormone tiroideo attraverso un più rapido

rilassamento muscolare (effetto lusitropo). T_3 è anche in grado di regolare l'espressione di diversi canali ionici quali i canali per il potassio K_v , Na^+K^+ ATPasi e i canali attivati dai nucleotidi ciclici attivati da iperpolarizzazioni (Ojamaa K et al., 1999; Pachucki J et al., 1999; Yalcin Y et al., 1999). Inoltre, l'ormone tiroideo può regolare il numero dei recettori β -adrenergici cardiaci e con ciò aumentare la sensibilità alle catecolamine (Williams LT et al., 1977).

Effetti sul tessuto adiposo

L'ormone tiroideo gioca ruoli importanti nello sviluppo e nelle funzioni del tessuto adiposo bianco e bruno (Ailhaud G et al., 1992). E' noto, infatti, che esso può indurre in giovani ratti il differenziamento di preadipociti in adipociti (Flores-Delgado G et al., 1987; Grimaldi P et al., 1982). In questi studi, T_3 non solo induce un accumulo dei lipidi intracellulari e vari markers specifici delle cellule adipose, come l'enzima malico e la glicerofosfato deidrogenasi, ma stimola anche la proliferazione delle cellule adipose e la formazione di cluster cellulari. Inoltre, è riportato che in adipociti in via di differenziamento, l'ormone tiroideo induce anche la attività di enzimi coinvolti nel pathway biochimico della lipogenesi, come l'ATP-citrato liasi e l'enzima malico, suggerendo che T_3 promuova anche l'acquisizione delle funzioni differenziate negli adipociti del tessuto bianco (Blennemann B et al., 1995; Gharbi-Chihi J et al., 1991). Studi condotti su ratti adulti mostrano che T_3 svolge un ruolo importante per la regolazione del consumo di ossigeno basale, la lipogenesi e la lipolisi (Oppernheimer JH et al., 1991; Oppernheimer JH et al., 1987). Altri studi riportano anche che l'ormone tiroideo è coinvolto nello sviluppo del tessuto adiposo bruno (Tuca A et al., 1993), il tessuto che maggiormente contribuisce alla termogenesi facoltativa nei roditori. La termogenesi facoltativa si realizza in risposta ad una esposizione a basse temperature ambientali e dipende sia dalla stimolazione tiroidea che β -adrenergica delle proteine disaccoppianti mitocondriali, le UCPs, le quali disaccoppiando la fosforilazione ossidativa inducono una dissipazione dell'energia sotto forma di calore (Himms-Hagen J, 1989; Glick Z et al., 1985; Rubio R et al., 1995). Esistono tre isoforme delle UCPs, UCP1, UCP2 e UCP3, tutte e tre stimulate dalla T_3 (Larkin S et al., 1997). L'mRNA della proteina UCP3 è stimolato dall'ormone tiroideo sia nel BAT che nel tessuto muscolare di topo (Jekabsons MB et al., 1999; Gong DW et al., 1997). Non sono però noti se tali effetti sono direttamente mediati dall'ormone tiroideo oppure da segnali a valle come acidi grassi liberi liberati dal processo di lipolisi.

Effetti sul tessuto epatico

L'ormone tiroideo svolge azioni multiple sulla funzionalità epatica inclusa la stimolazione di enzimi che regolano la lipogenesi, la lipolisi e processi ossidativi (Oppernheimer JH al., 1987; Oppernheimer JH et al., 1995). Tra gli enzimi lipogenici regolati dall'ormone tiroideo troviamo l'enzima malico e la glucosio-6-fosfatodeidrogenasi. E' anche noto che la condizione patologica dell'ipotiroidismo è associata ad ipercolesterolemia dovuta ad elevati livelli circolanti di colesterolo legato a lipoproteine a bassa densità (LDL) (Brent GA, 1994). Il principale meccanismo coinvolto nella mediazione di tali effetti è la riduzione della clearance del colesterolo dovuta ad una diminuzione dei recettori per le LDL. Anche il genotipo del gene codificante per il recettore delle LDL potrebbe influenzare l'aumento della concentrazione sierica di colesterolo LDL in pazienti ipotiroidei e la loro risposta al trattamento con la tiroxina (Wiseman SA et al., 1993). Un ulteriore meccanismo d'azione potrebbe essere legato ad una ridotta attività dell'enzima lipasi epatica che porta ad una diminuzione della conversione delle lipoproteine a media densità in LDL e ad un ridotto metabolismo delle lipoproteine ad alta densità (HDL) (Tan KC et al., 1998). L'ormone tiroideo regola anche l'espressione di altre importanti proteine ed enzimi coinvolti nel metabolismo e nella sintesi del colesterolo come i recettori per le LDL, l'idrolasi degli esteri del colesterolo e la colesterolo acil-transferasi (Ridgway ND et Dolphin PJ, 1985; Scarabattolo L et al., 1986; Severson DL et Fletcher T, 1981). Non è ben chiaro se questi effetti sono mediati direttamente o indirettamente dall'ormone tiroideo. E' presente in letteratura una evidenza indiretta del coinvolgimento diretto della T₃ sull'espressione genica. In tale studio, Hayashi e Refetoff hanno sviluppato un modello murino di resistenza all'ormone tiroideo tramite la trasfezione degli epatociti con vettori codificanti una forma mutata del recettore nucleare per l'ormone tiroideo (Hayashi Y et Refertoff S, 1995). I topi che esprimevano la forma mutata del recettore, sia essi ipotiroidei che ipertiroidei, avevano elevati livelli sierici di colesterolo se comparati ad animali di controllo. Questa osservazione aveva suggerito un ruolo diretto dei recettori per l'ormone tiroideo e quindi dell'ormone stesso sulla espressione genica.

Ormone tiroideo ed ipofisi

E' noto che l'ormone tiroideo regola la sintesi e la secrezione di diversi ormoni ipofisari. Infatti, è ben documentato che ratti ipotiroidei non hanno ormone della crescita (GH) (Samuels HH et al., 1988). Inoltre, in cellule tumorali della ghiandola ipofisaria di ratto, la T₃ può stimolare la trascrizione di mRNA del GH (Seo H et al., 1977). A differenza dei roditori, tuttavia, T₃ ha una

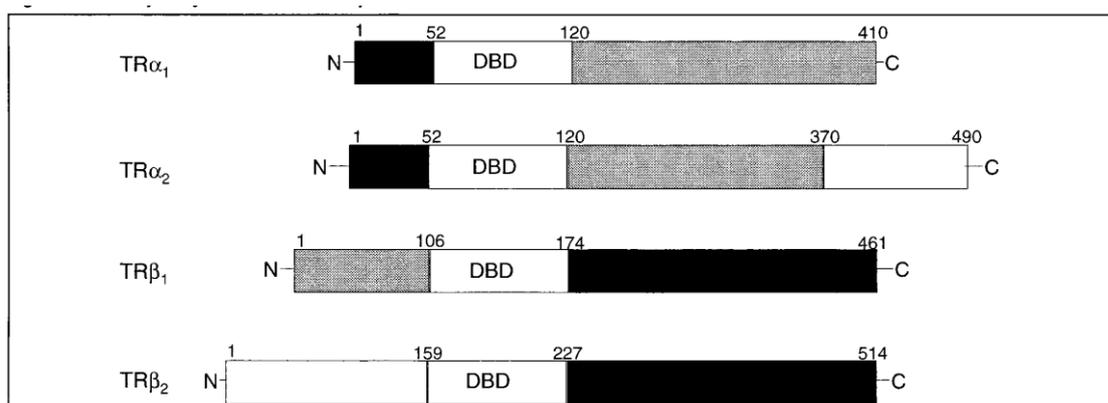
capacità limitata nel regolare la sintesi del GH negli uomini. Ad esempio, bambini affetti da ipotiroidismo, hanno difetti nella crescita ma i livelli bassi di GH sono normali (Rivkees SA et al., 1988; Valcavi R et al., 1993). Studi effettuati su adenomi somatotropi umani in coltura hanno rilevato che la T_3 stimola il rilascio di GH ma ha effetti variabili sulla trascrizione (Chomczynski P et al., 1993). L'ormone tiroideo regola anche negativamente la trascrizione dell'ormone tireotropo (TSH) attraverso sia meccanismi diretti che indiretti (Shupnik MA et al., 1989). Infatti, esso può regolare negativamente a livello genico anche l'ormone TRH che, a sua volta, riduce la trascrizione dell'mRNA del TSH (Shupnik MA et al., 1986). T_3 può anche downregolare l'mRNA della prolattina sia attraverso un meccanismo simile a quello appena descritto sia tramite effetti diretti sulla trascrizione (Wood DF et al., 1987). Infine, è riportato che T_3 è anche in grado di regolare negativamente il TSH riducendo la trascrizione del subunità α dell'ormone glucoproteico (che è comune al TSH, all'ormone luteinizzante, all'ormone follicolo-stimolante ed alla gonadotropina corionica umana) e della subunità β del TSH (Breen JJ et al., 1997; Chatterjee VK et al., 1989; Madison LD et al., 1993; Shupnik MA et al., 1989).

Effetti sul cervello

L'ormone tiroideo esercita i suoi maggiori effetti sullo sviluppo del cervello nell'utero e durante il periodo neonatale (Oppenheimer JH et Schwartz HL., 1997; Bernal J, 1999). L'ipotiroidismo neonatale dovuto a cause congenite e a carenza di iodio può causare ritardo mentale e difetti neurologici. Studi effettuati su ratti neonati ipotiroidei hanno messo in evidenza che l'assenza di T_3 causa una riduzione della crescita assonale ed una arborizzazione dei dendriti nella corteccia cerebrale, cerebellare, visiva, auditoria e nell'ippocampo (Rabie A et al., 1977; Rabie A et Legrand J, 1973). Il ritardo nello sviluppo del cervello può essere evitato se l'ormone tiroideo è somministrato entro due settimane dalla nascita (DeVijlder JJM et Vulsma T. 1996). Queste osservazioni supportano l'idea che il trattamento precoce dell'ipotiroidismo congenito con T_4 previene il ritardo mentale e ciò rappresenta un ottimo motivo per effettuare screening preventivi atti a diagnosticare per tempo tale forma di ritardo mentale. Nonostante il ruolo importante svolto dall'ormone tiroideo nello sviluppo del cervello, attualmente sono conosciuti pochi geni su cui l'azione è diretta ed alcuni di questi sono solo parzialmente caratterizzati. Tra questi è nota la proteina mielinica basica (MBC) (Farsetti A et al., 1992; Farsetti A et al., 1991). L'ormone tiroideo regola anche altri geni coinvolti in un ampio range di funzioni cellulari quali la glutammina sintasi, la proteina chinasi C, la prostaglandina2 sintasi, e numerose molecole di adesione tra le cellule nervose e la matrice come, ad esempio, la tenascina (Alvarez- Dolado M et al., 1998; Garcia-Fernandez LF et al., 1997; Thompson CC, 1996).

Recettori per l'ormone tiroideo

Molte delle azioni esplicate dall'ormone tiroideo sono mediate dall'interazione con una particolare classe di recettori nucleari (TRs) (Brent GA, 1996). I TRs appartengono ad una superfamiglia di recettori nucleari attivati da regolatori della trascrizione genica (Katzenellenbogen JA and Katzenellenbogen BS; 1996; Mangelsdorf DJ et al., 1996). Questa superfamiglia include, oltre ai TRs, recettori per gli ormoni steroidei, recettori per la vitamina D e l'acido retinoico, ed un vasto elenco di recettori orfani per i quali non sono ancora stati identificati i ligandi fisiologici. Tutti i recettori nucleari mostrano una simile struttura caratterizzata da un dominio di legame per il ligando all'estremità C-terminale (LBD), un dominio di legame al DNA centrale (DBD) ed un dominio N-terminale che sembra essere importante per alcune funzioni di transattivazione. I TRs agiscono con le stesse modalità degli altri recettori nucleari: il legame della T_3 al dominio LBD ne permette l'attivazione che si traduce poi nella transattivazione o transrepressione dei geni regolati dall'ormone tiroideo (Zhang J and Lazar MA, 2000). Esistono due differenti geni codificanti per due diversi sottotipi recettoriali dei TRs, $TR\alpha$ (denominato anche NR1A1) e $TR\beta$ (denominato anche NR1A2) (Lazar MA, 1993; Oppenheim JH et al., 1994). I trascritti primari di questi due geni possono essere processati in modo differente dando origine a diverse isoforme. Le quattro maggiori isoforme meglio caratterizzate sono $TR\alpha_1$, $TR\alpha_2$, $TR\beta_1$ e $TR\beta_2$ (**Figura 3**).



Il dominio di legame al DNA è indicato come DBD. Il dominio di legame per il ligando (LBD) si trova all'estremità C-terminale del DBD

Figura 3: Principali isoforme recettoriali dell'ormone dell'ormone tiroideo

$TR\alpha_1$ e $TR\alpha_2$ differiscono per il dominio LBD; $TR\alpha_2$ contiene, infatti, un dominio LBD più ampio rispetto a $TR\alpha_1$ e non è in grado di legare l'ormone tiroideo. $TR\beta_1$ e $TR\beta_2$ differiscono per la

lunghezza della catena aminoacidica e per la sequenza del dominio N-terminale. Le isoforme recettoriali sono espresse in rapporti differenti nei diversi tessuti, suggerendo che il pattern di espressione delle isoforme in un dato tessuto può essere una importante variabile per le azioni tessuto-specifiche dell'ormone tiroideo. Sia $TR\alpha_1$, $TR\beta_1$ legano l'ormone tiroideo con la stessa affinità e sono espressi essenzialmente in tutti i tessuti bersaglio, sebbene in alcuni tessuti predomini una isoforma piuttosto che un'altra. Ad esempio, nel fegato di ratto adulto, il rapporto $TR\beta_1/ TR\alpha_1$ è approssimativamente 5:1, mentre nel cuore di ratti adulti tale rapporto è approssimativamente 1:1 (Schwartz HL et al., 1992; Schwartz HL et al., 1994). Studi condotti utilizzando topi Knockout per i TRs hanno permesso di identificare il ruolo di $TR\alpha$ e $TR\beta$ in vivo. I topi utilizzati per gli esperimenti erano knockout per $TR\alpha$ ($TR\alpha^{-/-}$), $TR\alpha_1$ ($TR\alpha_1^{-/-}$), $TR\beta$ ($TR\beta^{-/-}$), sia $TR\alpha_1$ che $TR\beta$ ($TR\alpha_1^{-/-}$, $TR\beta^{-/-}$) e topi completamente mancanti di TRs ($TR\alpha^{-/-}$, $TR\beta^{-/-}$) (Tabella 1).

GENOTIPO	FENOTIPO
$TR\beta^{-/-}$	Gozzo, elevati livelli di T_4, T_3 e TSH, disturbi dell'udito
$TR\alpha^{-/-}$	Ipotiroidismo progressivo ed arresto della crescita, compromesso sviluppo delle ossa e del piccolo intestino, alterata sintesi di T_4, tasso di sopravvivenza basso
$TR\alpha_1^{-/-}$	Lieve ipotiroidismo nei maschi, comportamento e riproduzione normali, frequenza cardiaca più bassa (bradicardia), temperatura corporea più bassa
$TR\alpha_1^{-/-}$ $TR\beta^{-/-}$	Fertilità maschile normale ed infertilità femminile, gozzo elevati livelli di T_4, T_3 e TSH, riduzione della crescita e dello sviluppo delle ossa
$TR\alpha^{-/-}$ $TR\beta^{-/-}$	Fenotipo simile al genotipo $TR\alpha^{-/-}$ ma con livelli elevati di T_4, T_3 e TSH, gozzo

Tabella 1

Alcune specifiche funzioni possono essere assegnate a $TR\alpha$ e $TR\beta$ sulla base dei distinti fenotipi di questi topi mutanti. Il genotipo $TR\beta^{-/-}$ mostra un fenotipo caratterizzato da iperplasia della ghiandola tiroidea, elevati livelli sierici di T_4 e di TSH e un difetto dell'orecchio interno che porta alla perdita dell'udito (Forrest D et al., 1996). Il genotipo $TR\alpha^{-/-}$ mostra anomalie più marcate incluse riduzioni di livelli sierici di T_4 e TSH, alterazioni a carico delle ossa, del piccolo intestino e della ghiandola tiroidea (Fraichard A et al., 1997). Inoltre, il genotipo $TR\alpha^{-/-}$ subisce un arresto della crescita dopo due settimane dalla nascita e muore a quattro settimane. Al contrario, il genotipo

TR α_1 -/- mostra una sopravvivenza ed una capacità di allevamento normali, livelli sierici di T₄ e di TSH bassi, una ridotta frequenza cardiaca ed una diminuzione della temperatura corporea di 0,5°C (Wikestrom L et al., 1998). Molto interessante è il fatto che il genotipo TR α_1 -/- TR β -/- mostra un fenotipo unico, non osservato né per i topi knockout TR α_1 -/- né per quelli TR β -/-, caratterizzato da una iperattività dell'asse ipofisi-ghiandola tiroidea, infertilità delle femmine e ritardo nella crescita e nella maturazione dell'osso (Gothe K et al., 1999). I topi TR α -/- TR β -/- mostrano un fenotipo simile a quello dei topi TR α -/- anche se hanno gozzo e livelli sierici di ormone tiroideo e TSH elevati (Gauthier K et al., 1999). I risultati mostrano, in conclusione, che i recettori TR α e TR β mediano funzioni tessuto-specifiche diverse e non sovrapponibili. In particolare, TR α regola la frequenza cardiaca mentre TR β regola i livelli sierici di TSH e colesterolo.

Azioni non genomiche dell'ormone tiroideo

Azioni dell'ormone tiroideo che non richiedono il legame a recettori nucleari sono indicate come "non genomiche". Sebbene non sia stato identificato alcun recettore per l'ormone tiroideo localizzato sulla membrana plasmatica, vi sono numerose evidenze dell'importanza di eventi innescati da processi che si realizzano a partire dalla membrana plasmatica (Davis PJ et Davis FB, 2002). Tali azioni coinvolgono l'attivazione di numerose pompe e canali ionici tra cui i canali per il K⁺ I_K, i canali per il K⁺ voltaggio-dipendenti, i canali per il Na⁺ del sarcolemma e la Ca²⁺-ATPasi sarcolemmatica. Altre azioni dell'ormone tiroideo che non richiedono l'attivazione di recettori nucleari sono la cascata delle proteine chinasi attivate da mitogeni (MAPK) (Lin HY et al., 1999). Questo processo inizia a livello della membrana plasmatica, richiede l'attivazione della fosfolipasi C e l'attivazione della protein chinasi C, e dipende dalla partecipazione di componenti della cascata delle MAPK. Recentemente si è anche visto che l'ipertrofia cardiaca dipende dall'attivazione di una proteina citosolica, la calcineurina (Vanamala SK et al., 2003). Una volta attivata dall'aumento della concentrazione intracellulare di calcio, la calcineurina defosforila il suo bersaglio, il fattore nucleare delle cellule T attivate c3 (NFATc3) il quale trasloca all'interno del nucleo dove attiva il programma genico che porta all'ipertrofia cardiaca. Altre azioni non genomiche prevedono l'effetto della T₃ e di suoi metaboliti sulla respirazione mitocondriale.

Azioni genomiche e non genomiche dell'ormone tiroideo e respirazione mitocondriale

Più di 100 geni sono coinvolti nell'assemblaggio dell'apparato respiratorio mitocondriale. La maggior parte di questi geni sono localizzati all'interno del genoma nucleare, mentre solo 13 fanno parte del genoma mitocondriale (Attardi G et Schatz G, 1988). Sebbene T_3 sia considerato il maggiore regolatore della respirazione mitocondriale, solo 9 geni nucleari sono attivati direttamente dall'ormone tiroideo (Pillar TM et Seitz HJ, 1997). Questo paradosso è stato risolto, almeno in parte dalla identificazione di fattori di trascrizione nucleare sensibili alla stimolazione da parte della T_3 ed in grado di attivare l'espressione di geni coinvolti nella respirazione mitocondriale (Weitzel JM et al., 2003).

Recentemente sono state identificate alcune proteine nucleari coinvolte nella regolazione dell'espressione del complesso respiratorio nelle cellule di mammifero, che possono essere distinte in due classi. La prima consiste di fattori trascrizionali in grado di legare il DNA. Queste proteine legano i promotori di geni nucleari che contribuiscono direttamente e indirettamente sia all'espressione che alla funzione della catena respiratoria. La seconda classe di regolatori nucleari comprende proteine recentemente definite coattivatori trascrizionali. Esse non legano il DNA ma esplicano il loro effetto sull'espressione genica attraverso l'interazione con fattori trascrizionali o altri coattivatori. Prove sperimentali sembrano sostenere l'ipotesi secondo cui il controllo della biogenesi mitocondriale sia mediato dall'interazione di queste due classi di fattori nucleari.

NRF-1 e NRF-2 (**Nuclear Respiratory Factor-1 e -2**) appartengono alla prima classe di proteine nucleari. Essi sono responsabili dell'attivazione di geni nucleari che codificano proteine importanti per la funzione mitocondriale. La seconda classe, invece, include il PGC-1 (**Peroxisomal proliferator-activated receptor- γ coactivator**) (Weitzel, 2003) e membri appartenenti alla stessa famiglia.

NRF-1 è una proteina in grado di attivare geni codificanti per il citocromo c, per la maggior parte delle subunità nucleari dei complessi I e V e per l'enzima 5-aminolevulinato sintasi, enzima coinvolto nella sintesi dell'eme. Inoltre, NRF-1 promuove l'espressione di componenti chiave della trascrizione mitocondriale necessari per la sintesi di subunità respiratorie (Scarpulla RC, 2008). La sua induzione è stata osservata nel muscolo scheletrico di ratti sottoposti ad esercizio (Murakami et al., 1998) (**Figura 4**).

A NRF-1

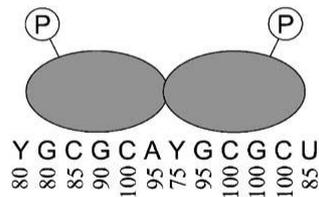


Figura 4. Rappresentazione schematica di NRF-1 e del suo legame ai promotori dei geni che codificano per le subunità dei complessi della catena respiratoria.

NRF-2 (GABP) è un fattore composto da 5 subunità: α (51.4 kDa), β_1 (42.5 kDa), β_2 (42.3 kDa), γ_1 (38.1 kDa), γ_2 (36.9 kDa). La subunità α contiene una sequenza ETS grazie alla quale è in grado di legare il DNA anche in assenza di altre subunità. Al contrario, le altre subunità possono formare un complesso con la α , ma non sono in grado di interagire direttamente col DNA (**Figura 5**).

B NRF-2

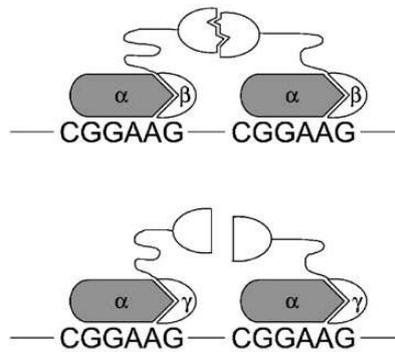


Figura 5. Rappresentazione schematica di NRF-2.

NRF-2 è coinvolto nella regolazione di geni responsabili della funzionalità mitocondriale, nella biogenesi della subunità IV della citocromo ossidasi e del fattore A di trascrizione mitocondriale (Tfam). Tale fattore coordina l'espressione dei componenti mitocondriali in risposta a richieste energetiche o segnali proliferativi.

PGC-1 è un coattivatore trascrizionale (**Figura 6**) del peso molecolare di 92 kDa, identificato per la prima volta in una linea cellulare differenziata del tessuto adiposo bruno sulla base della sua

interazione con PPAR γ , un importante regolatore del differenziamento degli adipociti (Puigserver et al., 1998). Esso è dotato di un potente dominio di attivazione trascrizionale, ma, a differenza degli altri coattivatori, appare privo di una attività istone-acetil-transferasi. L'effetto positivo mediato da PGC-1 sulla trascrizione sembra essere indotto, quindi dalla sua capacità di reclutare altri coattivatori che hanno un'attività acetil-transferasica intrinseca (Puigserver et al., 1999).

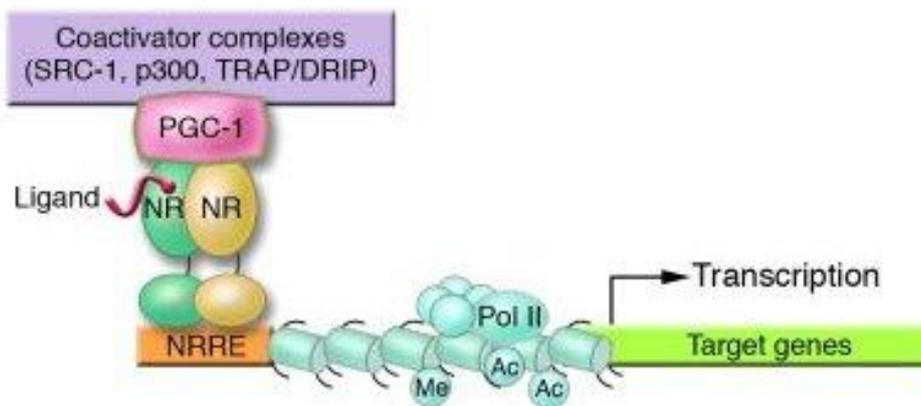


Figura 6. PGC-1 coattivatore trascrizionale.

È stato messo in evidenza che l'espressione di PGC-1 si realizza preferenzialmente in tessuti con un'elevata capacità ossidativa, come cuore muscolo scheletrico e BAT, dove esercita un ruolo importante nella regolazione della funzionalità mitocondriale e del metabolismo energetico cellulare. Inoltre, è stato recentemente dimostrato che un aumento della sua espressione in mioblasti in cultura induce biogenesi mitocondriale (Wu Z et al., 1999).

Inoltre, sono stati anche identificati dei siti di legame per la T₃ localizzati direttamente sui mitocondri rappresentati da una isoforma troncata del recettore nucleare TR di tipo α , mancante del dominon A/B N-terminale TR α 1 (Bigler J et al., 1992). La versione più piccola, p28, si lega alla membrane mitocondriale interna, mentre quella più grande, p43, è localizzata nella matrice mitocondriale dove stimola la trascrizione del macchinario mitocondriale in presenza di T₃ (Casa F et al., 1999). In letteratura sono presenti anche forti evidenze sperimentali che analoghi della T₃ possano esplicare azioni non genomiche a livello mitocondriale. E' noto che la 3,5-T₂ è un metabolita dell'ormone tiroideo in grado di influenzare numerose funzioni mitocondriali (Moreno M et al., 2008; Lombardi A et al., 2009). E' riportato che alte concentrazioni di 3,5-T₂ stimolano rapidamente la velocità metabolica basale e la capacità ossidativa in ratti ipotiroidei e tale effetti non richiedono né la sintesi de novo di proteine, né tanto meno sono accompagnati da effetti

cardiaci tireotossici ben noti per l'ormone tiroideo somministrato alle medesime concentrazioni. Nei roditori alimentati con diete ad elevato contenuto di grasso, la 3,5-T₂ previene anche l'obesità attraverso la attivazione della AMP-Kinasi, la quale è responsabile della stimolazione della termogenesi e della ossidazione degli acidi grassi nel muscolo scheletrico (Lombardi A et al., 2009). La T₂ stimola anche il macchinario biochimico respiratorio dipendente dal FADH₂ ed altera la distribuzione lipidica favorendo l'ingresso di acidi grassi a catena lunga all'interno dei mitocondri. Tali effetti rimangono tuttavia da studiare in animali eutiroidei ed pazienti affetti da obesità. Il disaccoppiamento mitocondriale osservato per la T₂, molto simile a quello indotto dalla T₃ e risultante in una ridotta efficienza dell'utilizzazione dell'energia, non è stato però associato ad una alterazione dell'espressione delle proteine UCPs (Mollica MP et al., 2009). Sembra piuttosto che la riduzione della stechiometria H⁺/elettrone sia legata al legame della T₂ con le subunità della citocromo ossidasi con conseguente alterazione della funzionalità di questo elemento nella catena respiratoria (Moreno M et al., 2008). Tali effetti sono distinti dalla ben nota attivazione dei geni codificanti le proteine UCPs nel BAT indotta dall'ormone tiroideo sinergicamente alla stimolazione β-adrenergica della produzione di cAMP, e dei geni codificanti per inibitori della deiodinasi di tipo 2, mediante l'interazione con la isoforma recettoriale TRβ (Ribeiro MO et al., 2010).

Effetti benefici e deleteri dell'ormone tiroideo

L'ormone tiroideo media effetti molto diffusi il cui studio è stato facilitato dall'analisi di condizioni patologiche caratterizzate da un aumento o da una riduzione dei livelli circolanti di T₃ (Braverman LE, 2000). Un eccesso di ormone tiroideo induce, tra gli effetti desiderabili, una riduzione dei livelli di colesterolo legato a lipoproteine a bassa densità (LDL), di lipoproteina a [LP (a)], dei trigliceridi ed una perdita del peso corporeo. E' noto, infatti, che elevati livelli circolanti di LDL sono associati ad un aumento del rischio di aterosclerosi, infarti ed attacchi cardiaci. Anche elevati livelli di LP(a) sono associati a precoci attacchi cardiaci, mentre i livelli dei trigliceridi rappresentano un fattore di rischio per la genesi dell'aterosclerosi, soprattutto nei pazienti affetti da diabete. L'obesità rappresenta un'altra seria minaccia per la salute. Tra gli effetti non desiderabili dell'ormone tiroideo vanno ricordati, invece, la tachicardia (aumento della frequenza cardiaca), l'aritmia atriale (battiti cardiaci irregolari), la perdita di massa muscolare, il riassorbimento osseo, l'affaticabilità ed effetti psicologici (Baxter JD et al. 2001; Cooper DS, 2003).

Sviluppo di analoghi dell'ormone tiroideo per l'isoforma recettoriale di tipo β

Due indipendenti linee di studi sperimentali avevano già messo in evidenza intorno agli anni '90 che attivatori selettivi dell'isoforma recettoriale β potessero essere utilizzati a scopo terapeutico (Baxter JD et al., 2001; Scanlan TS et al., 2001). La prima proveniva dall'analisi dei sintomi di pazienti affetti dalla sindrome della resistenza all'ormone tiroideo. Questa malattia è caratterizzata da un difetto nel pathway di segnalazione cellulare (Refetoff S et al., 1993; Chatterjee VK, 1997) ed è frequentemente causata da una mutazione a livello di uno solo dei due alleli codificanti per l'isoforma recettoriale β la quale si traduce in una diminuzione dell'affinità della T_3 per il recettore tiroideo. Tale difetto porta ad una compromissione del meccanismo a feedback negativo esercitato dalla T_3 sul rilascio dell'ormone TSH. In alcuni casi, i risultanti elevati livelli di 3,5,3',5'-tetraiodo-L-tironina (T_4) sono sufficienti a compensare la riduzione dell'affinità dell'ormone per il recettore. In questo caso, i pazienti mostrano solo pochi sintomi. Nella maggior parte dei casi, però, i pazienti presentano tachicardia, il che suggerisce che gli effetti dell'ormone tiroideo sulla frequenza cardiaca siano mediati da una superattivazione dell'isoforma recettoriale α da parte degli elevati livelli di ormone tiroideo. Ulteriori informazioni derivavano da topi knockout per le due isoforme recettoriali (Baxter JD et al., 2001; Scanlan TS et al., 2001; Forrest D et Vennstrom B, 2000; O'Shea PJ et Williams GR, 2002). I risultati ottenuti in questi esperimenti mostravano che $TR\alpha$ regolava la frequenza cardiaca, mentre $TR\beta$ era responsabile della regolazione dei livelli plasmatici di colesterolo e dei livelli sierici di TSH. Presi insieme, i dati, quindi, suggerivano che l'attivazione selettiva di $TR\beta$ avrebbe potuto evocare la riduzione dei livelli sierici di colesterolo osservata in presenza di un eccesso di ormone tiroideo risparmiando allo stesso tempo l'effetto sulla funzionalità cardiaca.

Scoperta dell'agonista β -selettivo GC-1

Nonostante in letteratura fossero già presenti numerose informazioni sulla chimica dell'ormone tiroideo, lo studio approfondito delle due isoforme recettoriali ha aperto nuove strade per approcci chimici atti a selezionare l'attivazione preferenziale dei recettori per l'ormone tiroideo. Nel 1995, Scanlan e collaboratori, alla luce delle nuove informazioni presenti sui meccanismi di azione dell'ormone tiroideo, iniziarono un progetto sperimentale che mirava alla sintesi di nuovi ligandi per i recettori TR. Avendo a disposizione la struttura cristallina del legame TR- T_3 e le relazioni attività-struttura di analoghi dell'ormone tiroideo (Yokoyama N et al., 1995), essi sintetizzarono

una nuova molecola, l'acido 3,5-diiodotiropropionico, denominato GC-1 (Chiellini G et al., 1998). Il GC-1 presenta nella sua struttura tre sostituzioni rispetto all'ormone tiroideo: un acido ossiacetico sostituisce il gruppo dell'acido amino propionico; un metile (posizioni 3,5) ed un isopropile (posizione 5') sostituiscono i gruppi iodinici; infine, un esteso ponte etilenico lega i due anelli arilici al posto di un ossigeno (**Figura 7**).

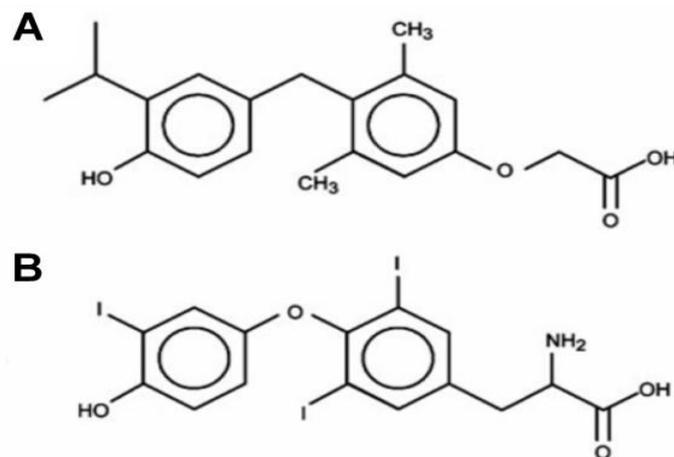


Figura 7: A. Struttura chimica di GC-1. B. Struttura chimica di T₃.

Le prime misure condotte sull'affinità di legame dell'agonista per i TR aveva subito dato indicazioni del fatto che il GC-1 fosse un composto non usuale (Chiellini G et al., 1998). Infatti, esso aveva mostrato una eccezionale affinità di legame per i TR dello stesso ordine di grandezza del ligando endogeno T₃. Tale risultato era inaspettato in quanto la sostituzione di un atomo di iodio con il gruppo idrossicarbonioso fatta per altri analoghi come il DIMIT (3,5-dimetil-3'-isopropiltironina) aveva provocato una riduzione dell'affinità di legame con il recettore di un valore variabile da 10 a 100 volte (Jorgensen EC, 1978 I; Jorgensen EC, 1978 II). Sorprendente era anche l'osservazione che il GC-1 mostrasse specificità nel legarsi alle due isoforme recettoriali. Esso, difatti, legava TR β ₁ con la stessa affinità della T₃, ma legava TR α ₁ con una affinità circa 10 volte più bassa. L'evidenza inequivocabile della selettività del GC-1 per TR β venne successivamente dagli esperimenti condotti sulla metamorfosi del girino nella rana *Xenopus laevis* (Furlow JD et al., 2004). La metamorfosi dei girini è finemente regolata dall'ormone tiroideo e le due isoforme recettoriali TR α e TR β giocano ruoli distinti e mediano effetti tessuto-specifici nel programma di

sviluppo. Nel girino pre-metamorfico, TR α è altamente espresso nei tessuti caratterizzati da una accentuata proliferazione cellulare come la pelle ed il cervello e la sua attivazione è fondamentale nel guidare la proliferazioni di questi tessuti durante lo stadio metamorfosale. Quando si avvicina il picco dello stadio metamorfico, aumenta l'espressione di TR β nei tessuti che, invece, devono andare incontro a morte apoptotica, quali la coda e le branchie, e l'attivazione di TR β è indispensabile per il riassorbimento di questi tessuti larvali. Tali processi possono essere indotti dall'aggiunta di T₃ o di analoghi tireomimetici della T₃ al mezzo acquoso in quanto tali composti sono rapidamente assorbiti dai girini attraverso la pelle e le branchie. Quando il GC-1 fu testato utilizzando questo biosaggio in vivo, il risultato dell'esperimento mostrò un riassorbimento della coda e delle branchie e, rispetto alla T₃, una minore influenza sulla proliferazione cellulare del tessuto epidermico e cerebrale.

Lo studio della struttura cristallina del GC-1 legato alla regione LBD del TR β fornisce numerosi indizi per comprendere la selettività dell'analogo (Wagner RL et al., 2001). La struttura mostra una estesa rete di legami ad idrogeno localizzata nella regione di legame al ligando che accoglie la catena laterale dell'acido ossiacetico del GC-1. Questa rete è più estesa rispetto a quella osservata per i complessi formati dai TRs con altri analoghi dell'ormone tiroideo e, quindi, sembra che l'energia di legame fornita da queste interazioni addizionali sia la causa della selettività del GC-1 (Baxter JD et al., 2001)

Effetti del GC-1

Effetti cardiaci

E' ampiamente dimostrato in letteratura che il GC-1 è un tireomimetico selettivo per la funzionalità epatica ed ha una influenza sull'attività cardiaca molto più bassa rispetto a quella dell'ormone tiroideo (Trost SU et al., 2000). Nei topi ipotiroidei che mostrano bradicardia, il GC-1 non ha una significativa influenza sulla frequenza cardiaca, mentre a dosi equivalenti, T₃ aumenta la frequenza cardiaca fino a riportarla ai valori di controllo dei ratti eutiroidei. Lo studio della regolazione dei geni attivati dalla T₃ nei cuori di questi animali ha mostrato che il GC-1 regola la trascrizione delle catene pesanti della miosina α e β e dell'ATPasi Calcio-dipendente SERCA2 (geni noti per il loro coinvolgimento nella regolazione della forza contrattile) con una potenza 10 volte più bassa rispetto alla T₃. Inoltre, mentre nei topi trattati con T₃ il canale di tipo 2 attivato dalla iperpolarizzazione (HCN-2), noto per il suo coinvolgimento nella regolazione della frequenza cardiaca, è marcatamente up-regolato, esso non subisce lo stesso effetto in topi trattati con alte dosi di GC-1.

Effetti epatici

A differenza di quanto accade nel tessuto cardiaco, come già accennato, il GC-1 ha una influenza molto marcata sul metabolismo lipidico epatico. I primi studi finalizzati a chiarire il coinvolgimento del GC-1 in tale tessuto e la sua potenzialità terapeutica nella regolazione dei livelli plasmatici di colesterolo sono stati effettuati nel 2000. Era noto che nel fegato, tessuto dove si verifica la regolazione dell'omeostasi lipidica, predomina l'isoforma TR β , mentre nel cuore, dove sono più evidenti gli effetti dannosi dell'ipertiroidismo, la T₃ media le sue azioni grazie all'attivazione dei TR α (Yen PM, 2001). Era anche noto che gli individui ipertiroidei generalmente presentano bassi livelli sierici di LDL ed un aumento della frequenza cardiaca, mentre, nei casi di ipotiroidismo, si osservano alti livelli sierici di LDL e bradicardia. Tuttavia, mentre l'ormone tiroideo endogeno non era in grado di distinguere tra l'isoforma recettoriale TR β epatica e l'isoforma TR α cardiaca, un agonista selettivo per l'isoforma β , come il GC-1 avrebbe potuto effettuare tale discriminazione esplicando come effetto farmacologico la riduzione del livello di colesterolo LDL tramite l'attivazione del TR β nel fegato accompagnata da un minor effetto sulla funzionalità cardiaca se comparato alla T₃. Tale ipotesi fu testata per la prima volta in topi ipotiroidei (Trost SU et al., 2000). I topi normali presentano una frequenza cardiaca basale alta rendendo difficile le misure sulla tachicardia eventualmente indotta dal trattamento farmacologico. Tale problema venne

superato utilizzando topi ipotiroidei in cui la riduzione dei livelli sierici di ormone tiroideo era associata a bradicardia. I topi trattati con dosi equimolari di T_3 e GC-1 mostravano, nel primo caso, un aumento della frequenza cardiaca del 25%, che in sostanza riportava i battiti cardiaci in condizioni di normalità, mentre nel secondo caso non si osservava alcun aumento. Nel topo l'ipotiroidismo è anche associato ad un aumento dei livelli sierici di colesterolo di circa due volte il valore normale e sia il trattamento con T_3 che quello con GC-1 riportavano i livelli di colesterolo ai valori dell'eutiroideo.

Il GC-1 fu poi successivamente studiato nei ratti ipercolesterolemici (Trost SU et al., 2000; Grover GJ et al., 2004). I roditori non hanno lo stesso corredo lipoproteico degli uomini. A differenza dei primati, la maggior parte del colesterolo circolante è legato a lipoproteine ad alta densità (HDL). Alimentando i ratti con una dieta ad alto contenuto di colesterolo è possibile modificare il rapporto LDL/HDL in modo tale che si avvicini a quello umano. Nei ratti ipercolesterolemici, è stato dimostrato che sia T_3 che GC-1 riducono i livelli plasmatici di colesterolo di circa il 75%. I ratti trattati con T_3 mostrano, però, anche un aumento della frequenza cardiaca ed una diminuzione dei livelli di TSH. Inoltre, l'esperimento ha messo in evidenza che non c'era alcuna finestra temporale "terapeutica" che separasse la riduzione dei livelli di colesterolo dalla tachicardia e dalla soppressione del TSH. Invece, il GC-1 non sembrava indurre alcun aumento della frequenza cardiaca neppure con dosi più alte e mostrava una netta finestra temporale tra l'abbassamento dei livelli di colesterolo e la soppressione del TSH. I risultati ottenuti in questi studi, quindi, confermavano un ruolo del GC-1 nell'indurre un abbassamento dei livelli sierici di colesterolo e ciò non era associato a significativi effetti sulla frequenza cardiaca. Una analisi della distribuzione tissutale del GC-1 ha messo in evidenza che l'analogo è assorbito dal tessuto epatico in misura maggiore rispetto al cuore se comparato con la T_3 (Trost SU et al., 2000). L'analisi della spettroscopia di massa nei ratti ha messo in evidenza che i livelli di T_3 nel cuore sono ~75 volte più alti rispetto a quelli di GC-1, mentre i livelli di T_3 nel fegato sono solo modestamente più alti dell'analogo. Anche se le basi di questo effetto potrebbe essere legata alla diversa distribuzione delle due isoforme recettoriali, il fenomeno non è ancora del tutto chiaro. Ciò nonostante, l'up-take tessuto-specifico del GC-1 potrebbe spiegare il suo minor effetto a livello cardiaco.

Studi più recenti hanno permesso di avere informazioni sulla comparazione dell'effetto della T_3 e del GC-1 sulle funzioni cardiache e sull'omeostasi dei lipidi in modelli più vicini all'uomo. Gli studi a tale scopo sono stati condotti sulle scimmie cynomolgus, che mostrano funzioni cardiache e corredo lipoproteico molto simile a quello umano (Grover GJ et al., 2004). Oltre alle LDL, anche la lipoproteina a [LP(a)] rappresenta un fattore di rischio per l'aterosclerosi. Le scimmie trattate con T_3 mostrano una riduzione del 30-40% sia del colesterolo che della Lp(a), ma tali effetti sono

accompagnati anche da un incremento pari al 30% della frequenza cardiaca. Al contrario, le scimmie trattate con dosi equimolari di GC-1 mostrano una riduzione dei livelli di colesterolo e lipoproteina a del 35-40% con alcun effetto significativo sulla frequenza cardiaca. E' interessante notare che entrambi i trattamenti inducono anche una bassa ma significativa riduzione del peso corporeo (~4%) fenomeno riconducibile ad una stimolazione della velocità metabolica basale indotta dall'ormone tiroideo. Studi presenti in letteratura mostrano che il GC-1 è in grado di stimolare il dispendio energetico e la perdita di peso in misura minore rispetto alla T₃ sebbene, a differenza di quest'ultima che promuove la riduzione sia della massa adiposa che della massa muscolare, la perdita di peso indotta dal GC-1 è selettiva per la massa gra

GC-1 e gli inibitori delle HMG-CoA reduttasi

Molto interessante è anche la presenza in letteratura di dati riguardanti il confronto tra le “statine” (inibitori dell'idrossimetilglutarilcoenzima A reduttasi, HMG-CoA reduttasi) ed il GC-1 nell'abbassamento dei livelli sierici di colesterolo. La principale differenza tra i due composti è legata al fatto che mentre le statine sono agenti terapeutici di comprovata efficacia e sicurezza nella specie umana, per il GC-1 e altri tireomimetici (Berkenstam A et al., 2008; Erion MD et al., 2007) sono agenti terapeutici ancora in fase sperimentale e la loro efficacia e sicurezza nell'uomo non è ancora del tutto conosciuta. Comunque, GC-1 sembra essere più potente nell'indurre in abbassamento dei livelli di colesterolo rispetto alle statine. Infatti, una comparazione diretta tra il GC-1 e l'atorvastatina (Lipitor) effettuata utilizzando dati presenti in letteratura (Johnston TP et al., 2001; Hiyoshi H et al., 2000) ha messo in evidenza che il GC-1 è più potente della statina rispettivamente di 600 e 1400 volte nelle scimmie e nel ratto. Alla massima dose utilizzata, l'atorvastatina riduce il colesterolo in entrambe le specie approssimativamente del 20%, mentre il GC-1 è responsabile di una riduzione del colesterolo pari al 37% nelle scimmie e al 75% nel ratto (Baxter JD et al., 2004). Attualmente si è propensi a ritenere che le statine e tireomimetici come il GC-1 possano combinare le proprie azioni costituendo così una utile terapia in grado di indurre un notevole abbassamento di livelli di colesterolo con dosi di entrambi gli agenti terapeutici molto basse. Infatti, è noto che gli inibitori dell'HMG CoA-reduttasi limitano la capacità dell'organismo di sintetizzare nuovo colesterolo a partire da precursori introdotti con la dieta. Invece, il GC-1 esplica i propri effetti attraverso l'up-regolazione dei recettori per le LDL epatici e la stimolazione del trasporto inverso del colesterolo (RCT), processo tramite il quale il colesterolo associato alle HDL è convertito in bile (Johansson L et al., 2005).

Interazioni con l'ormone tireotropo TSH

Allo stesso modo dell'ormone tiroideo, anche il GC-1 è in grado di sopprimere i livelli di TSH anche se tale effetto è ancora oggetto di studio. Una soppressione del rilascio di TSH da parte del GC-1 provocherebbe, infatti, una diminuzione dei livelli di ormone tiroideo endogeno, provocando così una condizione di ipotiroidismo legato alla sola attivazione dei TR α . Sebbene sia noto che TR α e TR β medino reazioni differenti, non è ancora chiaro se un ipotiroidismo associato solo all'attivazione di TR α possa sortire effetti deleteri nell'uomo. Nei ratti, il GC-1 sopprime il TSH del 40-45% a dosi che abbassano il livello di colesterolo del 55%. A dosi equivalenti efficaci nella riduzione del colesterolo, T₃ sopprime completamente il TSH. Si è visto che a tali dosi di GC-1, si ha una riduzione dei livelli plasmatici di T₄ del 40%, ma ciò non è accompagnato da una riduzione significativa dei livelli plasmatici di T₃ (Grover GJ et al., 2004; Grover GJ et al., 2003). Sono richiesti, quindi, ulteriori studi per approfondire il significato di questa influenza.

Effetti sul tessuto osseo e sul tessuto muscolare scheletrico

E' noto che il GC-1 è in grado di influenzare i processi coinvolti nello sviluppo dell'osso (Freitas FRS et al., 2005). E' anche riportato in letteratura che ratti trattati cronicamente con T₃ o GC-1 (60 giorni) e poi successivamente sottoposti a misure della massa ossea in diversi siti scheletrici mostrano, nel primo caso, una significativa riduzione della densità mineralogica ossea (BMD), mentre non si riscontra alcuna variazione della BMD nel secondo caso (Freitas FRS et al., 2003).

Sono anche noti studi sugli effetti del GC-24, un derivato del GC-1 molto affine a quest'ultimo per struttura e farmacologia, sul muscolo scheletrico (Borngraeber S et al., 2003). In questo studio, lo shift delle fibre muscolari di tipo I a fibre di tipo II è utilizzato come marker di affaticamento muscolare, caratteristica tipica dell'ipertiroidismo (Miyabara EH et al., 2005). I risultati ottenuti mettono in evidenza che T₃ induce in maniera significativa lo shift, mentre GC-24 non influenza significativamente i cambiamenti nella composizione delle fibre del tessuto muscolare.

Effetti sulla termogenesi adattativa

GC-1 è stato anche utilizzato in diversi studi per valutare il ruolo dell'isoforma recettoriale β nella termogenesi adattativa (Ribeiro MO et al., 2001). La termogenesi adattativa indotta dal freddo si verifica nel tessuto adiposo bruno (BAT) ed è mediata sia dall'ormone tiroideo che dal pathway di segnalazione β -adrenergico (Silva JE, 2001). Il fenotipo dei topi knockout per il gene TR indica che la termogenesi dipende dalla isoforma recettoriale. I topi knockout $TR\alpha_1$ vanno incontro ad un leggero abbassamento della temperatura corporea, mentre i topi Knockout $TR\beta$ no. La proteina disaccoppiante mitocondriale UCP-1 espressa nel BAT è essenziale per la termogenesi adattativa e sia l'ormone tiroideo che GC-1 sono in grado di incrementarne la sua espressione nei topi ipotiroidei. Tuttavia, i topi trattati con T_3 mostrano un aumento della termogenesi, mentre quelli trattati con GC-1 no. La mancata risposta termogenica nei topi trattati con GC-1 trova spiegazione nella ridotta produzione di cAMP mediata dalla stimolazione β -adrenergica se comparata con quella che si osserva nei topi trattati con T_3 . Queste osservazioni hanno portato alla conclusione che i due processi ormone-dipendente coinvolti nella termogenesi, ossia la stimolazione delle proteine UCP1 e la risposta alla stimolazione β -adrenergica, sono rispettivamente mediate da $TR\beta_1$ e $TR\alpha_1$.

Altri effetti

Altri importanti processi guidati dall'ormone tiroideo, in cui sembra essere coinvolto anche il GC-1 sono lo sviluppo del cervello (Morte B et al., 2002; Manzano J et al., 2003; Morte B et al., 2004), la regolazione dell'asse ipotalamo-ipofisi-tiroide (PHT) (Dupre SM et al., 2000), l'angiogenesi (Mousa SA et al., 2005) e la proliferazione cellulare (Columbano A et al., 2006).

Ormoni tiroidei e mitocondri

L'ormone tiroideo T_3 esercita azioni significative sul metabolismo energetico ed i mitocondri rappresentano i principali organelli cellulari bersaglio dell'ormone per il suo noto effetto calorigenico. I mitocondri consumano i substrati metabolici e producono ATP attraverso il processo di fosforilazione ossidativa. L'ossidazione dei substrati energetici sulla membrana mitocondriale interna genera un gradiente protonico che è utilizzato dall'enzima ATP-sintetasi per la catalisi dell'ADP in ATP, la quale molecola è trasportata dal traslocatore ADP/ATP attraverso la membrana mitocondriale interna. L'accoppiamento del consumo dei substrati alla sintesi di ATP è un processo

finemente regolato che, però, non è assoluto. Infatti, il disaccoppiamento dei due fenomeni porta alla genesi di calore. Il calore generato attraverso questo costituisce la “velocità metabolica basale” (BMR), che rappresenta il principale processo fisiologico influenzato dall’ormone tiroideo. Lo sviluppo di una condizione di ipertiroidismo nei vertebrati, è associata ad un aumento del BMR causato da un aumento del consumo di O_2 in moti tessuti, esclusi il rene, i testicoli ed il cervello degli adulti (Baker et Klitgaard, 1952). Dati presenti in letteratura indicano che la calorigenesi dipenda sia da un meccanismo di segnalazione a breve termine che vede coinvolta l’attivazione allosterica della citocromo ossidasi (Arnold et al., 1998; Moreno et al., 2002) da parte della T_3 e di una iodotironina da essa derivata, la 3,5-diiodotironina (3,5- T_2), sia da pathway biochimici a lungo termine caratterizzati dall’attivazione della trascrizione di geni mitocondriali mediata dall’ormone tiroideo (Oppenheimer et al., 1996; Goglia et al., 1999). Il meccanismo a lungo termine è caratterizzato dalla sintesi di enzimi coinvolti nel metabolismo energetico e componenti della catena respiratoria mitocondriale che portano ad una più alta capacità di fosforilazione ossidativa (Soboll, 1993; Videla LA, 2000). Il conseguente aumento della produzione di ATP è parzialmente bilanciato dalla concomitante diminuzione dell’efficienza della sintesi di ATP dovuto all’induzione di proteine disaccoppianti appartenenti alla classe delle UCPs da parte della T_3 (Lanni et al, 2003), con il conseguente aumento dell’uptake di O_2 mitocondriale.

Ormoni tiroidei e stress ossidativo

La relazione esistente tra la calorigenesi tiroidea e lo stress ossidativo è stata studiata in maniera molto approfondita (Videla LA, 2000) in accordo con la correlazione significativa tra il BMR e la potenziale perossidazione lipidica di diverse specie di mammifero (Cutler, 1985). Animali resi sperimentalmente ipertiroidei mostrano un aumento della termogenesi che è in accordo con l’aumento del consumo di O_2 da parte del fegato (Fernandez V et al., 1985). L’accelerazione della respirazione epatica durante la calorigenesi tiroidea porta ad un marcato aumento della produzione di superossido ($O_2^{\cdot-}$) da parte delle particelle sub mitocondriali in presenza di NADH (142%) e di succinato (152%), con velocità di produzione di perossido di idrogeno più alte sia in condizioni basali che in presenza di succinato e sia in assenza che in presenza di Antimicina, inibitore del flusso elettronico attraverso il Complesso III della catena respiratoria (Fernandez V e Videla LA, 1993). L’aumento della produzione di H_2O_2 si verifica anche nella transizione da stato ipotiroideo a stato ipertiroideo come funzione del contenuto dei carriers elettronici autossidabili (Venditti et al, 2003), effetto noto anche per una condizione di ipertiroidismo indotta dall’esposizione a freddo (Venditti P et al, 2004). Lo sviluppo di uno stato ipertiroideo nei ratti è associato ad una

proliferazione del reticolo endoplasmatico liscio, con una più alta attività della NADPH-Citocromo P450 reductasi (Tata JR et al., 1962; Ram et Waxman, 1992) e della NADPH ossidasi (Fernandez V et al., 1985). Il secondo enzima rappresenta l'attività ossidante del citocromo P450 responsabile della produzione di anione superossido e perossido di idrogeno (Goeptar et al., 1995). L'aumento dell'attività di questi enzimi, associata ad un aumento dell'attività del sistema della glucosio-6-fosfato deidrogenasi responsabile della produzione di NADPH (Simon-Giavarotti et al., 1998), sono responsabili dell'aumento della riduzione del citocromo P450 che si osserva nell'ipertiroidismo e che consente di spiegare:

- A) l'aumento dell'uptake di O_2 NADPH-dipendente e sensibile agli antiossidanti (Fernandez V et al, 1988)
- B) l'aumento dell'anione superossido dipendente dal NADPH (Fernandez V et al, 1985)
- C) l'aumento della biotrasformazione di una notevole varietà di xenobiotici (Videla LA, 2000)

Oltre alla capacità dei mitocondri e dei microsomi di fegato di rilasciare specie reattive dell'ossigeno (ROS), altri meccanismi sono coinvolti nella genesi di stress ossidativo, quali il sistema della xantina ossidasi (Huh et al, 1998) e della ossido-nitrico sintasi (NOS) che porta alla produzione di specie reattive dell'azoto (RNS) (Fernandez V et al, 1997). La produzione di ROS indotta dall'ormone tiroideo e dipendente da un aumento del consumo è associata ad una diminuzione del sistema di difesa antiossidante che si esplica come:

- A) riduzione dell'attività della superossido dismutasi (SOD) e della catalasi (Asayama et al, 1987; Fernandez V et al, 1988) probabilmente dovute ad una inattivazione degli enzimi indotta dalle ROS e dalle RNS prodotte
- B) deplezione del glutatione ridotto (GSH) (Fernandez V et al, 1988; Huh et al 1998), α -tocoferolo, β -carotene e licopeni (Simon-Giavarotti et al, 1998)

La deplezione del GSH, che rappresenta il maggiore danno epatico causato da una condizione di ipertiroidismo sia negli animali (Fernandez V et al, 1988, 1991; Huh e al, 1998) che nell'uomo (Sir et al., 1987), è determinata sia dalla carenza del tripeptide in circolo, sia da un più elevato catabolismo della molecola, nonostante l'aumento della velocità di sintesi del GSH e della velocità del turnover attivate nel tessuto epatico (Fernandez V et al., 1991; Fernandez V et Videla LA, 1996a).

In conclusione, la stretta dipendenza esistente tra la calorigenesi tiroidea, la respirazione epatica e la generazione di ROS/RNS (che si presenta per il 16-25% dell'aumento netto nella velocità totale del consumo di O₂ indotto dall'ormone tiroideo (Fernandez V et Videla LA, 1993b) induce una più alta attività pro-ossidante nel tessuto epatico. L'aumento dei radicali liberi indotto dalla T₃ è accompagnata da una diminuzione del sistema di difesa antiossidante che porta ad una condizione di stress ossidativo (Sies, 1986) che si realizza sia nel fegato che in altri tessuti in cui si osserva una risposta calorigenica (Videla LA, 2000).

Conseguenze funzionali dello stress ossidativo indotto dall'ormone tiroideo

A livello cellulare, lo stress ossidativo indotto dall'ormone tiroideo porta ad un ampio spettro di risposte che dipendono dal tipo cellulare, dalla quantità di ROS prodotte e dal tempo di esposizione alla fonte di stress (Martindale JL et al., 2002) e che si attuano attraverso cambiamenti molecolari associati a disfunzioni cellulari o a risposte adattative al danno. In particolare, in esperimenti effettuati su animali è riportato che:

- il danno a livello degli acidi grassi polinsaturi può essere evidenziato dall'aumento della perossidazione lipidica [(Derivati dell'acido tiobarbiturico (TBARS)] (Fernandez V et al., 1985; Venditti P et al., 1997) e della formazione degli idroperossidi (Landriscina, C et al., 1988) il danno a livello delle proteine dall'incremento degli idrazoni proteici (Tapia, G et al., 1999)
- il danno ossidativo a livello del DNA dall'aumento della 8-ossi-deossiguanosina (Andican, G et al., 2004).

Nell'uomo, l'ipertiroidismo è caratterizzato da cambiamenti significativi dei parametri legati allo stress ossidativo quali:

- aumenti dei TBARS (Videla L.A. et al., 1988; Ademoglu E et al., 1998; Bianchi G et al., 1999; Sewerynek J et al., 2000)
- aumenti dei livelli di dieni coniugati (Komosinska-Vessev K et al., 2000)
- aumenti dei livelli di perossido di idrogeno e dei prodotti della perossidazione lipidica (Bednarek J et al., 2004)
- una riduzione dei livelli di tioli (Wilson R et al., 1989; Adali M et al., 1999)
- una riduzione dei livelli di acido ascorbico (Ademoglu E et al., 1998)
- una riduzione dei livelli di α -tocoferolo (Bianchi G et al., 1999)
- una riduzione dei livelli di Coenzima Q (Bianchi G et al., 1999).

Le modificazioni appena descritte possono ritornare ai livelli di controllo se si effettua una terapia a base di tiroxina o o supplementata con antiossidanti.

Oltre al danno ossidativo a livello delle biomolecole epatiche, che può compromettere la loro funzionalità biologica, le ROS e le RNS possono anche rappresentare importanti molecole segnale nella regolazione di altre funzioni proteiche attraverso l'ossidazione reversibile e/o la nitrosazione di proteine sulfidriliche (Klatt P et Lamas S, 2000) in differenti cellule della sinusoide epatica (Tsukamoto H et Lin M, 1997; Martindale JL et Holbrook NJ, 2002) Il secondo meccanismo sembra essere mediato dalle ROS e i prodotti della perossidazione lipidica possono modulare chinasi, fosfatasi e/o fattori di trascrizione sensibili allo stato redox (Thannickal VJ et Fanburg BL, 2000; Poli G et al., 2004) .

Poche informazioni sono presenti in letteratura riguardo l'effetto del GC-1 e quindi, dell'attivazione recettoriale selettiva dell'isoforma β , sul consumo di O_2 , la produzione di specie reattive dell'ossigeno e il danno ossidativo ad essa conseguente, da parte di fegato, cuore e tessuto muscolare scheletrico, organi bersaglio dell'ormone tiroideo

Tironamine

Una nuova prospettiva sulla risposta agli ormoni tiroidei è scaturita negli ultimi anni dal lavoro condotto dal Prof. Zucchi in collaborazione con il Prof. Scanlan e il prof. Grandy su una particolare classe di molecole endogene derivate dall'ormone tiroideo, le tironamine, in grado di interagire con recettori di membrana accoppiati a proteine G, svolgendo azioni non genomiche. Gli effetti funzionali delle tironamine sembrano essere generalmente opposte rispetto a quelle dell'ormone tiroideo, prefigurandosi, così, come possibili molecole modulatrici delle azioni della T_3 .

Struttura

Le tironamine sono composti chimici derivati dalle tironine (TH) che rappresentano la principale forma chimica dell'ormone tiroideo. T_4 , la maggiore tironina secreta dalla ghiandola tiroidea e principale ormone tiroideo presente in circolo, è considerata solo un pro-ormone (Yen PM, 2001).

La deiodinazione enzimatica dell'anello esterno della T_4 porta alla formazione della T_3 , un ligando ad alta affinità per i recettori dell'ormone tiroideo. Invece, la deiodinazione enzimatica dell'anello interno produce la rT_3 , un metabolita della T_4 la cui funzione biologica non è ancora chiara, nonostante in individui sani siano state ritrovate in circolo eguali frazioni di T_3 e di rT_3 e in patologie non caratterizzate da disfunzioni tiroidee sia prodotta sostanzialmente più rT_3 che T_3 (Kohrle J, 2002; (Huang SA, 2005). Oltre alla T_3 ed alla rT_3 , in circolo e nei tessuti sono state ritrovati altri derivati deiodinati della T_4 tra quelli teoricamente possibili (Pittman CS, 1979). Le TH sono infatti aminoacidi la cui decarbossilazione porta alla formazione di una feniletilamina chiamata tironamina (TAM) (Figura 8).

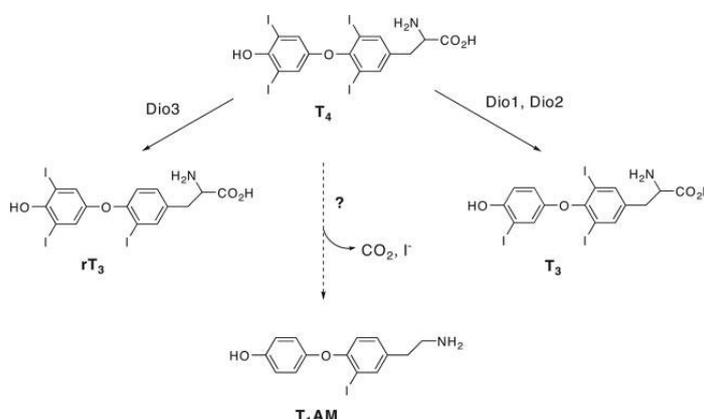


Figura 8. Struttura chimica delle tironine e delle tironamine. T_4 è convertita mediante reazioni di deiodinazione sia in T_3 che in rT_3 . T_1AM , la tironamina più studiata fino ad oggi, ha la stessa struttura

scheletrica della T₄ e teoricamente potrebbe essere sintetizzata a partire da quest'ultima tramite reazioni di deiodinazione e decarbossilazione.

Le THs e le TAMs sono designate con la sigla Tx e TxAM rispettivamente, dove la "x" sta ad indicare il numero di atomi di iodio per molecola. Come riportato in figura 9, esistono nove THs e nove TAMs che differiscono tra di loro per il numero e la posizione degli atomi di iodio (Piehl S et al., 2008).

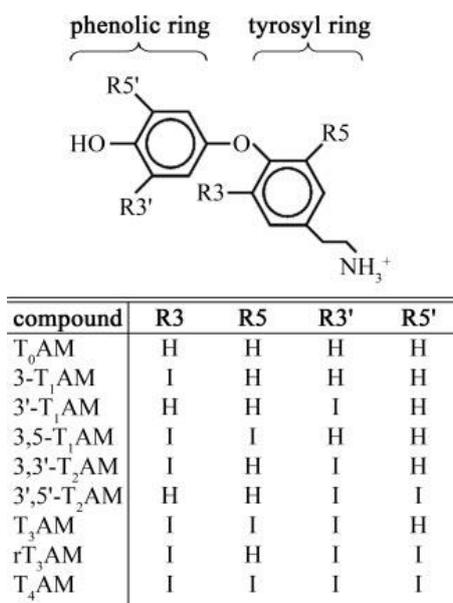


Figura 9. Struttura e nomenclatura delle tironamine

Distribuzione tessutale e concentrazioni delle tironamine

Finora solo due specie chimiche appartenenti alla classe delle tironamine sono state rilevate *in vivo* mediante una metodica cromatografica accoppiata a spettrometria di massa (LC-MS/MS): la 3-iodiotironamina (3-T₁AM) e la tironamina T₀AM (Scanlan TS et al., 2004; DeBarber AE et al., 2008).

Entrambi i composti sono stati ritrovati nel sangue, nel cuore, nel fegato, nel tessuto adiposo, nella tiroide, e nel cervello topi adulti maschi del ceppo C57BL/6 e nel cervello di altre specie come i ratti Long-Evans ed i maiali della guinea (Scanlan TS, et al 2004). 3-T₁AM è stata anche ritrovata nel sangue e nel cervello dei criceti Djungarian (Braulke LJ et al., 2008).

Finora non è stata ancora riportata in letteratura la presenza *in vivo* di altre tironamine. Scanlan e collaboratori (Scanlan et al., 2004), utilizzando la metodica LC-MS/MS, hanno monitorato

contemporaneamente la presenza di T₀AM, T₁AM e T₂AM, ma nessun isomero di quest'ultima è stato ritrovato in alcun tipo di tessuto. Per quanto riguarda T₃AM, invece, finora non è stata ritrovata in nessuna fonte biologica (Hillmann G et al., 1958; Meyer T et Hesch RD, 1983).

Dati presenti in letteratura che documentano esperimenti in cui si è stata effettuata una estrazione con butanolo e successiva cromatografia su carta, mostrano la presenza della tironamina T₄AM marcata con I₁₃₁ nel plasma e nella ghiandola tiroidea, ma non nelle frazioni tireoglobuliniche isolate dalla tiroide di ratti trattati con I radiattivo (Hillmann G et al., 1958). Inoltre, nel plasma di due pazienti affetti da tumori tiroidei metastatizzanti e trattati con elevate dosi di I₁₃₁, è stata ritrovata T₄AM marcata con Iodio radioattivo, ma non T₃AM. Queste osservazioni hanno permesso di concludere che T₄AM è presente in vivo in concentrazioni pari all'1-2% della concentrazione sierica della T₄ (Hillmann G et al., 1958; Hillmann G et Keil B, 1961). Comunque la biosintesi di T₄AM a partire da precursori endogeni contenenti iodio e non marcati radiattivamente non è stata ancora riportata in letteratura.

Oltre alla distribuzione tessutale, in letteratura sono riportati diversi lavori concernenti le concentrazioni tessutali delle tironamine. La concentrazione della 3-iodiotironamina (3-T₁AM) nel cervello di ratti Long-Evans è dell'ordine delle picomoli (Scanlan TS et al., 2004) e se comparata con le 6 pmol/g T₄ riportata per il cervello di ratto con la tecnica RIA, risulta molto più bassa (Pinna G et al., 2002). Questa incongruenza può trovare spiegazione nel fatto che la distribuzione delle tironamine è tessuto-specifica e che non si hanno abbastanza informazioni riguardo alla concentrazione di queste ultime nei vari organelli cellulari. Di conseguenza, la concentrazione effettiva all'interno di un tipo cellulare ed in uno specifico comparto cellulare può essere significativamente più alta rispetto a quella ritrovata nel tessuto in esame. Nel cuore di ratti maschi del ceppo Wistar, è stata ritrovata una concentrazione di 3-T₁AM pari a 68 pmol/g di tessuto fresco con un range di variazione compreso tra 1 e 120 pmol per peso (Chiellini G et al., 2007). E' da notare che il valore di 68 pmoli corrisponde alla quantità con cui sono presenti i modulatori della funzione cardiaca quali adrenalina, dopamina ed adenosina all'interno del cuore (Geraci T et al., 2008 abstract). Inoltre, tale quantità supera la concentrazione della T₃ e della T₄ del tessuto cardiaco rispettivamente di 20 e 2 volte (Geraci T et al., 2008 abstract). Anche se non è riportato se il cuore era stato perfuso o meno, questi dati indicano che nel tessuto cardiaco 3-T₁AM può annullare localmente le concentrazioni delle tironine. Nel siero del criceto Djungarian, 3-T₁AM sembra essere presente in quantità approssimativamente pari a 6 nM (Bräulke LJ et al., 2008).

Nel 2008, Geraci et al., utilizzando una metodica descritta da DeBarber et al. (DeBarber AE et al., 2008) hanno riportato le prime concentrazioni endogene della 3-T₁AM nei tessuti umani. Tali concentrazioni sembrano essere più alte nella tiroide, nel muscolo scheletrico, nel tessuto adiposo e

nella prostata con una concentrazione di circa 60 nM (n=2-5) e nel siero (n=16) (Geraci T et al., 2008 abstract).

Successivamente Wohlgemuth F. et al., (F. Wohlgemuth, C. S. Hoefig, et J. Kohrle, dati non pubblicati), utilizzando una metodica cromatografica pubblicata da Piehl et al. (Piehl S et al., 2008) hanno ritrovato nei tessuti di topo livelli di 3-T₁AM compresi tra 1-20 pmoli/g di peso. In realtà, in letteratura vi sono dati discordanti riguardo la rilevazione e la quantificazione della 3-T₁AM endogena a causa della grande affinità di quest'ultima per l'apolipoproteina B100 del siero umano che rende la concentrazione della 3-T₁AM libera estremamente bassa, con valori di circa 60 nM (Geraci T et al., 2008 abstract) o ancora più bassi (dati non pubblicati).

Di particolare interesse sembra essere il fatto che 3-T₁AM e T₀AM hanno affinità di legame maggiore per proteine diverse da quelle con cui si legano le tironine, ossia la transtiretina, l'albumina e la globulina di legame per T₄ (Benvenga S et al., 1988).

Comunque, in letteratura, non sono attualmente riportate metodiche LC-MS/MS e procedure di estrazione affidabili e riproducibili per la determinazione contemporanea dei profili delle tironine e delle tironamine nel sangue, nel siero o nel plasma.

Effetti sistemici e locali delle tironamine

Studi recenti presenti in letteratura riportano che l'iniezione intraperitoneale di 3-T₁AM o T₀AM in topi del ceppo selvatico C57BL/6 o nelle scimmie Djungarian provoca vari effetti immediati tra cui rallentamento del metabolismo, ipotermia, effetto cronotropo e ionotropo negativo, iperglicemia, riduzione del quoziente respiratorio (RQ), chetonuria e riduzione della massa grassa (Scanlan TS et al., 2004 ; DeBarber AE et al, 2008). Nella maggior parte degli studi è stata utilizzata una dose di 50mg/Kg peso corporeo di 3-T₁AM o di T₀AM (140 µmoli/Kg peso corporeo per 3-T₁AM e 218 µmoli/Kg peso corporeo per T₀AM). Nelle scimmie Djungarian questa dose porta ad un incremento della concentrazione nel sangue di 3-T₁AM di circa 10 volte, approssimativamente da 6 nM a 56 nM (Braulke LJ et al., 2008).

Attualmente, non è chiaro se i cambiamenti nelle concentrazioni ematiche e tissutali delle tironamine debbano essere considerati come fisiologici o farmacologici. Quindi, gli effetti delle tironamine descritte finora sono considerati come effetti farmacologici locali.

La maggior parte degli effetti farmacologici descritti per la 3-T₁AM sono stati rilevati nell'arco di pochi minuti dall'iniezione e mostrano approssimativamente lo stesso andamento temporale. Tuttavia, il picco del rallentamento del metabolismo, gli effetti cronotropo e ionotropo negativo, l'ipotermia, l'iperglicemia e la riduzione del quoziente respiratorio sono raggiunti rispettivamente a 5 minuti, meno di 10 minuti, 30 minuti, 2,5 ore e 3 o 4,5 ore dopo l'iniezione (Scanlan TS et al., 2004; Braulke LJ et al., 2008; Chiellini G et al., 2007). Inoltre, mentre la velocità metabolica, la funzionalità cardiaca, la temperatura corporea e i livelli di glucosio ematico si normalizzano nell'arco di 6-8 ore dopo l'iniezione, la riduzione del quoziente respiratorio è mantenuta per oltre 24 ore (Braulke LJ et al., 2008). Tuttavia, la chetonuria e la riduzione della massa grassa revertano molto più tardi se comparati con i sovramenzionati effetti acuti indotti dall'iniezione della 3-T₁AM.

Riduzione del metabolismo da parte di 3-T₁AM

L'iniezione intraperitoneale di 3-T₁AM in topi del ceppo selvatico C57BL/6 e in scimmie Djungarian causa un rallentamento del metabolismo misurato come diminuzione del V_{O2} da 2,5 a 1,8ml/g* ora nell'arco di 5 minuti (Braulke LJ et al., 2008).

Ipotermia

In letteratura è riportato che l'iniezione intraperitoneale di 3-T₁AM e T₀AM in topi del ceppo selvatico C57BL/6 riduce la temperatura corporea di circa 8°C nell'arco di 30 minuti dopo l'iniezione (Scanlan TS et al., 2004; Doyle KP et al., 2007; Dhillo WS et al., 2009).

Gli animali divengono inattivi ma continuano a conservare i riflessi a conferma del fatto che non subiscono anestesia. Inoltre, la loro pelle diviene fredda al tatto ma essi non mostrano alcuna reazione compensatoria come il brivido da freddo o la piloerezione. Tali effetti diventano completamente reversibili in un arco di tempo compreso tra 6 ed 8 ore e finora non è stato riportato alcun effetto collaterale anche dopo un periodo di trattamento per un periodo superiore a 2 mesi (Scanlan et al., 2004).

Sebbene meno pronunciato, l'effetto ipotermico è stato osservato anche nelle scimmie Djungarian dopo una iniezione intraperitoneale di 50 mg di 3-T₁AM/Kg peso corporeo (~140 µmoli) (Braulke LJ et al., 2008). Sia nei topi del ceppo selvatico C57BL/6 che nelle scimmie Djungarian, il picco dell'ipotermia indotta da 3-T₁AM (30 minuti) è preceduto da un picco nel rallentamento del metabolismo (5 minuti) (Braulke LJ et al., 2008). Poiché il grado di ipotermia ed il rallentamento del metabolismo sono altamente correlati, l'effetto ipotermico è interpretato come risultato dell'abbassamento del metabolismo corporeo (Braulke LJ et al., 2008).

L'ipotermia e gli effetti sul metabolismo indotti dalla somministrazione intraperitoneale di 3-T₁AM nel topo del ceppo selvatico C57BL/6 sono accompagnati da una bradicardia reversibile (Scanlan et al., 2004). L'effetto massimo viene raggiunto a distanza di un'ora dall'iniezione, quando la frequenza cardiaca scende da 600 ad approssimativamente 350 battiti al minuto e regredisce nell'arco di 6-8 dall'iniezione. L'effetto cronotropo negativo è stato studiato ex vivo su cuori isolati da ratti adulti e ripperfusi con un mezzo contenente concentrazioni crescenti di 3-T₁AM. Tale studio riporta che 3-T₁AM riduce la frequenza cardiaca in un minuto mostrando un IC₅₀ pari a 38 micromolare. Tale effetto persiste durante tutta la durata dell'esperimento (60 minuti) e scompare nel momento in cui la tironamina viene rimossa dal mezzo di riperfusione (Chiellini G et al., 2007). Inoltre, 3-T₁AM risulta ancora più potente nel ridurre la gittata cardiaca di cuori di ratto ripperfusi (IC₅₀ 29 micromolare). L'effetto inotropo negativo massimo è raggiunto dopo 10 minuti dall'iniezione e in accordo con l'effetto cronotropo negativo, quest'ultimo perdura per tutta la durata dell'esperimento (1 ora) (Scanlan TS et al., 2004) e viene annullato dall'allontanamento della tironamina dal mezzo di riperfusione (Chiellini G et al., 2007). Tale studio riporta, quindi, che 3-T₁AM è in grado di esplicare contemporaneamente effetto inotropo e cronotropo negativo sul cuore con potenza diversa e ciò è da tenere molto in considerazione dato che attualmente sono stati

identificati poche molecole con attività inotropica negativa, come l'IL-6 e il fattore TNF-alfa (Chiellini G et al., 2007). Nello stesso lavoro è, inoltre, riportato che che 3-T₁AM è anche in grado di inibire tutti i parametri misurati misurati ex-vivo su cuori isolati e denervati, quali la pressione arteriosa misurata in sistole (Scanlan TS et al., 2004) ed il flusso coronarico (Chiellini G et al., 2007).

Altri studi condotti su cuori isolati mostrano che una concentrazione di 3-T₁AM 20 µM riduce la contrattilità cardiaca ma non altera né l'uptake di glucosio né il consumo di ossigeno (Ghelardoni S et al., 2009).

La riduzione del consumo di ossigeno si può osservare solo con una concentrazione di 3-T₁AM pari a 25 µM. La tecnica del patch clamp condotta su miociti cardiaci di ratti adulti ha permesso di rilevare una alterata omeostasi del potassio e del calcio, inclusa una diminuzione delle riserve di quest'ultimo all'interno del reticolo sarcoplasmatico (Ghelardoni S et al., 2009). L'alterata omeostasi del calcio potrebbe essere la principale causa sia degli effetti cronotropo e inotropo negativi che dell'aumentata resistenza al danno da ischemia che 3-T₁AM esogena provoca su preparati cardiaci.

Effetto cronotropo negativo di T₀AM

Studi presenti in letteratura riportano per T₀AM una diminuzione della gittata cardiaca di cuori di ratto isolati e riperfusi, ma alcun effetto sulla frequenza cardiaca (Scanlan TS et al. 2004). Poiché tale effetto non è abolito se i cuori vengono stimolati, si è concluso che, a differenza di 3-T₁AM, T₀AM ha solo effetto inotropo negativo, ma non cronotropo negativo (Chiellini G et al., 2007). In realtà, in letteratura sono riportati dati molto discordanti riguardo gli effetti cardiaci di T₀AM, per cui non è possibile raggiungere una conclusione unanime.

Iperglicemia

Oltre all'ipotermia e alla riduzione del metabolismo osservata nei topi del ceppo selvatico C57BL/6, è stato ritrovato che l'iniezione intraperitoneale di una dose di 3-T₁AM pari a 50mg/Kg di peso corporeo (~140 µmoli) provoca un significativo aumento dei livelli di glucosio plasmatici (Regard JB et al., 2007). L'iperglicemia viene rilevata già dopo un minuto e dopo la somministrazione, raggiunge il picco massimo del 250% dopo due ore e scompare completamente a 8 ore

dall'iniezione. Tale effetto è anche accompagnato da una diminuzione dei livelli plasmatici di insulina ed un aumento di quelli del glucagone. La somministrazione esogena di insulina a distanza di due ore dall'iniezione normalizza i livelli di glucosio nel sangue permettendo così di concludere che i tessuti periferici continuano a conservare una sensibilità all'ormone durante il trattamento con 3-T₁AM (Regard JB et al., 2007).

In uno studio più recente è riportato che una iniezione intraperitoneale di 50 mg di T₀AM/Kg peso corporeo (~218 µmoli) in ratti porta ad un aumento delle concentrazioni plasmatiche di glucosio e di glucagone, sebbene in misura minore rispetto a quello indotto da 3-T₁AM (Klieverik LP et al., 2009).

Riduzione del quoziente respiratorio

La somministrazione intraperitoneale di 3-T₁AM induce nell'arco di un minuto una riduzione del quoziente respiratorio da 0.9 a 0.7 sia nel topo del ceppo selvatico C57BL/6 che nella scimmia Djungarian (Braulke LJ et al., 2008). Sembra, dunque, evidente che tale tironamina è in grado di indurre un cambiamento nell'utilizzazione dei substrati energetici dai carboidrati, predominati prima del trattamento, ai lipidi, che diventano il principale substrato dopo l'iniezione di 3-T₁AM (Braulke LJ et al., 2008). La riduzione massima del quoziente respiratorio viene raggiunta dalle 3 alle 4,5 ore dal trattamento e permane per più di 24 ore. Il ritorno del quoziente respiratorio nel range di normalità non è, però, subito accompagnato dal ritorno alla normotermia ed alla normalizzazione della funzionalità cardiaca, che si realizzano, al contrario, molto dopo. Ciò indica che il trattamento richiede diverse ore affinché il macchinario metabolico ritorni ai normali processi catabolici (Braulke LJ et al., 2008).

Chetonuria e riduzione della massa grassa

Il dato descritto in precedenza, secondo cui la somministrazione intraperitoneale di 3-T₁AM induce una variazione nell'utilizzo dei substrati metabolici, è confermato da due osservazioni. Anzitutto, nelle urine delle scimmie Djungarian sono stati ritrovati corpi chetonici in un arco di tempo compreso da 8 a 28 ore dopo il trattamento (Braulke et al., 2008). In secondo luogo, nelle scimmie acclimatate al caldo [lungo fotoperiodo (LP)] ed in quelle acclimatate al freddo [breve fotoperiodo

(SP)] si osservano una riduzione della massa grassa da 1 a 4 e 6 giorni, rispettivamente (Braulke et al., 2008).

Effetti centrali della somministrazione di 3-T₁AM e T₀AM

Un recente studio, in cui veniva comparato l'effetto della somministrazione intraperitoneale regolare di una dose di 50mg/Kg di peso corporeo di 3-T₁AM e di T₀AM, con l'infusione intracerebroventricolare di una dose delle due tironamine 100 volte più bassa (0.5mg/Kg peso corporeo) ha messo in evidenza un effetto sul metabolismo del glucosio periferico molto più pronunciato nel secondo caso in ratti maschi del ceppo Wistar (Klieverik LP et al., 2009). Tale osservazione ha permesso di concludere che 3-T₁AM e di T₀AM sono responsabili di un'azione centrale in grado di influenzare la mobilitazione dei depositi epatici di glucosio ed il suo metabolismo. Gli studiosi hanno suggerito una stimolazione da parte delle due tironamine del tono simpatico sulle isole pancreatiche. Inoltre, le proiezioni simpatiche e parasimpatiche possono attivare la produzione di glucosio. Infatti, per spiegare l'aumento della concentrazione sierica di corticosterone ritrovata negli stessi esperimenti, è stato anche ipotizzato un effetto diretto delle due tironamine (effetto più marcato per 3-T₁AM e meno pronunciato per T₀AM) sull'attivazione dell'asse ipotalamo-ipofisi-ghiandola surrenale. Al contrario, sebbene l'iniezione intraperitoneale di 3-T₁AM e di T₀AM induca una riduzione delle concentrazioni plasmatiche di TSH, T₄ e T₃, l'iniezione intracerebroventricolare di quantità più basse di tironamine non induce cambiamenti nella concentrazione di questi ultimi.

Un altro studio recente, ha dimostrato che l'iniezione diretta di 3-T₁AM nel nucleo arcuato di roditori, causa un aumento di circa 3 volte dell'intake di cibo, suggerendo che l'effetto oressigenico della tironamine, non è dovuto al dispendio energetico, ma è regolato dai livelli ormonali ipotalamici (Dhillon WS et al., 2009). Invece, l'iniezione intraperitoneale o intracerebroventricolare di basse dosi di 3-T₁AM (4 e 1.2µmoli/Kg di peso corporeo rispettivamente) in ratti o topi, causa un significativo aumento dell'intake di cibo senza influenzare il consumo di ossigeno e l'attività muscolare. Utilizzando alte dosi di 3-T₁AM (50mg/Kg di peso corporeo, ~127 µmoli) è stato confermato, inoltre, la riduzione del consumo di ossigeno e dell'attività dell'apparato muscolare riportati in precedenti lavori (Scanlan TS et al., 2004). L'aumentato intake di cibo che si osserva negli esperimenti condotti in vivo può trovare spiegazione in un significativo aumento del rilascio

del neuropeptide Y, così come è stato dimostrato dalla stimolazione con 3-T₁AM di ipotalami espianati.

Inibizione dei trasportatori delle monoamine

La scoperta che le tironamine sono presenti anche nel cervello e la loro affinità strutturale con le molecole segnale monoaminiche e le ammine in traccia (Snead AN et al., 2007) ha indotto diversi studiosi ad indagare sulle interazioni tra le tironamine ed i trasportatori per le monoamine, allo scopo di chiarire i meccanismi associati agli effetti in vivo di 3-T₁AM e T₀AM.

In sistemi di espressione eterologhi, tutte le tironamine, ad eccezione di rT₃AM, inibiscono l'attività dei trasportatori per la dopamina (DAT) localizzati sulle membrane plasmatiche umane e di ratto. Allo stesso modo, tutte le tironamine, ad eccezione di T₄AM, inibiscono il trasportatore vescicolare di tipo 2 per le monoamine (VMAT₂), che non è localizzato sulle membrane plasmatiche ma sulle membrane delle vescicole intracellulari. Al contrario, il trasportatore per la serotonina, localizzato sulla membrana plasmatica delle cellule umane e di ratto, è inibito selettivamente dalla 3,3'-T₂AM, ma non è influenzato dalle restanti TAMs. Invece, il trasportatore per l'epinefrina legato alla membrana plasmatica delle cellule umane (NET) mostra attivazione da parte di diverse TAMs ed inibizione da parte di altre, compresa 3-T₁AM. In questi sistemi di espressione eterologa, 3-T₁AM inibisce DAT, VMAT₂ e NET a concentrazioni micromolari e con una cinetica di natura competitiva. Sia nei sistemi di espressione eterologa sopra citati, che nei preparati di vescicole sinaitiche o sinaptosomiali, 3-T₁AM non è substrato né di DAT, né di VMAT₂ né di NET, e quindi essa rappresenta la sola fenilettilamina endogena oggi nota in grado di inibire VMAT₂ non essendo suo substrato. Se comparate tra loro, le tironamine e le ammine biogene presenti in traccia, sono entrambe in grado di inibire i trasportatori per le monoamine a concentrazioni paragonabili dell'ordine micromolare (Snead AN et al., 2007). La capacità delle tironamine di inibire DAT e NET, che può portare ad un accumulo intracellulare delle monoamine, e la capacità di inibire VMAT₂, che d'altro canto può portare ad una deplezione delle riserve di neurotrasmettitori e alla successiva riduzione di ulteriori molecole monoaminiche di segnalazione, può chiaramente avere una notevole rilevanza fisiologica (Snead AN et al., 2007).

Recettori delle tironamine

L'affinità strutturale delle tironamine con le tironine e le amine biogene ha suggerito che le tironamine potessero innescare dei processi di trasduzione del segnale interagendo con i recettori nucleari per gli ormoni tiroidei o con i recettori per le amine biogene. D'altro canto, l'osservazione che le tironamine fossero in grado di indurre la rapida insorgenza di alcuni effetti indicati come "non genomici", già aveva fatto pensare che esse fossero in grado di innescare dei processi di segnalazione cellulare molto più rapidi, che non coinvolgessero necessariamente i recettori per gli ormoni tiroidei (Buu-Hoi NP et al., 1966).

Il primo recettore ad essere stato studiato in tal senso, è stato il recettore accoppiato a proteine G TAAR-1 (Scanlan et al., 2004). Tale conclusione trovava supporto nel fatto che 3-T₁AM, 3,3'-T₂AM, T₃AM e T₀AM erano in grado di indurre l'accumulo intracellulare di cAMP in cellule del tipo HEK-293 trasfettate con TAAR-1 di ratto (Scanlan et al., 2004). La successiva analisi delle relazioni struttura-attività condotta su mutanti singoli e doppi di ratto e di topo per TAAR-1 in cellule HEK-293 ha messo in evidenza un'affinità di legame del ligando tessuto-specifica per diverse tironamine rispetto a 3-T₁AM. Punti critici per l'affinità di legame del ligando erano l'elica transmembrana 4 e 7 di TAAR-1 per entrambe le specie (Tan ES et al., 2009). Data la notevole affinità strutturale delle tironamine e delle amine biogene, la presenza del trascritto di TAAR-1 in tessuti bersaglio delle tironamine come cuore (Chiellini G et al., 2007), cervello (Zucchi R et al., 2006) e pancreas (Regard JB et al., 2007), ha fatto supporre che quest'ultimo fosse un buon candidato per 3-T₁AM e T₀AM (Dhillon et al., 2009). Questa conclusione è stata ulteriormente supportata dall'osservazione che analoghi sintetici di 3-T₁AM che mostravano una capacità comparabile se non più alta di 3-T₁AM nell'attivare TAAR-1, inducevano anche ipotermia dopo iniezione intraperitoneale in topi (Hart ME et al., 2006).

L'idea secondo cui T₁AM era in grado di innescare meccanismi di trasduzione del segnale attraverso la stimolazione di una proteina G stimolatoria è stato però modificata in studi successivi condotti da Scanlan (Scanlan TS et al., 2004) secondo cui solo 3-T₁AM e 3,5-T₂AM indurrebbero un aumento della concentrazione intracellulare di cAMP a valori di concentrazioni nanomolari, mentre tutte le altre tironamine sarebbero in grado di innescare l'aumento del mediatore chimico solo a concentrazioni di 1 micromolare o meno. Allo stesso modo, la ri-perfusione di cuori isolati di ratto con 3-T₁AM non induce un aumento dei livelli intracellulari di cAMP, sebbene siano stati ritrovati trascritti per diverse isoforme del recettore TAAR (Chiellini G et al., 2007). Inoltre, l'isoproterenolo, che è un agonista dei recettori α -adrenergici, è in grado di revertire gli effetti inotropo e cronotropo negativi indotti dalla 3-T₁AM in cuori di ratto ri-perfusi (Scanlan TS et al.,

2004). In accordo con tale dato, T₃AM, 3,5-T₂AM e T₀AM inibiscono la sintesi di cAMP in eritrociti di tacchino che sono stati stimolati con isoproterenolo (Cody V et al., 1984). Un altro lavoro presente in letteratura riporta che 3-T₁AM non ha alcun effetto sui livelli di glucosio ematico e sui livelli sierici di insulina in un modello di topo knockout per un recettore accoppiato ad una proteina Ginibitoria di cellule β del pancreas (Regard JB et al., 2007). In conclusione, gli effetti cronotropo e inotropo negativi, l'ipotermia e l'iperglicemia sembrano trovare una spiegazione più plausibile in una inibizione dell'accumulo di cAMP attraverso l'attivazione di una proteina Ginibitoria che attraverso un effetto su una proteina G stimolatoria.

Un altro potenziale recettore in grado di mediare gli effetti di 3-T₁AM potrebbe essere il recettore α-adrenergico di tipo 2 (Adra2A), che risulta essere espresso in molti tipi cellulari, incluse le cellule pancreatiche di tipo β (Regard JB et al., 2007; Bylund DB et al., 1988). Studi in vitro hanno dimostrato che 3-T₁AM ha una affinità di legame per Adra2A più elevata rispetto all'epinefrina (Regard et al., 2007). Inoltre, la somministrazione contemporanea a topi wild-type di 3-T₁AM e ioimbina, un antagonista del recettore Adra2A, ha l'effetto di inibire l'iperglicemia indotta da 3-T₁AM (Regard JB et al., 2007).

Attualmente, si è propensi a ritenere che i recettori Adra2A e TAAR-1 collaborino nel mediare gli effetti di 3-T₁AM sul metabolismo dei carboidrati. Infatti, in letteratura è riportato che, se da un lato 3-T₁AM è in grado di inibire il rilascio di insulina indotto dal glucosio da cellule pancreatiche di tipo β, d'altro canto essa è anche in grado di stimolare la secrezione di insulina nella linea cellulare dell'insulinoma MIN6 (Regard JB et al., 2007). Sembra che il ruolo contrastante svolto dalla tironamina sia legato al fatto che i recettori Adra2A, maggiormente espressi nelle cellule pancreatiche di tipo β, sono accoppiati ad una proteina G di tipo inibitoria, mentre TAAR-1, che è maggiormente espresso nella linea cellulare MIN6, provoca l'attivazione di una proteina G stimolatoria.

Biosintesi, metabolismo e trasporto delle tironamine

Nonostante le tironamine abbiano una struttura e caratteristiche fisico-chimiche simili alle tironine, esse sono in grado di mediare effetti, quali l'ipotermia e l'effetto cronotropo e inotropo negativo, che per certi versi sono opposti a quelli indotti dall'ormone tiroideo (Scanlan TS, 2009). Per questo motivo, è stato suggerito che le tironamine siano derivati degli ormoni tiroidei in grado di regolare finemente gli effetti di questi ultimi ed in alcuni casi di antagonizzarli (Liggett SB, 2004). Tuttavia,

finora non sono stati ancora ritrovati enzimi decarbossilanti in grado di rimuovere la catena laterale dell'alanina dagli ormoni tiroidei, presupposto fondamentale per la biosintesi delle tironamine (Scanlan et al., 2009), sebbene vi siano evidenze dal 1974 che T_4 può essere un substrato della decarbossilasi degli aminoacidi aromatici (Cody V et al., 1984; Dratman MB, 1974).

Altri enzimi coinvolti nella sintesi delle tironamine sembrano essere le deiodinasi, enzimi in grado di rimuovere atomi di iodio dai loro substrati (Kohrle J, 2002).

Dati presenti in letteratura riportano che la deiodinasi di tipo 1 (Dio1) è in grado di catalizzare la deiodinazione dell'anello fenolico di rT_3AM , $3',5'$ - T_2AM e $3,3'$ - T_2AM e la deiodinazione dell'anello tirosilico di T_3AM e $3,5$ - T_2AM . Tali reazioni sono completamente inibite dal propil-tio-uracile, un inibitore specifico per Dio1. Anche Dio2 è in grado di deiodinare rT_3AM e $3',5'$ - T_2AM , ma non è inibita dal propiltiouracile. Infine, tutte le tironamine caratterizzate dalla presenza di atomi di iodio sull'anello tirosilico sono deiodinate da Dio3 (Piehl S et al., 2008).

Sembra anche che $3-T_1AM$ e T_0AM , che sono presenti in vivo, e T_3AM siano oggetto di reazioni di solfatazione catalizzate da isoforme delle sulfotrasferasi (SULT) isolate da fegato, cuore e cervello umano (Pietsch CA et al., 2007) e di deaminazione ossidativa della catena laterale di metilamina che le convertirebbe negli acidi tiroacetici corrispondenti (Wood WJ et al., 2009).

Entrambe le reazioni sembrano avere rilevante importanza nel metabolismo delle tironamine ed insieme al ruolo individuato per le deiodinasi e a quello putativo per le decarbossilasi, la solfatazione e la deaminazione ossidativa confermerebbero il pathway biosintetico attualmente accettato per $3-T_1AM$ (Piehl S et al., 2008).

Recentemente è stato scoperto che $3-T_1AM$ può essere trasportata all'interno di diversi tipi cellulari tramite meccanismi di trasporto specifici che possono andare incontro a saturazione o essere inibiti (Ianculescu AG et al., 2009).

Tuttavia, l'analisi di varie famiglie di trasportatori solubili non ha consentito di individuare quello specifico per $3-T_1AM$ e attualmente si accetta che tale putativo trasportatore sia pH-dipendente, indipendente dal sodio e dal cloro e specifico per diverse tironamine (Ianculescu AG et al., 2009).

Nel complesso, i dati presenti in letteratura suggeriscono che T_1AM debba essere considerato come un nuovo messaggero chimico dal momento che è una sostanza endogena, interagisce con recettori specifici e produce effetti biologici. Dato che le risposte funzionali a T_1AM sembrano essere in generale opposte a quelle prodotte dall'ormone tiroideo, questa sostanza potrebbe svolgere un ruolo omeostatico nella trasduzione del segnale tiroideo. Per valutare l'importanza e l'eventuale rilievo per la patologia umana, appare però necessario caratterizzare i suoi effetti su processi biologici fondamentali, quali il metabolismo energetico.

Scopo della tesi

Alla luce delle conoscenze attualmente presenti in letteratura, progetto di ricerca del mio dottorato è stato quello di approfondire gli studi riguardo le modalità di azione dell'ormone tiroideo e le sue funzioni biologiche, valutando anzitutto gli effetti dell'attivazione selettiva dell'isoforma recettoriale β da parte dell'agonista GC-1 sulla funzionalità respiratoria tessutale e mitocondriale di tessuti bersaglio della T_3 . In questo modo è stato possibile discriminare gli effetti del $TR\beta$ dal $TR\alpha$ sul consumo di ossigeno e produzione di specie reattive da parte di fegato, cuore e tessuto muscolare scheletrico isolati da ratti. L'analisi dei meccanismi di azione del GC-1 a livello sub-cellulare può risultare utile anche nel chiarire il potenziale ruolo terapeutico dell'agonista nel trattamento di vari disordini quali obesità, dislipidemie ed ipercolesterolemia, malattie ampiamente radicate nel mondo occidentale, per le quali, secondo quanto è noto in letteratura, il GC-1 potrebbe rappresentare un buon candidato farmacologico. È stato così comparato l'effetto della T_3 e del GC-1 su ratti resi ipotiroidei sperimentalmente e trattati con inibitori delle deiodinasi in modo che i livelli sierici di ormone tiroideo dipendessero esclusivamente dalla loro somministrazione e non dalla conversione enzimatica di T_4 in T_3 . Le modificazioni metaboliche sono state studiate misurando il consumo di ossigeno e l'attività dei complessi respiratori della catena di trasporto mitocondriale, in modo da poter stabilire il contributo dei complessi a differenze riscontrate in seguito ai differenti trattamenti. In particolare, l'attività in vitro della citocromo ossidasi (Complesso IV della catena respiratoria) è correlata al massimo consumo di ossigeno cosicché essa è utilizzata come una misura della capacità metabolica aerobica dei preparati tissutali. Inoltre, il rapporto tra le attività delle citocromo ossidasi negli omogenati e nei mitocondri fornisce una stima approssimativa del contenuto di proteine mitocondriali nei tessuti. Poiché eventuali differenze nel contenuto di proteine mitocondriali e nell'attività respiratoria dei tessuti sono correlate con i livelli di espressione dei fattori di trascrizione nucleare NRF-1 e NRF-2, e del coattivatore PGC-1, sono stati valutati anche i livelli di espressione dei fattori mediante metodica Western Blotting. La successiva valutazione del rilascio del perossido di idrogeno in assenza ed in presenza di inibitori, al fine di individuare eventuali variazioni sui siti coinvolti nella produzione di ROS, e la valutazione degli indici di danno ossidativo, ha permesso di avere un quadro completo dell'attivazione dei $TR\beta$ sulla produzione di ROS da parte della catena respiratoria mitocondriale e sul danno prodotto da queste ultime a livello di macromolecole biologiche. È stato così possibile chiarire, da un lato, il meccanismo di azione mediato dall'ormone tiroideo mediante l'attivazione preferenziale dei $TR\beta$ a livello mitocondriale e, dall'altro lato, avere informazioni più approfondite sui meccanismi di azione adottati dal GC-1, al fine di poter valutare il suo potenziale utilizzo come agente terapeutico.

In secondo luogo, è stato interessante valutare l'effetto della somministrazione in vitro delle tironamine T₀AM e T₁AM sulle capacità aerobiche e produzione di ROS da parte di mitocondri isolati da ratti. Anche in questo caso il modello sperimentale utilizzato è stato l'animale ipotiroideo, in quanto caratterizzato da bassi livelli serici e tissutali di ormone tiroideo, per cui eventuali differenze riscontrate in seguito al trattamento in vitro con le tironamine è stato attribuito esclusivamente all'azione di queste ultime. Tale modello mi ha permesso, quindi di valutare in tutti gli esperimenti effetti non genomici di derivati dell'ormone tiroideo. Ancora una volta sui preparati mitocondriali sono state valutate le variazioni a carico del metabolismo aerobico e la produzione di ROS mediante l'analisi del consumo di ossigeno e dell'attività dei complessi della catena respiratoria nel primo caso, e la velocità di rilascio del perossido di idrogeno in presenza di inibitori nel secondo caso. E' stato così possibile determinare se, oltre alla T₃, anche i suoi derivati potessero esplicare funzioni a livello mitocondriale rendendo così ancora più fine e complesso il meccanismo di regolazione dell'ormone tiroideo. Inoltre, gli esperimenti effettuati hanno anche consentito di testare il potenziale effetto terapeutico delle tironamine, in quanto attualmente esse rappresentano il solo composto endogeno in grado di indurre ipotermia come trattamento profilattico o acuto degli infarti causando minori effetti collaterali dei composti sintetici.

Materiali e metodi

Materiali

Tutti i prodotti chimici utilizzati (Sigma Chimica, Milano, Italia) erano al più alto grado di purezza. I livelli serici delle due iodotironine libere (FT₃ e FT₄) sono stati determinati attraverso l'utilizzo di Kits RIA (DiaSorin, Salluggia, Italia), mentre i livelli di colesterolo serico sono stati misurati utilizzando un kit commerciale (Pokler Italia, Genova, Italia).

Animali

Gli esperimenti sono stati effettuati su ratti maschi del ceppo Wistar di settanta giorni di età, forniti dalla ditta Nossan (Correzzana, Italia) ad un'età di quarantacinque giorni. A partire dal quarantanovesimo giorno gli animali sono stati casualmente suddivisi in quattro gruppi:

1. Ratti eutiroidei di controllo (**C**)
2. Ratti ipotiroidei (**H**)
3. Ratti ipotiroidei trattati con T₃ (**H+T₃**)
4. Ratti ipotiroidei trattati con GC-1 (**H+GC-1**)

Nei ratti ipotiroidei l'attività della tiroide e delle deiodinasi sono state inibite mediante iniezione per via intraperitoneale di PTU (1mg/100g di peso corporeo, una volta al giorno per tre settimane), unita alla somministrazione di acido iopanoico (IOP), (5mg/100g di peso corporeo) effettuata dopo 10, 13, 16, 19 e 21 giorni dalla prima iniezione di PTU. Gli altri animali, sottoposti allo stesso trattamento dei ratti ipotiroidei, hanno subito una iniezione intraperitoneale con dosi equimolari di T₃ o di GC-1 (15.36 nmol/100g di peso corporeo, una volta al giorno per i dieci giorni antecedenti il sacrificio). Tutti i ratti sono stati stabulati nelle medesime condizioni ambientali, ad una temperatura ambientale di 24°C, con un ciclo di illuminazione artificiale di 12 ore di luce e 12 ore di buio e alimentati con la stessa dieta standard, fornita dalla ditta Nossan. L'utilizzo degli animali per gli esperimenti riportati in questa tesi è stato in accordo con le linee guida dettate dall'University's Animal Care Review Committee ed è avvenuto sotto il controllo di personale veterinario qualificato.

Preparazione del tessuto

Dopo un digiuno di 12 ore, durato tutta la notte, gli animali sono stati sottoposti ad una misura della velocità metabolica a riposo (RMR) attraverso un sistema calorimetrico a circuito aperto (Panlab Gas Analyzer LE 405, Madrid Spagna). Prima del sacrificio gli animali sono stati anestetizzati con cloralio idrato (40mg/100gr di peso corporeo) e sottoposti ad una registrazione elettrocardiografica, come precedentemente esposto (Valente M et al., 1995). Da ciascun animale sono stati prelevati campioni di sangue arterioso al fine di valutare i livelli plasmatici di triiodotironina (FT₃) e tiroxina (FT₄) libere e di colesterolo.

Gli animali sono stati sacrificati mediante decapitazione previa anestesia con etere ed i tessuti epatico, cardiaco e muscolare scheletrico (gastrocnemio) sono stati rapidamente rimossi e posti in bekers tenuti in ghiaccio, contenenti un mezzo di omogeneizzazione (HM) (mannitolo 220mM, saccarosio 70mM, EDTA 1 mM, albumina serica bovina 0.1% priva di acidi grassi liberi, Tris 10 mM, a pH 7.4).

Alcuni frammenti di fegato sono stati tagliati e usati successivamente per allestire un western blotting. Successivamente gli organi sono stati privati del tessuto connettivo, pesati, tagliuzzati finemente e lavati con HM. Infine, i frammenti così ottenuti sono stati delicatamente omogeneizzati nella stessa soluzione (20% p/v) utilizzando un omogeneizzatore di vetro Potter-Elvehjem ad una velocità standard di 500 rpm per un minuto. L'omogenato tissutale dei tre tessuti è stato utilizzato per le procedure analitiche e, parte del preparato epatico è stata utilizzata per l'isolamento delle frazioni mitocondriali.

Preparazione delle frazioni mitocondriali

Gli omogenati di fegato, diluiti 1:1 con HM, sono stati privati dei nuclei e dei residui mediante una centrifugazione a 500g per 10 minuti a 4°C, in seguito alla quale è stato prelevato il supernatante, che, dunque, è stato centrifugato 10000g per 10 minuti a 4°C. Il pellet contenente i mitocondri è stato risospeso in un tampone di lavaggio (WB) contenente mannitolo 220 mM, saccarosio 70 mM, EGTA 1 mM, Tris 20 mM, ad un pH di 7.4, e centrifugato alla stessa velocità di sedimentazione per due volte. Infine i mitocondri sono stati risospesi in WB ed utilizzati per le procedure analitiche dopo aver determinato il contenuto proteico dei preparati, mediante il metodo del biuretto (Gornall AG et al., 1949)

Consumo di ossigeno

La respirazione tessutale e mitocondriale è stata monitorata a 30°C mediante l'utilizzo di un respirometro Gilson, dotato di elettrodo di Clark per l'ossigeno. Tale sonda bipolare consta di un catodo (elettrodo registratore), costituito da un filo di platino, e un anodo d'argento (elettrodo di riferimento) che chiude il circuito. L'elettrodo è ricoperto da uno strato di soluzione satura di cloruro di potassio e da una membrana di teflon, permeabile all'O₂ ma non agli ioni e all'acqua. Esso è alloggiato in una camera di vetro di piccole dimensioni (circa 2 mL), in cui viene posta la soluzione con il campione di cui si vuole misurare il consumo di O₂ (**Figura 9**).

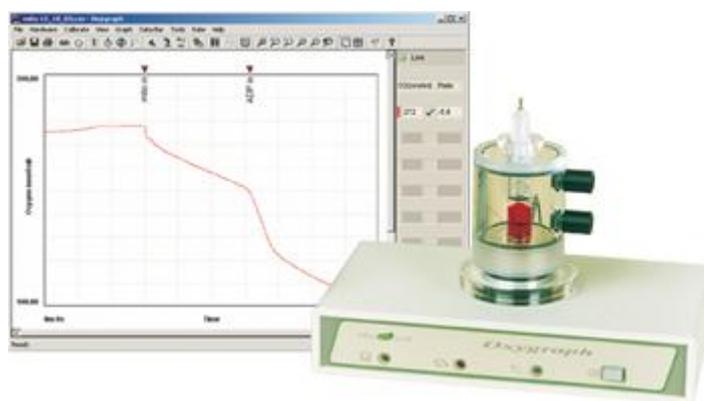


Figura 8. Ossigrafo.

La miscela di reazione utilizzata per il dosaggio è costituita da 1 mL di soluzione di incubazione (KCl 145 mM, HEPES 30 mM, KH₂PO₄ 5 mM, MgCl₂ 3 mM, EGTA 0.1 mM, a pH 7.4) contenente albumina serica bovina allo 0.1%, cui sono aggiunti 0.05 grammi di tessuto o 0.2 mg di proteine mitocondriali epatiche per ml. L'aggiunta del campione provoca una rapida riduzione della concentrazione di O₂, presente in camera, dovuto al consumo dei substrati endogeni (**Fase 1 della respirazione**). Una volta che lo strumento si è stabilizzato e la curva presenta un andamento costante, è possibile aggiungere un substrato ossidabile in eccesso. Il consumo di O₂ registrato in questa fase, definita **Fase 2**, è dovuto al fatto che la membrana mitocondriale interna non è completamente impermeabile ai protoni ed una certa aliquota riesce a passare nella matrice (leak protonico) anche se i mitocondri sono integri. I substrati utilizzati negli esperimenti da me effettuati sono stati: i) il succinato (10mM), più rotenone 5 µM (inibitore del complesso I), che produce equivalenti riducenti FADH₂ ossidati a livello del complesso II e ii) il piruvato/malato (10/2.5 mM), che producono equivalenti riducenti NADH ossidati a livello del complesso I. In seguito, al mezzo di reazione è aggiunto ADP (500µM) che provoca un rapido e brusco aumento del consumo di

ossigeno (**Fase 3 della respirazione**), che perdura fin quando l'ADP non viene completamente consumato. Nell'ultima fase (**Fase 4 della respirazione**) si ritorna lentamente alla velocità caratteristica della fase 2.

Il valore del “rapporto del controllo respiratorio” (**RCR**), fornito dal rapporto tra la fase 3 e la fase 4 della respirazione ed è un indice dell'integrità dei mitocondri. Infatti, un danno della membrana mitocondriale porta ad aumento della velocità del consumo di O₂ nella fase 4 e ad una conseguente riduzione di tale indice.

L'utilizzazione dei due substrati (succinato o piruvato/malato) permette di stabilire se una modificazione del consumo di ossigeno è legata ad una alterazione dei diversi complessi della catena respiratoria. La diminuzione del consumo di O₂ osservata in mitocondri respiranti in presenza della miscela di piruvato e malato, fornisce informazioni riguardo eventuali alterazioni indotte dai trattamenti a carico del Complesso I (NADH deidrogenasi), del Complesso III o del Complesso IV. Allo stesso modo, modificazioni del consumo di ossigeno in presenza di succinato possono essere attribuite ad una alterazione del Complesso II (succinato deidrogenasi) o dei Complessi III e IV. Alterazioni del Complesso IV della catena respiratoria possono essere evidenziate misurando il consumo di ossigeno in presenza di un substrato che cede gli elettroni direttamente al citocromo c.

Negli esperimenti effettuati in presenza di tironamine, i preparati mitocondriali sono stati incubati per 10 minuti a temperatura ambiente con 10 µl di dimetilsolfossido (DMSO) o DMSO e T₁AM o T₀AM. La concentrazione finale del DMSO, che in esperimenti precedenti aveva dimostrato di non interferire con la velocità del consumo di ossigeno, rappresenta lo 0,02% del volume, mentre le concentrazioni finali delle tironamine utilizzate sono comprese tra 10⁻⁹ e 10⁻⁵M. I risultati ottenuti sono stati espressi come µmoli O/min/g di tessuto e nmoli O/min/mg proteine mitocondriali.

Attività dei complessi della catena respiratoria

L'attività dei complessi respiratori I, II e III è stata misurata mediante uno spettrofotometro DU 640 utilizzando il metodo di Regan (Regan MT et al., 1987), mentre l'attività del Complesso IV della catena respiratoria è stata valutata mediante metodica polarografica a 30°C (Yellow Spring Instruments, Ohio USA) secondo la procedura di Barrè et al. (Barrè H et al. 1987). Per lo studio delle tironamine in vitro, le misure sono state effettuate utilizzando sospensioni mitocondriali contenenti lo 0,02% di DMSO in assenza ed in presenza di T₁AM o T₀AM aggiunte 10 minuti prima della lettura alla concentrazione finale di 10⁻⁵ M.

Complesso I

Il dosaggio che più fedelmente riflette l'attività biologica del Complesso I è la riduzione rotenone-sensibile degli analoghi dell'ubichinone, dei quali il più usato è l'ubichinone 1.

Nel dosaggio sono inclusi fosfolipidi, che hanno l'effetto di stimolare la velocità di riduzione dell'ubichinone 1 rotenone-sensibile, influenzando la sua ripartizione tra i lipidi e la fase acquosa.

Il dosaggio è stato effettuato utilizzando le seguenti soluzioni: tampone fosfato K_2HPO_4 10 mM pH 8 in H_2O dd; NADH 5 mM in bicarbonato di sodio 0.1%; lecitina in deossicolato al 2%; CoQ1 10 mM in etanolo e sospensioni mitocondriali 10 mg/mL diluite in tampone fosfato.

In cuvette di quarzo sono stati aggiunti 950 μ L di tampone fosfato, 20 μ L di NADH, 20 μ L di lecitina e 5 μ L di sospensione mitocondriale, opportunamente diluita con tampone fosfato.

Le soluzioni così preparate sono state incubate per un minuto a temperatura ambiente, dopodiché sono stati aggiunti 5 μ L CoQ1 al fine di innescare la reazione. Il dosaggio è stato effettuato a 30°C per 3 minuti.

La cinetica della reazione è stata seguita mediante una riduzione dell'assorbimento a 340 nm, lunghezza d'onda a cui assorbe il NADH ossidato. L'attività del complesso I è espressa in μ moli di NADH ossidato/minuto/mg di proteine mitocondriali, ed i valori sono stati ottenuti dividendo le variazioni di assorbanza per il coefficiente di estinzione molare del NADH (6.81 mM/cm), la durata della reazione (3 minuti) e la concentrazione di proteine mitocondriali (0.05 mg/mL).

Complesso II

L'attività del complesso II è stata determinata dalla velocità di riduzione dell'ubichinone 2 da parte del succinato. Per evitare i possibili problemi connessi con la misura spettrofotometrica diretta della quantità di ubichinone ridotto, è stata seguita la riduzione secondaria di un colorante da parte dell'ubichinolo formatosi.

Il dosaggio è stato effettuato utilizzando le seguenti soluzioni: tampone fosfato K_2HPO_4 1 M pH 7.4; succinato di sodio 1 M pH 7.4; EDTA 10 mM pH 7.3; H_2O dd; 2,6-diclorofenilindofenolo 4.65 mM; ubichinone2 2.25 mM in etanolo e sospensioni mitocondriali 10 mg/mL diluite in tampone fosfato.

In cuvette di vetro sono stati aggiunti 50 μ L di Tampone, 20 μ L di succinato, 10 μ L di EDTA, 920 μ L di H_2O dd fino a raggiungere un volume finale di 1mL. Le soluzioni così preparate sono state

incubate per qualche minuto a temperatura ambiente, dopodiché sono stati aggiunti 16 μL di 2,6-diclorofenilindofenolo, 20 μL di Ubichinone2, 5 μL di sospensione mitocondriale ed è stata eseguita la cinetica a 30° C per 3 minuti.

La cinetica della reazione è stata seguita mediante una diminuzione dell'assorbimento a 600 nm, lunghezza d'onda a cui assorbe il colorante, che viene ridotto dall'ubichinolo formatosi a partire dall'ubichinone in seguito alla riduzione innescata dal succinato. L'attività del complesso II è, dunque, espressa in μmoli di colorante ridotto/minuto/mg di proteine mitocondriali. I valori sono stati ottenuti dividendo la variazione di assorbanza per il prodotto tra il coefficiente di estinzione molare del 2,6-diclorofenilindofenolo (21 mM/cm), la durata della reazione (3 minuti) e la concentrazione di proteine mitocondriali (0.05 mg/mL).

Complesso III

L'attività del Complesso III è stata valutata spettrofotometricamente seguendo la velocità di riduzione del citocromo c da parte dell'ubichinolo 2.

Per effettuare questo dosaggio bisogna ridurre l'ubichinolo 2 secondo la seguente procedura:

- Sciogliere 10 μmoli di ubichinone2 in 1 mL di etanolo ed acidificare a pH 2 con HCl 6 M
- Aggiungere qualche granulo di boro idruro di sodio (NaBH_4) ed 1 mL di H_2O per ridurre il chinone (giallo) in chinolo (incolore)
- Mescolare sotto agitazione la soluzione con 3 mL di etere/cicloesano (2:1 v/v)
- Raccogliere la fase superiore e mescolare sotto agitazione con 1 mL di NaCl 2M
- Raccogliere nuovamente la fase superiore e fare evaporare sotto flusso di azoto
- Dissolvere il residuo in 1 mL di etanolo acidificato a pH 2 con HCl

Il dosaggio è stato effettuato utilizzando le seguenti soluzioni: tampone fosfato K_2HPO_4 50 mM pH 7.4; EDTA 0.1 M; Citocromo c 1 mM; ubichinolo2 e proteine mitocondriali 4 mg/mL diluite in KCN 50 mM (la cui peculiarità è quella di bloccare la citocromo ossidasi).

In cuvette di vetro sono stati aggiunti 930 μL di fosfato di potassio, 10 μL di EDTA, 50 μL di citocromo c; le soluzioni così preparate sono state incubate per qualche minuto a 30° C, dopodiché sono stati aggiunti 5 μL di sospensione mitocondriale. L'ulteriore aggiunta di 5 μL di ubichinolo2 promuove l'innescamento della reazione e la cinetica è eseguita a 30° C per 3 minuti.

La reazione viene seguita osservando una diminuzione dell'assorbimento a 550 nm, lunghezza d'onda a cui assorbe il citocromo c ridotto. L'attività del complesso III è, dunque, espressa in μmoli

di citocromo ridotto/minuto/mg di proteine mitocondriali, ed i valori sono stati ottenuti dividendo la variazione di assorbanza per il prodotto tra il coefficiente di estinzione molare del citocromo c (20 mM/cm), la durata della reazione (3 minuti) e la concentrazione di proteine mitocondriali (0.02 mg/mL).

La misura è stata ripetuta in assenza dell'enzima contenuto nel campione per tenere conto della riduzione enzimatica del citocromo.

Complesso IV

La COX è l'enzima terminale della catena respiratoria, in grado di ridurre l'O₂ ad H₂O rimuovendo gli elettroni dal citocromo c ridotto (Fe⁺²-eme), che è ossidato a Fe⁺³-eme. L'attività della COX è stata determinata polarograficamente a 30°C, usando un respirometro Gilson di vetro fornito di un elettrodo di Clark per l'ossigeno (Yellow Springs Instruments, Ohio, USA), attraverso una procedura messa a punto da Barrè et al. (1987). L'attività della COX in vitro è stata direttamente correlata al massimo consumo di ossigeno (Simon LM et al., 1971), per cui essa può essere usata come misura della massima capacità aerobica di preparati biologici.

Campioni di omogenato (1:5 p/v)) sono stati diluiti con eguale volume di soluzione Chappel-Perry (ATP 1mM, KCl 100 mM, MgCl₂ 5 mM, EDTA 1 mM, EGTA 5 mM) ottenendo in tal modo degli omogenati alla concentrazione di 1 g/10 ml. Questi ultimi sono stati mescolati a uguali volumi di una soluzione Chappel-Perry contenete Lubrol alla concentrazione di 10 mg/ml ed incubati per 30 minuti a 0°C per smascherare l'attività dell'enzima.

Per determinare l'attività della COX nei mitocondri, le sospensioni mitocondriali, a concentrazione proteica nota, sono state inizialmente diluite in soluzione Chappel-Perry. Ai campioni così diluiti è stato aggiunto un volume di una soluzione di Lubrol (1,5 mg/ml) in soluzione Chappel-Perry in modo da avere 0,25 mg di lubrol per mg di proteine mitocondriali. I campioni sono stati poi incubati a 0°C per mezz'ora. La quantità di sospensione mitocondriale da utilizzare nella determinazione è stata calcolata tenendo conto che nella camera di reazione deve essere presente una concentrazione finale di 0,2 mg/ml di proteine mitocondriali.

Per valutare l'attività della COX è necessario, in presenza di citocromo c in eccesso, bloccare gli altri tre complessi della catena respiratoria usando specifici inibitori. Nella camera di

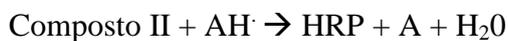
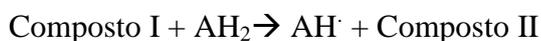
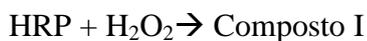
reazione del respirometro, infatti, è stato introdotto 1 ml di una soluzione contenente citocromo c 30 μM , rotenone 4 μM (inibitore del complesso I), 2-4 dinitrofenolo 0,5mM (disaccoppiante della fosforilazione ossidativa), Na-malonato 10 mM (inibitore della succinato deidrogenasi), Hepes 75 mM, a pH 7,4, cui sono stati aggiunti 20 μl del campione di omogenato (contenenti 0,001g di tessuto) o 0,2 mg di proteine mitocondriali.

Dopo la stabilizzazione dello strumento, nella camera di reazione sono stati aggiunti 15 μl di soluzione contenente Na-ascorbato 400 mM e tetrametilparafenildiammina (TMPD) 30 mM come substrato in grado di ridurre il citocromo c.

L'attività della COX è stata espressa come $\mu\text{mol O}/\text{min}/\text{g}$ di tessuto o come $\mu\text{mol O}/\text{min}/\text{mg}$ di proteine mitocondriali. Il rapporto tra l'attività della COX tessutale e quella mitocondriale ha fornito una valutazione approssimata del contenuto in mg di proteine mitocondriali per grammo di tessuto dei campioni in esame (Venditti P et al., 1996).

Rilascio mitocondriale di H_2O_2

Allo scopo di valutare quantitativamente il rilascio mitocondriale di H_2O_2 da parte di enzimi citoplasmatici o di organuli cellulari (mitocondri, perossisomi e microsomi) esistono diverse tecniche analitiche che sfruttano le proprietà delle Perossidasi di Rafano (HRP). Questo enzima catalizza l'ossidazione di numerosi substrati donatori di idrogeno (AH_2) in presenza di H_2O_2 , secondo le reazioni:



I donatori di idrogeno utilizzati sono sostanze che diventano fluorescenti reagendo con il Composto I, o che perdono la fluorescenza in seguito a tale reazione.

Sostanze dotate di tali caratteristiche sono la diacetildiclorofluorescina o l'acido paraidrossifenilacetico (PHPA). Il loro utilizzo consente una valutazione del rilascio mitocondriale di perossido di idrogeno.

Nei miei esperimenti è stato utilizzato il PHPA per le sue ottime caratteristiche funzionali. Esso in forma ridotta non è fluorescente, ma in seguito ad ossidazione catalizzata dalla perossidasi di rafano (HRP), in presenza di H_2O_2 , si converte nel composto stabile 2, 2'-diidross-difenil-5,5'-

diacetato (PHPA)₂ (Hyslop PA et Sklar LA, 1984) che è fluorescente. La velocità di formazione di tale composto e quindi dell'aumento della fluorescenza, è strettamente associato alla velocità di rilascio di H₂O₂ da parte dei mitocondri. Per seguire la fluorescenza generata dalla reazione di ossidazione del PHPA è stato utilizzato un fluorimetro Jasko, dotato di una celletta termostata e collegato ad un computer. Le determinazioni sono state effettuate in cuvette di quarzo, contenenti un agitatore magnetico, alla temperatura di 30 °C, utilizzando una lunghezza d'onda di eccitazione di 320 nm ed una emissione di 400nm. La miscela di reazione contiene 0,1mg/mL di proteine mitocondriali disciolte in un tampone respirazione (KCl 145mM, MgCl₂ 3 mM, Hepes 30mM, EGTA 0,1mM, KH₂PO₄5mM, a pH 7.4 e BSA allo 0,1 %) contenente PHPA 0,2 mg/mL ed HRP 60 U/ mL. La reazione di produzione dell' H₂O₂ è stata innescata dall'aggiunta di una soluzione di Piruvato/Malato (10mM/ 2,5mM) o di succinato (10mM) e di una quantità saturante di ADP (500 µM). I valori delle concentrazioni di H₂O₂ sono stati ricavati usando una curva standard di concentrazioni note di H₂O₂ ed espressi come pmol H₂O₂/min/mg proteine. Vari inibitori del flusso elettronico attraverso la catena di trasporto mitocondriale sono comunemente utilizzati per ottenere informazioni sulle possibili alterazioni dei siti produttori di ROS. Infatti, la produzione di ROS dipende da due parametri: il primo è rappresentato dalla concentrazione dei carriers autossidabili localizzati nei complessi respiratori, mentre il secondo è rappresentato dal grado di riduzione di tali carriers. L'utilizzo di inibitori del trasferimento elettronico, rende tutti i carriers localizzati a monte del sito di blocco completamente ridotti, rendendo così dipendente la velocità di rilascio del perossido esclusivamente dalla concentrazione dei carriers autossidabili. Nei miei esperimenti ho utilizzato il Rotenone (Rot), che blocca il trasferimento degli elettroni dal Complesso I all'ubichinone (Palmer G et al., 1968), e l'Antimicina (AA) che blocca il trasferimento degli elettroni all'interno del sito ubichinone-citocromo b del Complesso III (Turrens JF et al., 1985).Le concentrazioni degli inibitori scelte per gli esperimenti (5µM Rot; 10µM AA) non interferiscono col sistema PHPA-HRP utilizzato (Venditti P et al., 2003).

Negli esperimenti effettuati in presenza di tironamine, i preparati mitocondriali sono stati incubati per 10 minuti a temperatura ambiente con 10 µl di dimetilsolfossido (DMSO) o DMSO e T₁AM o T₀AM. La concentrazione finale del DMSO, che in esperimenti precedenti aveva dimostrato di non interferire con la velocità del consumo di ossigeno, rappresenta lo 0,02% del volume, mentre le concentrazioni finali delle tironamine utilizzate sono comprese tra 10⁻⁹ e 10⁻⁵M.

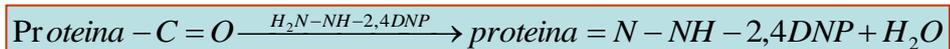
Per determinare la produzione di H₂O₂ dipendente dall'attività della monoaminossidasi (MAO), le velocità di rilascio sono state misurate su mitocondri incubati come precedentemente descritto, in assenza di substrati respiratori ed in presenza ed in assenza di pargilina, un inibitore sia della MAO A che della MAO B (Panova NG et al., 1997). Di conseguenza, il rilascio di perossido è stato

misurato sia durante lo stato 4 che durante lo stato 3 della respirazione in presenza ed in assenza di pargilina. Quando è stata utilizzata la pargilina, le sospensioni mitocondriali sono state pre-incubate 1h con pargilina 5µM.

Danno ossidativo alle proteine

Il danno ossidativo delle proteine è stato valutato utilizzando una procedura messa a punto da Reznick e Packer (Reznick AZ et Packer L, 1994). per quanto riguarda gli omogenati, e una procedura modificata da Schild et al., (Schild L et al., 1997) per quanto riguarda i mitocondri. La metodica utilizza come markers dell'ossidazione proteica i gruppi carbonilici (C=O) che si formano in seguito a ossidazione, da parte delle ROS, dei gruppi amminici delle catene laterali degli amminoacidi lisina, arginina, prolina ed istidina. Le reazioni ossidative sono catalizzate da cationi metallici come Fe²⁺ e Cu⁺, che si legano a specifici siti delle proteine.

La quantificazione dei gruppi carbonilici è effettuata con una metodica spettrofotometrica che consente di valutare i prodotti di reazione (idrazoni) della dinitrofenilidrazina (DNPH) con i gruppi carbonilici delle proteine:



Per ogni determinazione sono state utilizzate due aliquote del campione in esame, contenente ciascuna 0,5 mg di proteine mitocondriali. Tali proteine sono state precipitate in acido tricloroacetico (TCA) al 20%, centrifugate a 2500 rpm per 15 minuti a 4 °C, risospese in 150 µl di NaOH 0,1 M ed incubate a temperatura ambiente per 5 minuti. Ad una delle due aliquote sono stati aggiunti 1,5 ml di HCl 2,5 M (bianco), all'altra 1,5 ml di DNPH in HCl 2,5 M.

I preparati sono stati incubati per un'ora al buio a temperatura ambiente. La reazione è stata bloccata dall'aggiunta di 1,65 ml di TCA al 20% e i sedimenti, ottenuti per centrifugazione, sono stati lavati una volta con 1,5 ml di TCA al 10% e due volte con una miscela di etanolo/acetato di etile (1:1 v/v) e infine disciolti in 2 ml di idrocloruro di guanidina.

Per gli omogenati sono state utilizzate due aliquote del campione in esame, contenente ciascuna 0.5 ml di omogenato. Tali campioni sono stati diluiti 1:2 con un tampone fosfato 50 mM a pH 7.4 contenente digitonina allo 0,1,%, EDTA 1 mM e antiproteasi quali fenilmetilsulfonilmetile (PMSF) 40 µg/ml, aprotonina 5 µg/ml, leupeptina 5 mg/ml, pepstatina 7 µg/ml. Dopo incubazione

in ghiaccio per 15 minuti, i campioni sono stati centrifugati a 1550 rpm per 10 minuti, ed i supernatanti prelevati sono stati incubati a temperatura ambiente per 10 minuti con l'1% di streptomycina, per precipitare il DNA, e ricentrifugati a 1550 per 10 minuti. Successivamente ad una delle due aliquote sono stati aggiunti 4 ml di HCl 2,5 M (bianco), all'altra 4 ml di DNPH 10 mM in HCl 2,5 M. I preparati sono stati incubati per un'ora al buio a T ambiente. Si è bloccata la reazione con l'aggiunta di 5 ml TCA al 20% ed i sedimenti, ottenuti per centrifugazione, sono stati lavati una volta con 4 ml di TCA al 10%, tre volte con 4 ml di una miscela di etanolo/acetato di etile (1:1 v/v) e alla fine disciolti in 2 ml di idrocloruro di guanidina 6 M.

I prodotti di reazione della DNPH con i gruppi carbonilici delle proteine sono stati letti spettrofotometricamente a 355nm e 390 nm, per gli omogenati, e a 370 nm per i mitocondri. Il contenuto di carbonili è stato calcolato, utilizzando il coefficiente di estinzione molare degli idrazoni alifatici ($22 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) ed espresso come nmoli /mg di proteine.

Perossidazione lipidica

L'estensione dei processi perossidativi negli omogenati di fegato e nei preparati mitocondriali è stata determinata misurando il livello di idroperossidi lipidici (HPs), seguendo spettrofotometricamente il consumo di NADPH in un sistema di reazioni accoppiate (Heath RL et Tappel AL, 1976).

Il metodo è basato su due reazioni.

Nella prima, catalizzata dall'enzima glutatione perossidasi (GPX), il GSH reagendo con gli idroperossidi è ossidato a GSSG:



Nella seconda reazione, il glutatione ossidato viene riconvertito a GSH dall'enzima glutatione reduttasi (GR), che sfrutta il potere riducente del NADPH, ossidandolo a NADP^+ :



Le sospensioni mitocondriali sono state diluite con una soluzione tampone (EDTA 0,2 mM, Tris-HCl 0,124 mM a pH 7,6) in modo da avere una concentrazione di 1 mg di proteine per ml . Gli

omogenati di tessuto epatico, invece, sono stati diluiti 1:50 nel mezzo di omogenizzazione (mannitolo 220 mM, saccarosio 70 mM, EDTA 1 mM, Tris 20 mM, BSA allo 0.1% a pH 7,4).

In base alla procedura, 10 µl di campione sono stati incubati per 5 minuti a temperatura ambiente in 1 ml della stessa soluzione tampone utilizzata per diluire le sospensioni mitocondriali. Per innescare la prima reazione sono stati aggiunti in rapida successione 100 µl di GSH (4,25 mM), 50 µl di NADPH (2 mM), e 10 µl di GPX (2,5 U/ml). Le soluzioni così preparate sono state incubate a 33°C per 15 minuti. Successivamente, l'aggiunta di 10 µl dell'enzima GR (2,5 U/ml) ha innescato l'ultima tappa del processo in cui il NADPH viene ossidato a NADP⁺.

Le letture sono state effettuate a 340 nm, al fine di valutare le variazioni nella quantità di NADPH, per 15 minuti. La differenza tra l'assorbimento iniziale e quello finale, divisa per il coefficiente di estinzione molare del NADPH ($6,3 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), per in tempo della cinetica e la quantità di preparato, ci ha fornito informazioni sul contenuto tissutale e mitocondriale di idroperossidi espresso come nmoli di NADPH Ox/min/g di tessuto o pmoli di NADPH Ox/min/mg di proteine mitocondriali.

Determinazione dell'espressione delle proteine NRF-1, NRF-2 e PGC-1

SDS- Page

La prima fase nella determinazione dell'espressione delle proteine è costituita dalla separazione delle proteine mediante elettroforesi.

Le aliquote di fegato sono state omogeneizzate (diluizione 1:10) in NaCl 500 mM, nonidet P-40 allo 0.5%, EDTA 6 mM, EGTA 6 mM, ditiotreitolo 1 mM, Tris-HCl 40 mM, pH 8 in presenza di una miscela di antiproteasi contenente PMS 40 µg/mL, leupeptina 5 µg/mL, aprotinina 5 g/mL, pepstatina 7 g/ml. Gli omogenati sono stati centrifugati a 1000 g per 10 minuti a 4°C.

Il supernatante, su cui sono state preventivamente dosate le proteine presenti, è stato sottoposto a elettroforesi mediante SDS-PAGE utilizzando un gel di impaccamento di acrilamide al 6% e un gel di separazione al 12%, sul quale sono stati caricati 30 µg di proteine (**Figura 9**).

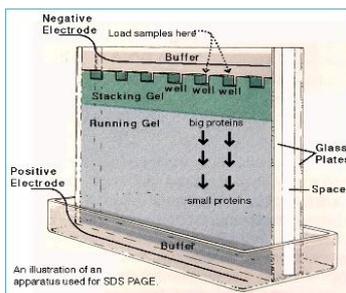


Figura 9. SDS Page

I campioni sono stati preparati diluendo 10 μ l di sospensione proteica, contenente 1.5 mg/mL di proteine, con 5 μ L di SDS al 3%, glicerolo al 30%, β -mercaptoetanololo al 15%, blu di bromofenolo allo 0.1%, Tris base 0.187 M, pH 6.8. I campioni sono stati bolliti per 5 minuti e dunque sono stati caricati sul gel 30 μ g di proteine mitocondriali. La corsa del gel è durata un'ora a voltaggio costante di 25 V.

Per visualizzare il quadro di separazione elettroforetica, alcuni gel sono stati fissati con isopropanolo al 25% e acido acetico al 10% e dunque colorati con la medesima soluzione contenente Coomassie G-250 allo 0.02%. La decolorazione è stata ottenuta agitando i gel per 48 ore in acido acetico al 10%.

Western blotting

La seconda fase della procedura per la determinazione dell'espressione delle proteine è costituita dal trasferimento delle proteine.

Le proteine epatiche, separate mediante elettroforesi, sono state trasferite dal gel su una membrana di nitrocellulosa tramite elettroblotting. Le membrane sono state precedentemente attivate in metanolo assoluto per 10 minuti, dunque sciacquate con acqua distillata e poste in una soluzione di trasferimento per gel, contenente metanolo al 10% e soluzione di trasferimento 1x (Tris-HCl 480 mM e glicina 390 mM). Le membrane sono state dunque incubate con anticorpi per PGC-1, NRF-1 e NRF-2 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) diluiti 1:1000, in NaCl 154 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 8.0, latte scremato al 2.5%, Tween20 al 10%. Il riconoscimento dell'anticorpo primario, ottenuto mediante interazione con un anticorpo secondario marcato con HRP, ha consentito la visualizzazione delle bande di interesse mediante l'impressionamento di una lastra fotografica dovuto alla conversione del luminolo in una sostanza fluorescente, reazione catalizzata dall'HRP in presenza di luminolo e perossido di idrogeno.

E' stata usata actina per standardizzare il caricamento delle proteine. Per confrontare i livelli di espressione delle proteine tra i vari gruppi, su ogni gel è stato fatto correre un campione standard ottenuto da un animale eutiroideo. Dunque i valori di ciascun gruppo sono stati comparati con il campione eutiroideo al quale è stato assegnato il valore 1.

Analisi statistica

I risultati sono stati espressi come valori medi \pm l'errore standard dei valori ottenuti da otto ratti in ogni gruppo. I dati sono stati analizzati con il metodo della varianza (ANOVA) . Quando è stato trovato un valore del rapporto F significativo , è stato usato il test “*Student-Newman-Keuls multiple range test*” per determinare la significatività statistica delle differenze tra le medie. I valori sono stati considerati significativi quando $P < 0.05$.

Risultati

Effetto dei trattamenti sui parametri corporei condizionati dallo stato tiroideo

Nella **tabella 1** è riportato l'effetto dei trattamenti sui parametri corporei condizionati dallo stato tiroideo. Interessante è l'osservazione che il rapporto peso cuore / peso corpo, la frequenza cardiaca e la velocità metabolica basale, sono incrementati da entrambi gli agonisti, ma in misura minore da GC-1 cosicché i valori ritrovati nel gruppo H+GC-1 non sono significativamente più alti rispetto al controllo eutiroideo. Inoltre, i livelli sierici di colesterolo sono significativamente più alti nei ratti ipotiroidei e sono riportati ai livelli di controllo nel trattamento con l'agonista. Come ci si aspettava, i livelli plasmatici di T₃ sono drasticamente ridotti dal trattamento con PTU+IOP ed aumentati nei ratti H+T₃ ma non nel gruppo H+GC-1. Al contrario, i livelli di FT₄ diminuiscono allo stesso modo in tutti i gruppi trattati.

PARAMETRI	GRUPPI		
	H	H+T ₃	H+GC-1
Peso corpo (g)	276.1±6.0	247.3±8.2 ^a	270.4±7.3 ^b
Peso cuore (g)	0.55±0.01	0.79±0.05 ^a	0.64±0.03 ^b
Peso cuore/Peso corpo (mg/g)	2.01±0.03	3.23±0.15 ^a	2.34±0.06 ^{a,b}
Frequenza cardiaca (battiti/min)	278±9	534±12 ^a	367±7 ^{a,b}
RMR (l O ₂ /kg·h)	1.01±0.03	1.57±0.01 ^a	1.12±0.03 ^{a,b}
Colesterolo (mg/dl)	64.4±2.2	41.6±1.9 ^a	45.6±1.6 ^a
FT ₃ (pg/dl)	25.5±5.1	571.0±57.5 ^a	26.4±4.9 ^b
FT ₄ (ng/dl)	0.33±0.04	0.39±0.04	0.30±0.03

Tabella 1. Effetto del trattamento con T₃ o GC-1 sui parametri corporei, frequenza cardiaca, velocità metabolica basale e livelli sierici di colesterolo e iodotironine libere.

I valori rappresentano la media±errore standard. Per ciascun valore è stato utilizzato un ratto. HW/BW = peso cuore/ peso corpo; HR = frequenza cardiaca; RMR = velocità metabolica basale; FT₃ and FT₄ = livelli sierici di triiodotironine e tiroxina libere rispettivamente.; ^a significativo rispetto al controllo eutiroideo; ^b significativo rispetto ai ratti ipotiroidei; ^c significativo rispetto ai ratti IPO+T₃. Il livello di significatività scelto è con P<0.05

Attività della citocromo ossidasi tessutale

In **Figura 1** è riportata l'attività della citocromo ossidasi dei tessuti epatico, cardiaco e muscolare scheletrico. In tutti i tessuti isolati da ratti ipotiroidei l'attività della COX è più bassa rispetto a quella dei ratti eutiroidei. Il trattamento dei ratti ipotiroidei con T_3 incrementa l'attività della COX in tutti i tessuti in modo tale che essa risulti significativamente più alta rispetto al controllo, sebbene nel tessuto muscolare, le differenze tra il controllo eutiroideo e gli animali ipotiroidei siano minori. Invece, il trattamento con GC-1 è associato ad una variazione dell'attività dell'enzima tessuto-specifica. Infatti, rispetto al controllo eutiroideo, l'attività dell'enzima è più alta nel fegato, più bassa nel cuore e non si riscontrano significative differenze per il muscolo scheletrico.

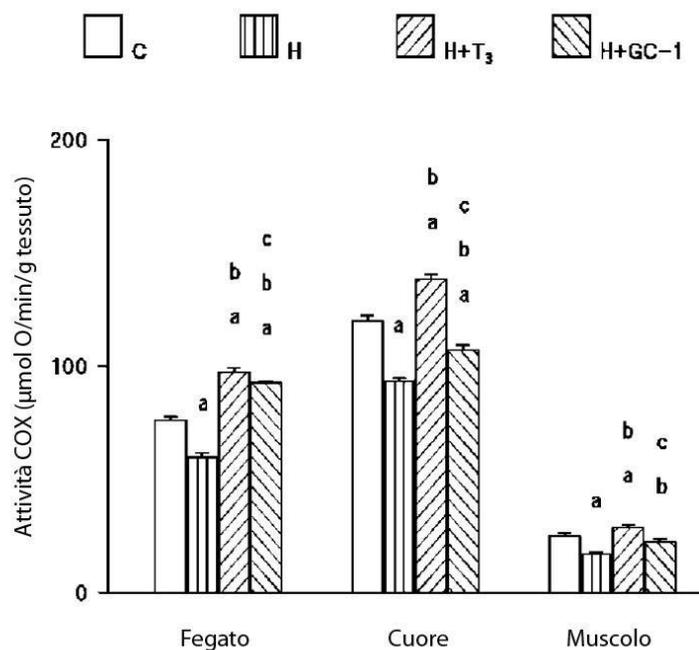


Figura 1: Attività della citocromo ossidasi tessutale (COX). I valori rappresentano la media±errore standard di otto differenti esperimenti. Per ciascun esperimento è stato utilizzato un ratto. L'attività della citocromo ossidasi è espressa come µmoli di O/minuto/grammo di tessuto. H ratti ipotiroidei; H+T₃ ratti ipotiroidei trattato con T₃; H+GC-1 ratti ipotiroidei trattato con GC-1; ^a significativo rispetto al controllo eutiroideo; ^b significativo rispetto ai ratti ipotiroidei; ^c significativo rispetto ai ratti IPO+T₃. Il livello di significatività scelto è con P<0.05.

Consumo di ossigeno tessutale

I dati sul consumo di ossigeno tessutale misurato in presenza di succinato sono riportati in **Tabella 2**. Nel fegato, le velocità del consumo di O_2 sono più basse rispetto al controllo sia durante lo stato 4 che durante lo stato 3 della respirazione. Al contrario, tali velocità sono incrementate dal trattamento con i due agonisti in entrambi gli stati della respirazione con velocità più alte nel gruppo H+T₃. I valori dell'RCR sono più alti nel gruppo H+T₃, mentre i più bassi sono stati misurati per i gruppi H e H+GC-1. Nel cuore, il trattamento con IOP+PTU riduce la velocità del consumo sia durante lo stato 4 che durante lo stato 3 della respirazione, mentre si osservano aumenti in entrambi gli stati della respirazione nei ratti trattati con T₃. Il trattamento con GC-1 non provoca aumenti significativi e la velocità del consumo di ossigeno resta più bassa rispetto al controllo eutiroideo durante lo stato 4. I valori dell'RCR non sono significativamente modificati dal trattamento con l'agonista. Nel muscolo scheletrico la respirazione risulta più bassa sia durante lo stato 4 che durante lo stato 3 nei ratti ipotiroidei. Invece, entrambi i trattamenti con gli agonisti inducono un aumento degli stati della respirazione ma in misura diversa, sicchè i valori rimangono più alti nei preparati H+T₃. I valori dell'RCR sono più alti nel gruppo H+T₃ rispetto ai restanti.

I dati sul consumo di O_2 misurato in presenza di piruvato/malato è riportato in **Tabella 3**. Nel fegato, ancora una volta il trattamento con IPO+PTU induce una riduzione della velocità del consumo in entrambi gli stati della respirazione mentre il trattamento con gli agonisti induce un aumento della respirazione. Sebbene i cambiamenti siano maggiori nei trattati con T₃, sia i preparati H+T₃ che H+GC-1 mostrano velocità del consumo di O_2 più alte rispetto al gruppo di controllo. I valori dell'RCR non sono influenzati dai trattamenti. Nel cuore, sia lo stato 4 che lo stato 3 della respirazione sono ridotti dal trattamento con IOP+PTU e non subiscono significative variazioni nel trattamento con GC-1. Al contrario, il trattamento con T₃ induce un aumento della respirazione, ma solo lo stato 3 è significativamente più alto del controllo eutiroideo. I valori dell'RCR non sono influenzati dai trattamenti. Nel muscolo scheletrico, il trattamento con IOP+PTU riduce la velocità del consumo di ossigeno in entrambi gli stati della respirazione mentre il trattamento con i due agonisti influenza le misure in modo diverso. Infatti, non si riscontrano significative differenze tra il controllo eutiroideo ed i ratti trattati con GC-1, mentre il trattamento con T₃ induce aumenti significativi in entrambi gli stati della respirazione. I valori dell'RCR sono differenti nei gruppi C, H ed H+GC-1 e sono più alti nel gruppo H+T₃

TESSUTO		GRUPPO			
		C	H	H+T ₃	H+GC-1
FEGATO	State 4	2.62±0.08	2.40±0.06 ^a	4.38±0.08 ^{a,b}	3.74±0.08 ^{a,b,c}
	State 3	11.64±0.29	8.84±0.25 ^a	24.79±0.48 ^{a,b}	14.23±0.16 ^{a,b,c}
	RCR	4.6±0.3	3.5±0.2 ^a	5.8±0.2 ^{a,b}	3.8±0.1 ^{a,c}
CUORE	State 4	4.87±0.17	3.72±0.07 ^a	6.43±0.10 ^{a,b}	3.91±0.05 ^{a,c}
	State 3	11.46±0.51	10.17±0.16 ^a	14.11±0.11 ^{a,b}	10.65±0.30 ^c
	RCR	2.4±0.2	2.7±0.2	2.2±0.1	2.7±0.1
MUSCOLO	State 4	State 4	1.92±0.06	1.63±0.04 ^a	2.66±0.08 ^{a,b}
	State 3	State 3	4.12±0.09	3.58±0.21 ^a	6.55±0.10 ^{a,b}
	RCR	RCR	2.1±0.1	2.2±0.1	2.5±0.1 ^a

Tabella 2. Effetto del trattamento con T₃ o GC-1 di ratti ipotiroidei sul consumo di O₂ supportato da succinato da omogenati di tessuto. I valori rappresentano la media±errore standard di otto differenti esperimenti. Per ciascun esperimento è stato utilizzato un ratto. Le velocità del consumo di O₂ sono espresse come µmol O minuto/grammo di tessuto. H ratti ipotiroidei; H+T₃ ratti ipotiroidei trattato con T₃; H+GC-1 ratti ipotiroidei trattato con GC-1; ^a significativo rispetto al controllo eutiroideo; ^b significativo rispetto ai ratti ipotiroidei; ^c significativo rispetto ai ratti IPO+T₃. Il livello di significatività scelto è con P<0.05.

TESSUTO		GRUPPO			
		C	H	H+T ₃	H+GC-1
FEGATO	State 4	0.88±0.03	0.66±0.04 ^a	1.58±0.03 ^{a,b}	1.21±0.05 ^{a,b,c}
	State 3	2.76±0.22	1.98±0.05 ^a	5.49±0.05 ^{a,b}	3.75±0.08 ^{a,b,c}
	RCR	3.1±0.1	3.0±0.2	3.5±0.3	3.1±0.2
CUORE	State 4	1.36±0.05	0.92±0.02 ^a	1.49±0.06 ^b	1.02±0.02 ^{a,c}
	State 3	5.85±0.22	4.38±0.05 ^a	6.46±0.16 ^{a,b}	4.81±0.20 ^{a,c}
	RCR	4.3±0.3	4.7±0.3	4.3±0.2	4.8±0.1
MUSCOLO	State 4	0.48±0.01	0.38±0.01 ^a	0.59±0.02 ^{a,b}	0.50±0.01 ^{b,c}
	State 3	2.00±0.11	1.57±0.05 ^a	2.94±0.07 ^{a,b}	2.14±0.04 ^{b,c}
	RCR	4.2±0.2	4.1±0.3	5.0±0.2 ^{a,b}	4.3±0.2 ^c

Tabella 3. Effetto del trattamento con T₃ o GC-1 di ratti ipotiroidei sul consumo di O₂ supportato da piruvato/malato da omogenati di tessuto. I valori rappresentano la media±errore standard di otto differenti esperimenti. Per ciascun esperimento è stato utilizzato un ratto. Le velocità del consumo di O₂ sono espresse come µmol O minuto/grammo di tessuto. H ratti ipotiroidei; H+T₃ ratti ipotiroidei trattato con T₃; H+GC-1 ratti ipotiroidei trattato con GC-1; ^a significativo rispetto al controllo eutiroideo; ^b significativo rispetto ai ratti ipotiroidei; ^c significativo rispetto ai ratti IPO+T₃. Il livello di significatività scelto è con P<0.05.

Danno ossidativo tessutale

I dati ottenuti (Tabella 4) mostrano che il trattamento con PTU e IOP riduce i livelli di idroperossidi e di carbonili legati a proteine come markers di danno ossidativo a lipidi e proteine rispettivamente in tutti e tre i tessuti. Il successivo trattamento con T₃ induce un aumento significativo rispetto all'eutiroideo e all'ipotiroido di entrambi i parametri. Invece, GC-1 provoca un danno minore rispetto al trattamento con l'ormone tiroideo, col risultato che in tutti e tre i tessuti i livelli di idroperossidi e di carbonili sono più alti rispetto all'ipotiroido, ma solo nel fegato sono più alti anche rispetto all'eutiroideo.

TESSUTO	PARAMETRI	GRUPPO			
		C	H	H+T3	H+GC-1
FEGATO	HPs	1.12±0.04	0.97±0.03 ^a	2.26±0.06 ^{a,b}	1.47±0.05 ^{a,b,c}
	CO	2.14±0.06	1.51±0.06 ^a	2.75±0.12 ^{a,b}	1.82±0.03 ^{a,b,c}
CUORE	HPs	0.22±0.01	0.19±0.01	0.30±0.02 ^{a,b}	0.25±0.01 ^{b,c}
	CO	1.47±0.08	1.24±0.03 ^a	2.52±0.11 ^{a,b}	1.64±0.03 ^{b,c}
MUSCOLO	HPs	0.20±0.01	0.14±0.01 ^a	0.24±0.02 ^{a,b}	0.18±0.01 ^{b,c}
	CO	1.59±0.06	1.41±0.04 ^a	2.04±0.08 ^{a,b}	1.71±0.04 ^{b,c}

Tabella 4. Effetto del trattamento con T₃ o GC-1 di ratti ipotiroidi sul danno ossidativo di tessuti di ratto. I valori rappresentano la media±errore standard di otto differenti esperimenti. Per ciascun esperimento è stato utilizzato un ratto. I livelli di idroperossidi (HPs) sono espressi come pmoli di NADP per minuto per grammo di tessuto; i livelli di carbonili legati a proteine (CO) sono espressi in nmoli per mg di proteine. C ratti di controllo; H ratti ipotiroidi; H+T3 ratti ipotiroidi trattato con T3; H+GC-1 ratti ipotiroidi trattato con GC-1; ^a significativo rispetto al controllo eutiroideo; ^b significativo rispetto ai ratti ipotiroidi; ^c significativo rispetto ai ratti IPO+T3. Il livello di significatività scelto è con P<0.05.

Misura del consumo di ossigeno su sospensioni mitocondriali epatiche

I risultati riguardanti la velocità del consumo di ossigeno su preparati mitocondriali epatici sono riportati nella **Tabella 5**. In presenza di succinato, il gruppo IPO mostra velocità del consumo di O₂ più basse rispetto al controllo eutiroideo, ma solo durante lo stato 3. Al contrario, il consumo risulta aumentato in entrambi gli stati della respirazione da ambedue gli agonisti, con risultati maggiori nel gruppo H+T₃. I valori dell'RCR non sono significativamente modificati dai trattamenti. In presenza di piruvato/malato le velocità del consumo di O₂, che risultano più basse nei ratti ipotiroidei rispetto al controllo eutiroideo durante lo stato 4, risultano incrementate dal trattamento con T₃ in entrambi gli stati della respirazione, con valori significativamente maggiori rispetto al controllo. Al contrario, il GC-1 aumenta solo lo stato 3 della respirazione supportato da piruvato/malato. I valori dell'RCR non sono modificati dai trattamenti.

SUBSTRATI		GRUPPI			
		C	H	H+T ₃	H+GC-1
Succinato	Stato 4	42.6±1.1	38.2±1.0	105.5±3.9 ^{a,b}	50.3±0.4 ^{a,b,c}
	Stato 3	212.4±5.4	187.7±9.0 ^a	515.5±4.0 ^{a,b}	239.4±9.5 ^{a,b,c}
	RCR	4.7±0.5	4.3±0.2	4.8±0.4	4.6±0.2
Piruvato/Malato	Stato 4	15.5±1.0	13.1±0.4	29.9±1.0 ^{a,b}	15.2±0.2 ^c
	Stato 3	35.4±0.9	27.5±0.6 ^a	60.8±0.7 ^{a,b}	40.7±0.9 ^{a,b,c}
	RCR	2.4±0.2	2.1±0.2	2.0±0.2	2.6±0.2

Tabella 5. Effetto del trattamento di ratti ipotiroidei con T₃ o GC-1 sul consumo di ossigeno in mitocondri di fegato. I valori, espressi come media ± l'errore standard, sono stati ottenuti utilizzando otto ratti. I valori del consumo di ossigeno sono stati espressi in nmol O/min/g di tessuto. ^a significativo vs ratti C; ^b significativo vs ratti H; ^c significativo vs ratti H+T₃. I valori sono considerati significativamente differenti quando P < 0.05.

Attività dei complessi della catena respiratoria

Come mostrato nella **Figura 2**, l'attività dei Complessi I, II e IV risulta più bassa nel gruppo degli animali ipotiroidei, mentre entrambi gli agonisti inducono un aumento degli stessi, anche se tale aumento risulta significativamente più basso rispetto a quello indotto dall'ormone tiroideo. L'attività del Complesso III, invece, è aumentata dal trattamento con gli agonisti (T_3 e GC-1) in egual modo, sicché in entrambi i gruppi la sua attività è significativamente più alta rispetto a quella dei controlli eutiroidei.

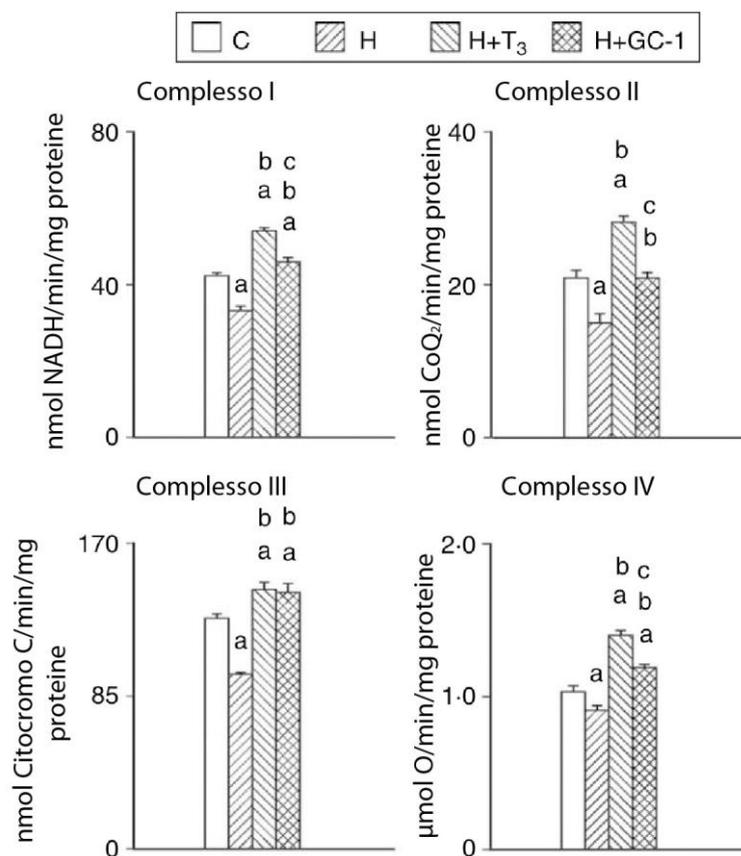


Figura 2. Attività dei complessi della catena respiratoria mitocondriale in ratti eutiroidei (C), ipotiroidei (H), ipotiroidei trattati con T_3 (H+ T_3) e ipotiroidei trattati con GC-1 (H+GC-1). I valori, espressi come media \pm l'errore standard, sono stati ottenuti utilizzando otto ratti. L'attività del complesso IV è espressa in μ mol O/min/mg di proteine mitocondriali. ^a significativo vs ratti C; ^b significativo vs ratti H; ^c significativo vs ratti H+ T_3 . I valori sono considerati significativamente differenti quando $P < 0.05$.

Attività della COX dell'omogenato e contenuto di proteine mitocondriali

L'attività dell'enzima citocromo ossidasi, riportata in **Tabella 6**, risulta significativamente più bassa nei ratti ipotiroidei rispetto ai ratti di controlli eutiroidei, mentre la somministrazione di entrambi gli agonisti induce un aumento significativo dell'attività dell'enzima. I livelli più elevati, in accordo con gli altri dati, sono comunque registrati nel gruppo H+T₃; di minore entità è l'incremento indotto dal trattamento con GC-1.

Il rapporto tra l'attività della citocromo ossidasi misurata a livello tissutale e quella misurata nei preparati mitocondriali fornisce, inoltre, una stima approssimativa del contenuto epatico di proteine mitocondriali che, come si può osservare, non è risultato significativamente differente nei quattro gruppi.

GRUPPI	ATTIVITA' DELLA COX ($\mu\text{mol O/min/g}$)	CONTENUTO PROTEICO MITOCONDRIALE (mg proteine/g tessuto)
C	73.7 \pm 0.7	71.5 \pm 4.9
H	65.6 \pm 1.3 ^a	72.1 \pm 2.5
H+T ₃	97.3 \pm 1.8 ^{a,b}	69.5 \pm 2.0
H+GC-1	90.3 \pm 1.5 ^{a,b,c}	74.6 \pm 2.4

Tabella 6. Effetto del trattamento di ratti ipotiroidei con T₃ o GC-1 sull'attività della citocromo ossidasi in omogenati e sul contenuto proteico mitocondriale nel fegato. I valori, espressi come media \pm l'errore standard, sono stati ottenuti utilizzando otto ratti. ^a significativo vs ratti C; ^b significativo vs ratti H; ^c significativo vs ratti H+T₃. I valori sono considerati significativamente differenti quando P < 0.05.

Rilascio mitocondriale di H₂O₂

I risultati relativi al rilascio mitocondriale di H₂O₂ sono mostrati nella **Tabella 7**. Il rilascio del perossido, sostenuto da succinato e da piruvato/ malato, sia durante lo stato basale che durante lo stato stimolato da ADP, risulta ridotto nei ratti ipotiroidei rispetto ai controlli eutiroidei, e incrementato dal trattamento con T₃. Il trattamento con GC-1 non induce, invece, un aumento significativo rispetto al controllo eutiroideo.

SUBSTRATI	GRUPPI			
	C	H	H+T ₃	H+GC-1
Succinato	102.0±0.4	92.9 ±1.3 ^a	123.6±1.3 ^{a,b}	105.0±1.0 ^{b,c}
Succinato + ADP	62.5±0.7	58.7 ±0.7 ^a	77.3±0.8 ^{a,b}	63.6±0.8 ^{b,c}
Piruvato/ Malato	238.7 ±0.9	183.9±2.4 ^a	260.1±1.5 ^{a,b}	242.9±0.5 ^{b,c}
Piruvato/Malato + ADP	171.4±0.8	102.4±1.3 ^a	190.2±1.4 ^{a,b}	174.3±1.2 ^{b,c}

Tabella 7. Effetto del trattamento di ratti ipotiroidei con T₃ o GC-1 sul rilascio di H₂O₂, sostenuto da succinato e da piruvato/ malato in mitocondri di fegato. I valori, espressi come media ± l'errore standard, sono stati ottenuti utilizzando otto ratti. I valori del rilascio mitocondriale di H₂O₂ sono stati espressi in pmol/min per mg di proteine. ^a significativo vs ratti C; ^b significativo vs ratti H; ^c significativo vs ratti H+T₃. I valori sono considerati significativamente differenti quando P < 0.05.

Effetto degli inibitori sul rilascio di H₂O₂

In **Tabella 8** è mostrato l'effetto dell'aggiunta di inibitori della catena di trasporto mitocondriale sul rilascio di perossido di idrogeno. In assenza di Rotenone, la velocità di rilascio di H₂O₂ in mitocondri che respirano utilizzando succinato come substrato, è ridotta dal trattamento con PTU+IOP ed aumentata dal trattamento con l'agonista rispetto al valore di controllo. Il valore più alto è raggiunto a seguito di trattamento con T₃. L'aggiunta di rotenone induce un decremento dei valori di rilascio di H₂O₂ in tutti i gruppi, a causa dell'inibizione del flusso inverso di elettroni dal coenzima Q (Ernster L et Lee CP, 1967).

I valori più bassi e i valori più alti sono riscontrati rispettivamente nei gruppi H e H+T₃, mentre i valori nei gruppi C e GC-1 non si sono rivelati significativamente differenti. L'ulteriore aggiunta di antimicina incrementa i valori di rilascio di H₂O₂ in tutti i gruppi ed induce differenze significative tra i gruppi simili a quelle trovate in presenza di solo succinato.

L'aggiunta di antimicina AA o rotenone a mitocondri che respirano utilizzando piruvato/malato come substrato, incrementa i valori di rilascio di H₂O₂ in tutti i gruppi. Tuttavia, mentre non si osservano differenze significative tra i gruppi in presenza di rotenone, i valori di rilascio di H₂O₂ sono aumentati nei ratti trattati con GC-1 rispetto ai ratti di controllo in presenza di antimicina.

SUBSTRATI	GRUPPI			
	C	H	H+T ₃	H+GC-1
Succinato	152.3±0.8	137±1.0 ^a	187.0±2.0 ^{a,b}	170.9±0.5 ^{a,b,c}
Succinato + Rot	102.6±1.0	92.7±1.4 ^{a,d}	123.2±1.4 ^{a,b,d}	104.5±1.5 ^{b,c}
Succinato + Rot+AA	832.9±7.2	771.6±30.3 ^{a,d}	964.7±19.6 ^{a,b,d}	907.6±2.9 ^{a,b,c,d}
Piruvato/Malato	238.9±0.8	184.2±1.7 ^a	260.6±1.9 ^{a,b}	242.0 ±1.5 ^{b,c}
Piruvato/Malato + AA	939.0±6.7	920.2±6.4 ^{a,d}	1082.8±3.8 ^{a,b,d}	978.2±3.4 ^{a,b,c,d}
Piruvato/Malato	238.9±1.0	183.8±1.0 ^a	259.6±1.7 ^{a,b}	242.1±0.9 ^{b,c}
Piruvato/Malato + Rot	249.5±6.0	198±5.4 ^{a,d}	274.3±1.5 ^{a,b,d}	242.9±1.4 ^{b,c}

Tabella 8. Effetto degli inibitori sulla velocità di rilascio di H₂O₂ da mitocondri di fegato di ratti eutiroidei (C), ipotiroidei (H), ipotiroidei trattati con T₃ (H+T₃) e ipotiroidei trattati con GC-1. I valori, espressi come media ± l'errore standard, sono stati ottenuti utilizzando otto ratti. I valori del rilascio di H₂O₂ sono stati espressi in pmol/min per mg di proteine. ^a significativo vs ratti C; ^b significativo vs ratti H; ^c significativo vs ratti H+T₃. I valori sono considerati significativamente differenti quando P < 0.05.

Danno ossidativo in preparati mitocondriali epatici

I livelli di HP e carbonili legati alle proteine sono utilizzati come indice di danno ossidativo a carico, rispettivamente, dei lipidi e delle proteine in mitocondri di fegato di ratto. Come mostrato nella **Figura 3** il danno a carico dei lipidi e delle proteine diminuisce in seguito al trattamento con PTU + IOP e incrementa nel trattamento con l'agonista. Il trattamento con GC-1 induce un aumento minore di danno ossidativo rispetto a quello indotto dalla T_3 , mostrandosi non significativamente differente rispetto a quello osservato nel gruppo eutiroideo di controllo.

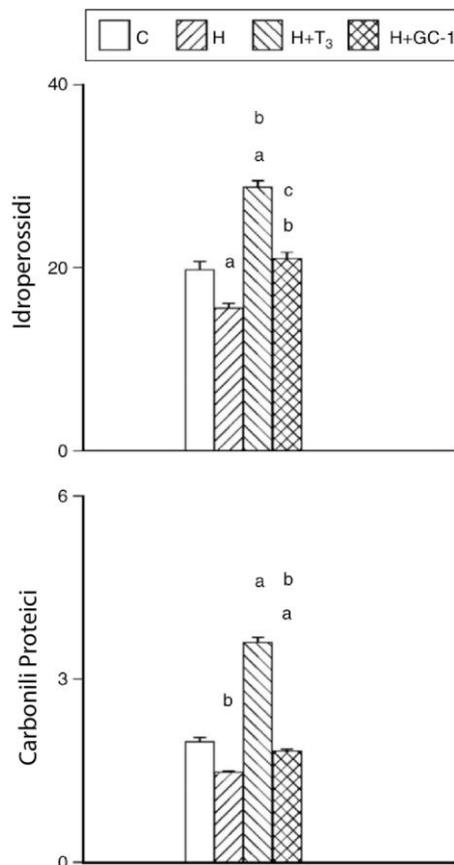


Figura 3. Danno ossidativo in preparati di fegato da ratti eutiroidei (C), ipotiroidei (H), ipotiroidei trattati con T_3 (H+ T_3) e ipotiroidei trattati con GC-1 (H+ GC-1). Gli idroperossidi sono espressi come nmol NADP/min/g tessuto e pmol NADP/min/mg proteine mitocondriali. I carbonili proteici sono espressi come nmol/mg proteine. I valori, espressi come media \pm l'errore standard, sono stati ottenuti utilizzando otto ratti. ^a significativo vs ratti C; ^b significativo vs ratti H; ^c significativo vs ratti H+ T_3 . I valori sono considerati significativamente differenti quando $P < 0.05$.

Espressione delle proteine

Esperimenti di Western blot sono stati condotti usando quantità identiche di estratti proteici di fegati di ratti ipotiroidei e trattati, i quali sono stati caricati su un gel SDS-PAGE, sottoposti ad elettroforesi e quindi trasferiti su una membrana di nitrocellulosa in accordo a protocolli standard. L'alta specificità degli anticorpi e dei markers a peso molecolare noto, ha permesso di identificare facilmente le proteine NRF-1 e NRF-2. La specificità degli anticorpi per PGC-1 è stata relativamente più bassa, ma la proteina è stata chiaramente identificata dal suo peso molecolare.

I risultati mostrati in **Figura 4** mostrano che i livelli di PGC-1, NRF-1 e NRF-2 risultano rispettivamente ridotti, aumentati e non modificati dal trattamento con PTU+IOP. I livelli delle tre proteine risultano aumentati dal trattamento con gli agonisti. Tuttavia i livelli di PGC-1 risultano incrementati in misura maggiore dopo trattamento con GC-1 rispetto a quello con T₃, senza raggiungere i valori dei controlli eutiroidei. Invece, per quanto riguarda NRF-1 e NRF-2, risultano aumentati da GC-1 ma maggiormente da T₃, superando i valori dei controlli eutiroidei con entrambi gli agonisti.

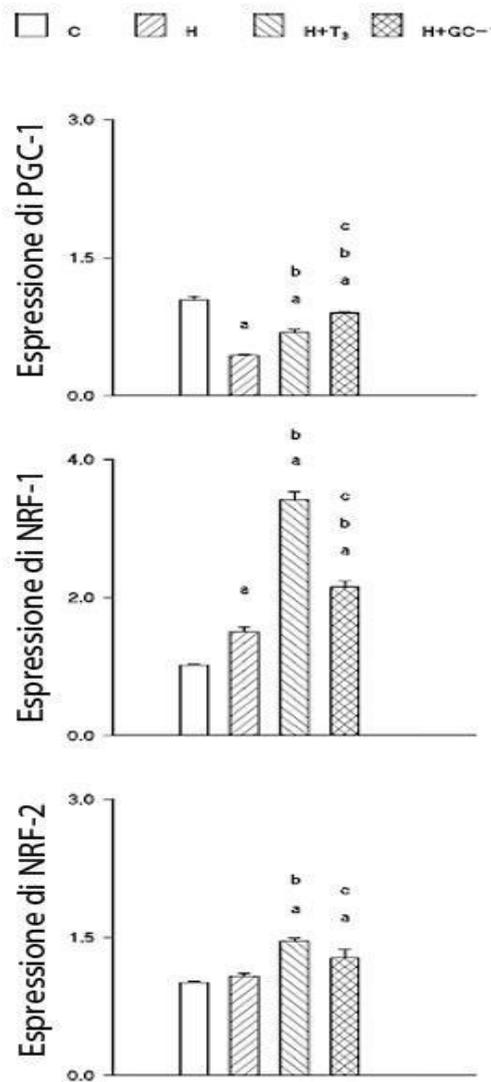


Figura 4. Livelli di espressione delle proteine PGC-1, NRF-1 e NRF-2 nel fegato di ratto. Proteine totali di fegato di ratti eutiroidi (C), ipotiroidei (H), ipotiroidei trattati con T₃ (H+T₃) e ipotiroidei trattati con GC-1 (H+GC-1), isolati ed analizzati usando western blot. In alto è mostrato un risultato rappresentativo di tre esperimenti indipendenti. Nei grafici, i risultati sono espressi come media ± errore standard di tre esperimenti differenti. I rapporti tra le intensità delle bande della β-actina sono stati comparati con un campione standard eutiroideo al quale è stato assegnato un valore 1.

Consumo di ossigeno su sospensioni mitocondriali incubate con T₁AM e T₀AM

Nella **Figura 5** sono riportate le variazioni del consumo di O₂ ottenute incubando le sospensioni mitocondriali isolate da ratti ipotiroidei con le tironamine T₁AM e T₀AM in presenza sia di succinato che di piruvato/malato ed in assenza ed in presenza di ADP. I risultati ottenuti mettono in evidenza che, in presenza di succinato, T₁AM è in grado di ridurre la velocità del consumo di O₂ sia durante lo stato IV che durante lo stato III della respirazione a concentrazioni rispettivamente $\geq 10^{-6}$ e 10^{-8} . Anche T₀AM induce una riduzione del consumo di O₂, ma in misura maggiore rispetto a T₁AM e a concentrazioni più basse. Infatti, notiamo per lo Stato IV un significativo abbassamento del consumo già a concentrazioni $\geq 10^{-7}$, e per lo stato III, la riduzione del consumo si osserva addirittura a concentrazioni $\geq 10^{-9}$.

Utilizzando piruvato/malato come substrato nessuna delle due tironamine è in grado di influenzare lo stato IV della respirazione. Per quanto riguarda lo stato III, invece, solo T₀AM induce un significativo abbassamento del consumo di O₂ a concentrazioni $\geq 10^{-8}$.

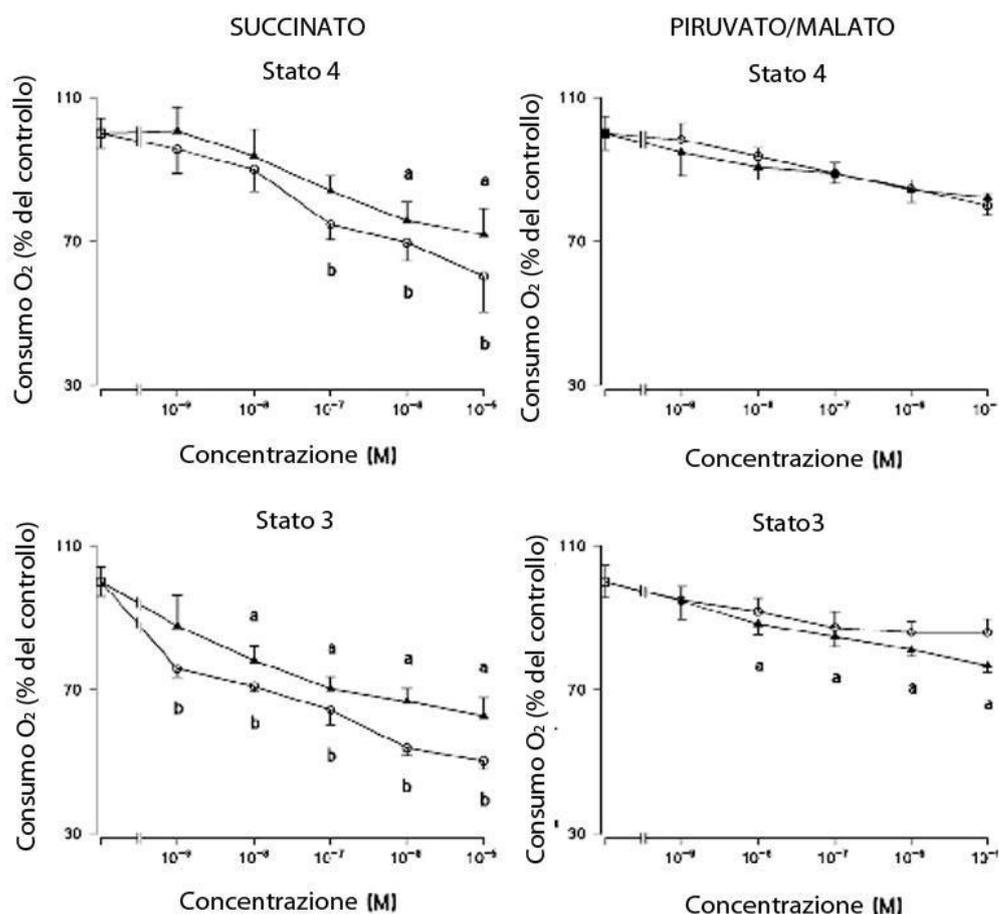


Figura 5: Effetto dell'aggiunta in vitro di T₁AM (▲) e T₀AM (○) sullo stato 3 e lo stato 4 del consumo di ossigeno. I dati, riportati come percentuale del controllo, sono espressi come media±errore standard. Gli esperimenti sono stati effettuati su otto preparati mitocondriali di otto differenti ratti ciascuno effettuato in doppio o in triplo. I valori di controllo ottenuti in presenza di succinato (10mM) + Rotenone (5mM) sono 46.8 ± 2.0 e 151.7 ± 6.3 nmol O/min/mg proteine mitocondriali durante lo stato 4 e lo stato 3 rispettivamente. I valori di controllo ottenuti in presenza di piruvato/malato (10/2.5 mM) sono 16.3 ± 0.8 e 37.2 ± 1.7 nmol O/min/mg proteine mitocondriali durante lo stato 4 e lo stato 3 rispettivamente.

a T₁AM significativo rispetto al controllo

b T₀AM significativo rispetto al controllo

Il livello di significatività è stato scelto con $P < 0.05$. L'asse orizzontale non inizia da zero per rendere più chiaramente visibili gli effetti.

Rilascio di H₂O₂ su sospensioni mitocondriali isolate da ratti ipotiroidei incubate con T₁AM e T₀AM misurato in presenza ed in assenza di inibitori

Le misure sulla velocità di rilascio di H₂O₂ prodotto della riduzione univalente dell'Ossigeno, sono riportate in **Figura 6** (mitocondri respiranti in presenza di succinato) ed in **Figura 7** (mitocondri respiranti in presenza di piruvato/malato). I risultati ottenuti mettono in evidenza che il rilascio di H₂O₂ risulta aumentato con T₁AM ed in misura maggiore con T₀AM. Entrambe le tironamine risultano effettive a concentrazioni $\geq 10^{-8}$. In presenza di piruvato/malato, invece, il rilascio è aumentato in misura maggiore da T₁AM ed in misura minore da T₀AM. Entrambe le tironamine risultano effettive a concentrazioni $\geq 10^{-7}$. Nella figura è anche riportato il rilascio di perossido in presenza di inibitori della catena di trasporto elettronico al fine di avere ulteriori informazioni sulle possibili alterazioni a carico dei siti produttori delle ROS. Gli inibitori utilizzati sono il rotenone (Rot) che blocca il trasferimento degli elettroni dal Complesso I all'ubichinone e l'antimicina (AA) che interrompe il flusso elettronico all'interno del sito ubichinone-citocromo b del complesso III. E' interessante notare che l'aggiunta di antimicina, che in mitocondri di controllo porta ad un aumento del rilascio sia in presenza di succinato che di piruvato/malato (dati non riportati), sembra non sortire alcun effetto su mitocondri pre-incubati con entrambe le tironamine in esame.

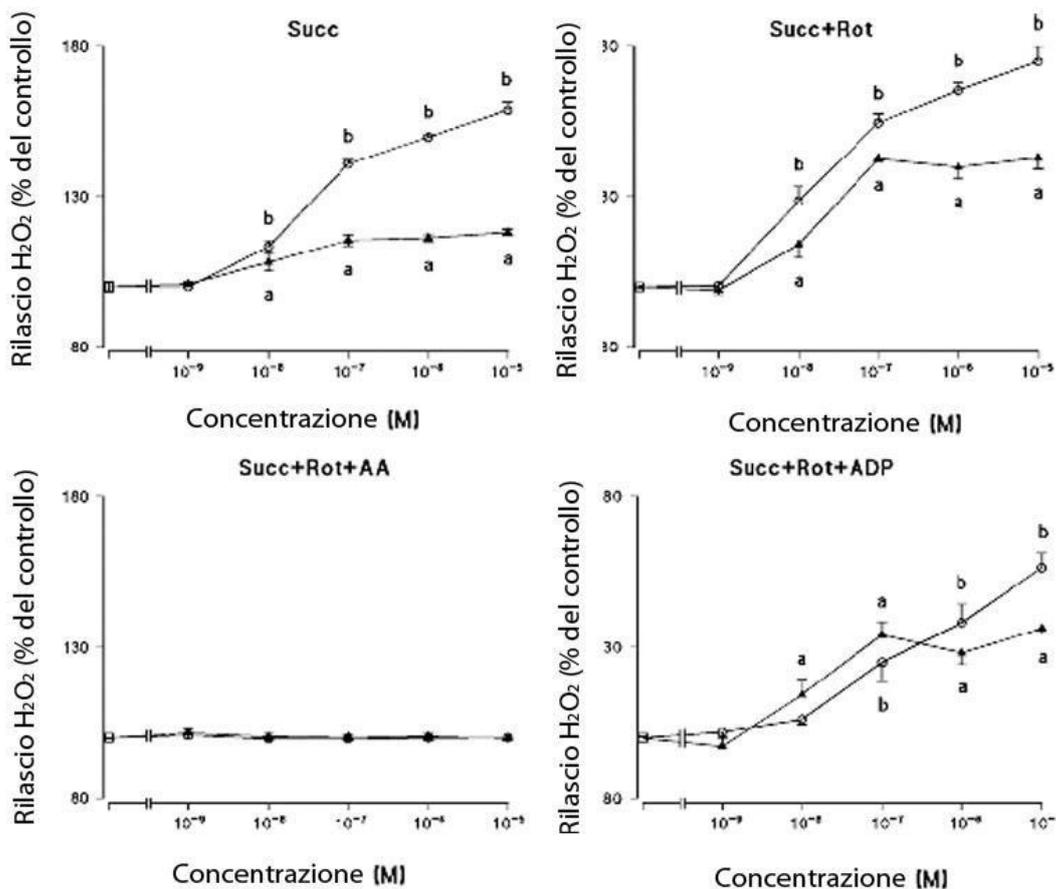


Figura 6: Effetto dell'aggiunta in vitro di T₁AM (▲) e T₀AM (○) sulla velocità di rilascio di H₂O₂ su mitocondri respiranti in presenza di succinato ed isolati da fegato di ratto ipotiroideo. I dati, riportati come percentuale del controllo, sono espressi come media±errore standard. Gli esperimenti sono stati effettuati su otto preparati mitocondriali di otto differenti ratti ciascuno effettuato in doppio o in triplo. I valori di controllo ottenuti in presenza di Succ, Succ+Rot, Succ+Rot+AA e Succ+Rot+ADP sono 139.4 ± 1.2 , 98.4 ± 2.1 , 857.9 ± 4.4 , e 63.9 ± 0.3 pmol H₂O₂/min/mg proteine mitocondriali rispettivamente.

^a T₁AM significativo rispetto al controllo

^b T₀AM significativo rispetto al controllo

Il livello di significatività è stato scelto con $P < 0.05$. L'asse orizzontale non inizia da zero per rendere più chiaramente visibili gli effetti.

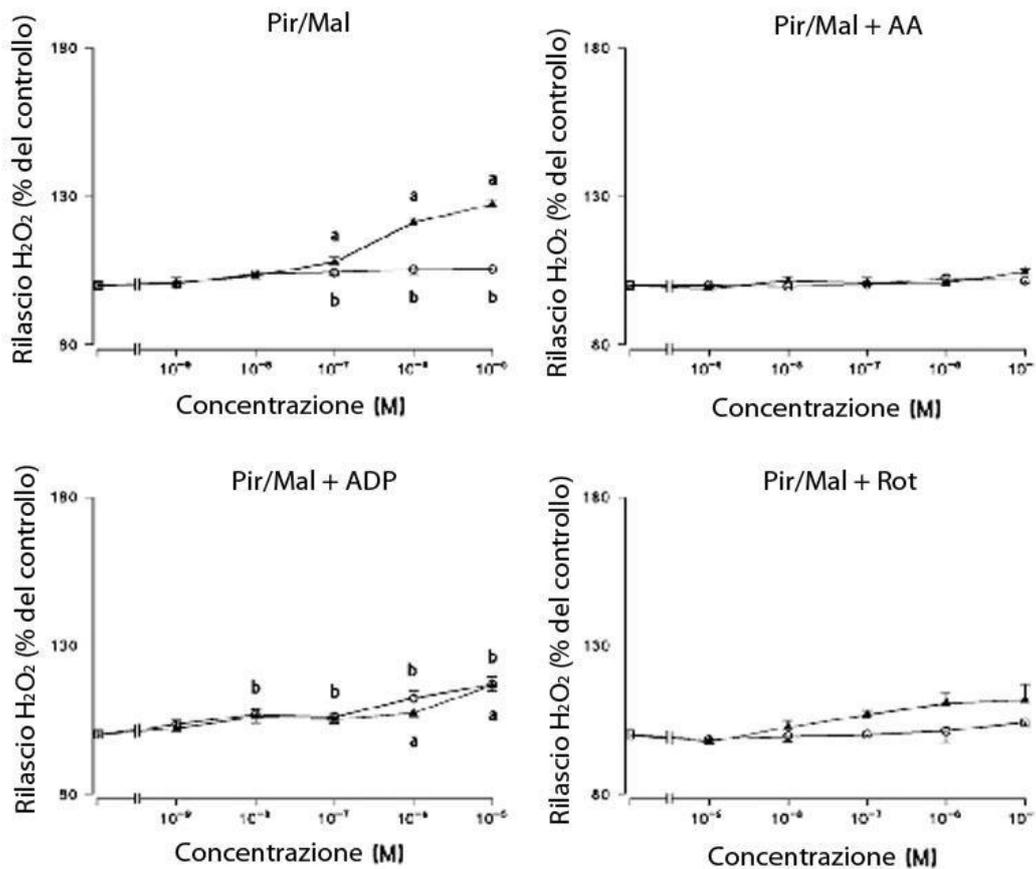


Figura 7: Effetto dell'aggiunta in vitro di T₁AM (▲) e T₀AM (○) sulla velocità di rilascio di H₂O₂ su mitocondri respiranti in presenza di piruvato/malato ed isolati da fegato di ratto ipotiroideo. I dati, riportati come percentuale del controllo, sono espressi come media±errore standard. Gli esperimenti sono stati effettuati su otto preparati mitocondriali di otto differenti ratti ciascuno effettuato in doppio o in triplo. I valori di controllo ottenuti in presenza di Pyr/Mal, Pyr/Mal+Rot, Pyr/Mal+AA, Pyr/Mal+ADP sono 183.5 ± 3.2, 98.4 ± 2.1, 204.0 ± 7.1 e 937.0 ± 12.4 e 101.1±2.1 pmol H₂O₂/min/mg proteine mitocondriali rispettivamente.

^a T₁AM significativo rispetto al controllo

^b T₀AM significativo rispetto al controllo

Il livello di significatività è stato scelto con P<0,05. L'asse orizzontale non inizia da zero per rendere più chiaramente visibili gli effetti.

Rilascio di H₂O₂ prodotta dalla deaminazione ossidativa di T₁AM e T₀AM catalizzata dalla MAO

In **figura 8** è riportata la misura della velocità di rilascio di H₂O₂ effettuata su mitocondri incubati per 10 minuti con T₁AM e T₀AM in assenza di substrato respiratorio. I risultati mettono in evidenza un aumento della velocità di rilascio di perossido con entrambe le tironamine. I risultati sono più marcati in mitocondri incubati con T₀AM.

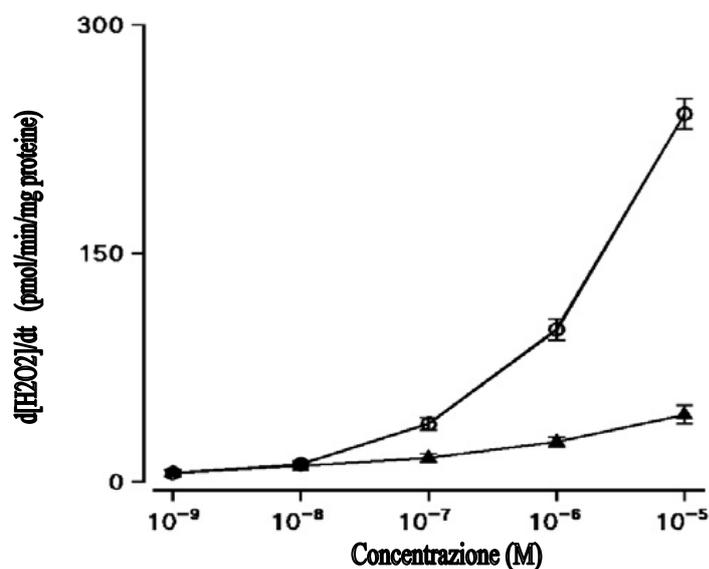


Figura 8: Velocità di rilascio di H₂O₂ prodotta dalla deaminazione ossidativa catalizzata dalla MAO di T₁AM (▲) e T₀AM (○). I dati, riportati sono espressi come media±errore standard. Le concentrazioni utilizzate per le tironamine erano comprese in un range tra 10⁻⁹ a 10⁻⁵ M. Gli esperimenti sono stati effettuati su tre preparati mitocondriali di tre differenti ratti ciascuno effettuato in doppio o in triplo.

Effetto dell'inibitore della MAO, la pargilina, sul rilascio di H₂O₂

Le misure della velocità di rilascio di perossido su mitocondri respiranti effettuate in presenza ed in assenza della pargilina, un inibitore delle MAO di tipo A e B, sono riportate nella **Figura 9** (mitocondri respiranti in presenza di succinato) ed in **Figura 10** (mitocondri respiranti in presenza di piruvato/malato).

In accordo con risultati precedenti, il rilascio di perossido, misurato in presenza di succinato, è incrementato in maniera significativa sia da T₁AM che da T₀AM a concentrazioni $\geq 10^{-8}$, sia durante lo stato 4 che durante lo stato 3 della respirazione. Aumenti significativi del rilascio si ottengono anche in presenza di pargilina, sebbene l'effetto di T₀AM divenga significativo nello stato 3 solo a concentrazioni $\geq 10^{-7}$. Comunque, in presenza dell'inibitore, la stimolazione del rilascio prodotta da T₀AM è significativamente più bassa sia durante lo stato 3 che durante lo stato 4 della respirazione, mentre quella prodotta da T₁AM è significativamente più bassa durante lo stato 4.

Su mitocondri respiranti in presenza di piruvato/malato, in assenza di pargilina, le velocità di rilascio sono significativamente aumentate da T₁AM a concentrazioni $\geq 10^{-7}$ sia durante lo stato 4 che durante lo stato 3 della respirazione. Dopo l'aggiunta di pargilina, si osserva comunque un aumento del rilascio indotto da T₁AM, ma l'effetto è significativamente più basso del controllo a concentrazioni $\geq 10^{-8}$ e $\geq 10^{-6}$ rispettivamente durante lo stato 3 e lo stato 4. La velocità di rilascio è significativamente incrementata anche da T₀AM a concentrazioni $\geq 10^{-6}$ in entrambi gli stati della respirazione sebbene l'effetto durante lo stato 4 sia minimo. La risposta a T₀AM non è significativamente modificata dopo l'aggiunta di pargilina.

SUCCINATO

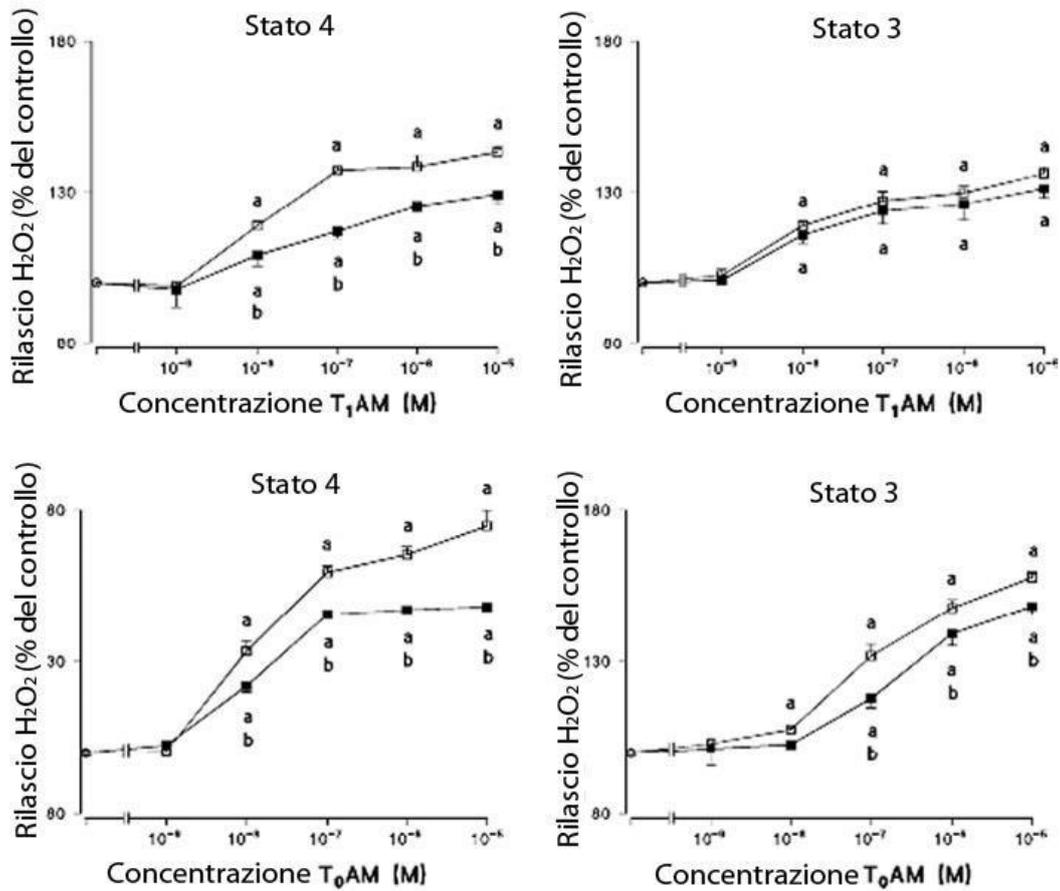


Figura 9: Effetto dell'aggiunta in vitro di T₁AM e T₀AM sulla velocità di rilascio di H₂O₂ sostenuta da succinato in presenza (■) ed in assenza (□) di pargilina 5 μM. I dati, riportati come percentuale del controllo, sono espressi come media±errore standard. Gli esperimenti sono stati effettuati su otto preparati mitocondriali di otto differenti ratti ciascuno effettuato in doppio o in triplo. I valori di controllo ottenuti in presenza di inibitore sono 93.9 ± 0.9 e 57.5 ± 1.5 pmol H₂O₂/min/mg proteine mitocondriali durante lo stato 4 e lo stato 3 rispettivamente. In assenza dell'inibitore, i valori di controllo ottenuti sono 101.1 ± 2.1 e 64.0 ± 0.2 H₂O₂/min/mg proteine mitocondriali durante lo stato 4 e lo stato 3 rispettivamente.

^a Significativo rispetto al controllo

^b Significativo rispetto al valore ottenuto in assenza di inibitore

Il livello di significatività è stato scelto con P<0,05

PIRUVATO/MALATO

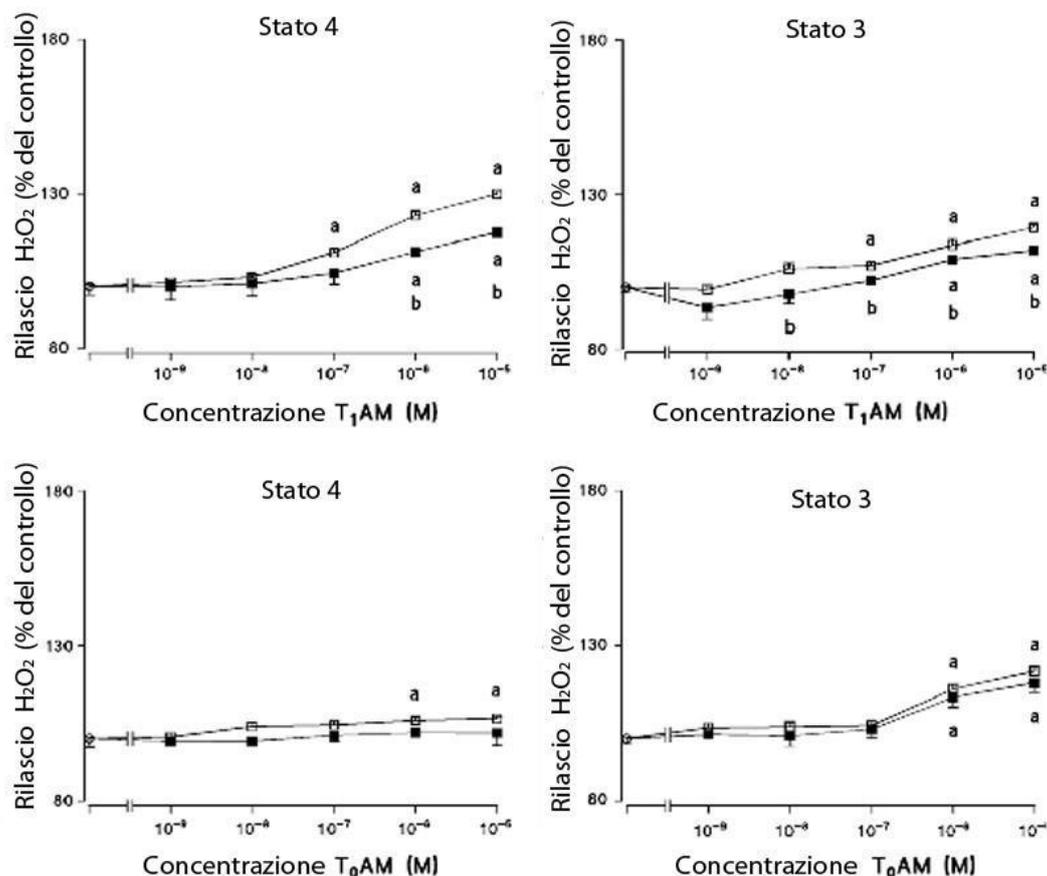


Figura 10: Effetto dell'aggiunta in vitro di T₁AM (▲) e T₀AM (○) sulla velocità di rilascio di H₂O₂ sostenuta da piruvato/malato in presenza (■) ed in assenza (□) di pargilina 5 μM. I dati, riportati come percentuale del controllo, sono espressi come media±errore standard. Gli esperimenti sono stati effettuati su otto preparati mitocondriali di otto differenti ratti ciascuno effettuato in doppio o in triplo. I valori di controllo ottenuti in presenza di inibitore sono 163.2 ± 4.5 e 90.3 ± 1.7 pmol H₂O₂/min/mg proteine mitocondriali durante lo stato 4 e lo stato 3 rispettivamente. In assenza dell'inibitore, i valori di controllo ottenuti sono 183.8 ± 1.0 e 99.5 ± 0.4 H₂O₂/min/mg proteine mitocondriali durante lo stato 4 e lo stato 3 rispettivamente.

^a Significativo rispetto al controllo

^b Significativo rispetto al valore ottenuto in assenza di inibitore

Il livello di significatività è stato scelto con P<0,05

Attività dei complessi della catena respiratoria di mitocondri incubati con tironamine

Come mostrato in **Figura 11**, l'attività dei Complessi I, II e IV della catena respiratoria non è influenzata dall'incubazione con T₁AM e T₀AM 10⁻⁵ M. L'attività del Complesso III è, invece, ridotta da entrambi i derivati dell'ormone tiroideo.

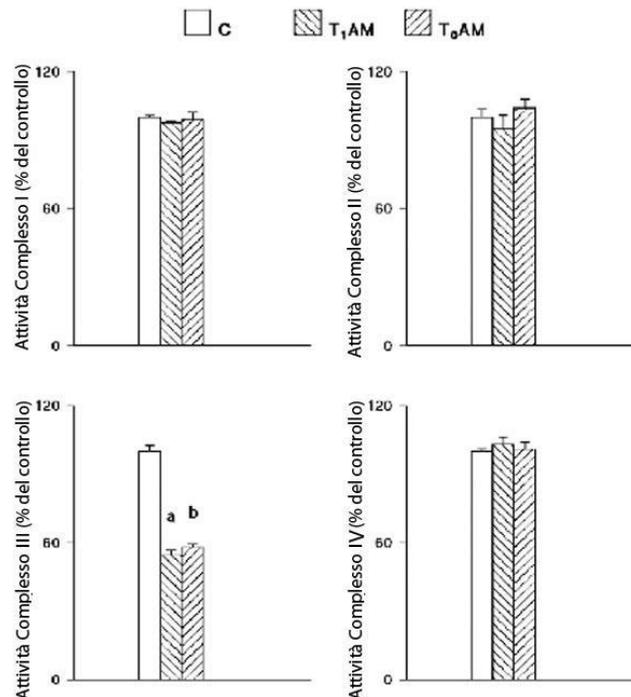


Figura 11: Effetto dell'aggiunta in vitro di T₁AM (▲) e T₀AM (○) sulla attività dei complessi respiratori di mitocondri di fegato di ratti ipotiroidei. I dati, riportati come percentuale del controllo, sono espressi come media±errore standard. Gli esperimenti sono stati effettuati su otto preparati mitocondriali di otto differenti ratti ciascuno effettuato in doppio o in triplo. I valori di controllo dei Complessi I, II, III e IV, riferiti per mg proteine mitocondriali, sono 34.5 ± 1.1 nmol NADH ossidato/min, 12.5 ± 0.7 nmol di 2,6-diclorofenilindofenolo ridotto/min, 101.4 ± 2.8 nmol di citocromo c ridotto/min e 0.94 ± 0.05 μmol O ridotto/min, rispettivamente.

^a T₁AM significativo rispetto al controllo

^b T₀AM significativo rispetto al controllo

Il livello di significatività è stato scelto con P<0,05

Discussione

I risultati riportati nella presente tesi mostrano che una dose giornaliera di T_3 pari a $100\mu\text{g}/100\text{ gr}$ di peso corporeo riduce la massa corporea nei ratti ipotiroidei mentre il trattamento con dosi equimolari di GC-1 non modifica tale parametro. Tale risultato è in accordo con precedenti esperimenti effettuati utilizzando lo stesso modello sperimentale (Venditti P et al., 1997; Venditti P et al., 2004b) mentre non vi sono dati disponibili in letteratura per quanto riguarda il GC-1. Interessante, però, è anche l'osservazione che altri parametri normalmente influenzati dall'ormone tiroideo siano modificati dal trattamento con l'agonista. Ad esempio, la massa cardiaca è aumentata nei ratti trattati con T_3 , ma non in quelli trattati con GC-1, mentre il rapporto peso cuore/peso corpo, la frequenza cardiaca e la velocità metabolica basale sono incrementate da entrambi gli agonisti ma in misura minore dal GC-1, sicchè i valori riscontrati per il gruppo H+GC-1 non sono significativamente più alti del controllo eutiroideo.

In accordo con la osservazione che l'aumento della produzione di calore indotta dall'ormone tiroideo derivi da un aumentato metabolismo ossidativo dei tessuti bersaglio, in tutti i tessuti isolati da animali H+ T_3 ed H+GC-1 è stata ritrovata una aumentata attività della citocromo ossidasi. Tuttavia, mentre gli incrementi indotti dalla T_3 nei preparati epatici, cardiaci e muscolari scheletrici sono piuttosto simili (62,4%, 48,3% e 68,4% rispettivamente), quelli indotti dal GC-1 sono marcatamente differenti (58,4%, 14,7% e 30,4% rispettivamente), sicchè solo la attività della COX epatica risulta in cambiamenti simili dopo il trattamento con T_3 e con GC-1 ed ha nei ratti H+GC-1 valori più alti rispetto al controllo eutiroideo. Una possibile spiegazione potrebbe essere legata alla diversa affinità che GC-1 ha per le isoforme del recettore nucleare della T_3 , e alla diversa distribuzione di GC-1 e dell'isoforma β del recettore nei vari tessuti. Infatti, dati presenti in letteratura riportano che mentre T_3 e GC-1 hanno la stessa affinità di legame per l'isoforma β , T_3 ha un'affinità per l'isoforma α 10 volte maggiore rispetto a GC-1 (Chiellini G. et al., 1998b).

E' stato inoltre dimostrato che mentre l'80% dei recettori tiroidei localizzati a livello epatico sono di tipo β (Schwartz HL et al., 1992), nel cuore (Schwartz HL et al., 1992) e nel muscolo predomina l'isoforma α (White P et al., 2001).

Infine, misure condotte sulla distribuzione plasmatica e tissutale di GC-1 in topi hanno mostrato che mentre nel fegato e nel muscolo T_3 e GC-1 si distribuiscono equamente tra il plasma ed il tessuto, nel cuore la distribuzione tissutale di T_3 è 10 volte più grande rispetto a quella di GC-1 (Trost SU et al., 2000). Se queste osservazioni valgono anche per il ratto, esse potrebbero spiegare perché i cambiamenti indotti da GC-1 nel cuore sono più bassi rispetto al muscolo.

Ulteriori informazioni sulle caratteristiche respiratorie dei tessuti sono state ottenute misurando il consumo di ossigeno in vitro su omogenati dei tre tessuti. Come ci si aspettava, in tutti e tre i tessuti, la velocità del consumo diminuisce sia in condizioni basali che in presenza di ADP in ratti resi ipotiroidei, mentre aumenta nei atti successivamente trattati con T_3 . Al contrario, le modifiche tessuto-specifiche indotte dal GC-1 sulla attività della citocromo ossidasi tissutale si riflettono anche nelle modifiche a carico della respirazione. Nonostante in letteratura sia noto che il GC-1 è in grado di stimolare la proteina disaccoppiante UCP-1 (Ribeiro MO et al., 2001), attualmente si conosce poco circa l'influenza del GC-1 sulla conduttanza protonica basale. Per cui non sono in grado di dare una spiegazione plausibile ai limitati cambiamenti che l'agonista esplica nello stato 4 della respirazione dei tessuti muscolari ed epatici. L'incapacità del GC-1 di indurre aumenti dello stato 3 della respirazione nei preparati cardiaci è in perfetto accordo con la sua ridotta influenza sull'attività della COX cardiaca. Allo stesso modo, l'aumento della respirazione nei preparati epatici e muscolari scheletrici è in accordo con l'aumento della attività della citocromo ossidasi tissutale. Anche i risultati ottenuti attraverso la misura del consumo di ossigeno su preparati mitocondriali epatici è in accordo con le variazioni a carico della respirazione osservate per il tessuto epatico in seguito al trattamento con i due agonisti e permettono di concludere che i diversi effetti non sono dovuti ad una proliferazione mitocondriale bensì a differenti effetti degli agonisti sulle caratteristiche della popolazione mitocondriale.

I risultati ottenuti dimostrano che l'effetto differente dei due agonisti sulla respirazione nel fegato è dovuta a effetti differenti sulla velocità del flusso elettronico attraverso la membrana mitocondriale. L'effetto di T_3 concorda con le osservazioni secondo cui l'ipertiroidismo aumenta la quantità delle proteine della catena respiratoria e della superficie della membrana interna dei mitocondri (Jacovic S et al. 1978) senza variare il loro numero (Goglia F et al., 1989) e la massa totale delle proteine (Venditti et al., 2006). Non è, dunque, da escludere l'ipotesi secondo cui il ridotto effetto di GC-1 sul consumo di O_2 sia dovuto ad minore aumento del contenuto mitocondriale di componenti della catena di trasporto.

Quest'idea è sostenuta dalla constatazione che i cambiamenti nel consumo di ossigeno nello Stato 3, indotti da T_3 e GC-1, sono in accordo con i rispettivi aumenti dell'attività dei complessi I, II e IV. D'altra parte, l'attività del complesso III è aumentata similmente sia dal trattamento con T_3 che con GC-1, in accordo con i risultati precedenti ottenuti dall'analisi del consumo di ossigeno misurata a livello tissutale. Infatti, i risultati ottenuti hanno permesso di concludere che, nel trattamento con GC-1, lo stato 3 della respirazione mostra aumenti diversi a seconda che il substrato utilizzato sia legato al Complesso I o al Complesso II della catena respiratoria. Per il fegato, tali aumenti sono

rispettivamente dell'88% e del 67%, mentre per il muscolo essi sono del 36% e del 12% rispettivamente. L'osservazione che T_3 induce una stimolazione dello stato 3 della respirazione simile in presenza di piruvato/malato e succinato (177% e 180% per il fegato, ed 87% e 83% per il muscolo) suggerisce che i componenti della catena respiratoria non rispondano come unità alla stimolazione da parte del GC-1.

Anche la stima del contenuto proteico mitocondriale, ottenuta dal rapporto tra l'attività dell'enzima citocromo ossidasi tissutale e quella mitocondriale, fornisce una ulteriore conferma al fatto che GC-1 non induce proliferazione mitocondriale bensì esercita effetti diversi sul contenuto mitocondriale dei componenti della catena di trasporto. Infatti, i dati ottenuti non mostrano alcuna significativa differenza tra i gruppi sperimentali.

Ulteriori informazioni sugli effetti dei due agonisti a carico della concentrazione dei componenti della catena respiratoria mitocondriale è stata ottenuta dalla misura del rilascio di perossido di idrogeno. Normalmente, l'ossigeno è ridotto nei mitocondri ad acqua mediante il trasferimento di quattro elettroni. Tuttavia, può succedere che esso vada incontro ad una riduzione univalente attraverso il trasferimento di un unico elettrone che porta così alla formazione della specie radicalica anione superossido ($O_2^{\cdot-}$), il quale per dismutazione spontanea o enzimatica dà origine alla produzione di perossido di idrogeno (H_2O_2). Quest'ultima molecola non è un radicale propriamente detto, però è in grado di attraversare facilmente le membrane biologiche e a contatto con complessi del Ferro può dare origine al più pericoloso e particolarmente reattivo radicale ossidrilico (OH^{\cdot}). Sia il perossido di idrogeno che il radicale ossidrilico possono danneggiare ossidativamente macromolecole biologiche. L'osservazione che l'aumento nella produzione di specie reattive dell'ossigeno è più bassa nel trattamento di ratti ipotiroidei con GC-1 rispetto al trattamento con l'ormone tiroideo, suggerisce che i due agonisti inducano aumenti differenziali nella concentrazione dei carriers mitocondriali autossidabili. Tale ipotesi è confermata dall'analisi della velocità di rilascio misurata in presenza di inibitori della catena respiratoria mitocondriale, i quali rendono la concentrazione di questi ultimi l'unico fattore da cui dipende la produzione di H_2O_2 . È interessante notare che l'aggiunta di rotenone e antimicina che rendono il complesso III completamente ridotto in mitocondri che respirano in presenza di succinato, porta ad un aumento significativo della velocità di rilascio rispetto agli eutiroidei di controllo e agli ipotiroidei, sia nel trattamento con T_3 che nel trattamento con GC-1. Tuttavia, l'incremento osservato nel gruppo trattato con GC-1 è più basso rispetto a quello ottenuto in presenza di T_3 . Invece, l'aggiunta di rotenone a mitocondri che respirano in presenza di piruvato/malato, il quale rende il complesso I l'unico fattore responsabile dell'aumento della velocità di rilascio, provoca un aumento

significativo rispetto al controllo eutiroideo e al gruppo degli ipotiroidei solo nel trattamento con T_3 , mentre non vi sono significative differenze tra il gruppo trattato con GC-1 ed il gruppo di controllo. Tali risultati permettono, quindi, di concludere che mentre l'ormone tiroideo è in grado di indurre la sintesi dei carriers dei complessi I e III, GC-1 è responsabile dell'aumento della concentrazione dei carriers solo del complesso III, mentre influenza in maniera notevolmente più bassa quella del complesso I.

La diversa influenza dei trattamenti con i due agonisti sul contenuto dei carriers della catena respiratoria mitocondriale è confermato anche dall'analisi dell'espressione di fattori nucleari coinvolti nella trascrizione di geni codificanti per proteine mitocondriali. È noto che l'espressione dell'apparato respiratorio è controllato dai fattori trascrizionali NRF-1 e NRF-2 (fattori respiratori nucleari 1 e 2) e da un coattivatore trascrizionale, il PGC-1 (Peroxisomal proliferator-activated receptor- γ coactivator). NRF-1 e NRF-2 sembrano coinvolti nel controllo di molti geni indispensabili per la regolazione della funzione e della biogenesi mitocondriale, mentre PGC-1 sembra svolgere la sua azione come coattivatore di NRF-1 e NRF-2 (Scarpulla RC, 2002). Numerose prove sperimentali, inoltre, hanno dimostrato che la T_3 innesca processi come la biogenesi mitocondriale, la termogenesi adattativa e la gluconeogenesi epatica, tutti fenomeni che sembrano regolati anche da PGC-1, che a sua volta interagisce con numerosi recettori nucleari, in particolare con TR β (Puigserver P et al., 1998). A sostegno di ciò è stato anche recentemente riportato che trattamenti a breve (Weitzel JM et al., 2003b) e a lungo termine (Irrcher I et al., 2003) con T_3 aumentano i livelli di PGC-1 nel fegato di ratto, mentre sono disponibili scarse informazioni riguardo l'effetto della T_3 sull'espressione di NRF-1 e NRF-2. Tuttavia, alcune prove sperimentali hanno messo in luce che i livelli di entrambi i fattori trascrizionali sono incrementati dai trattamenti con T_3 di ratti ipotiroidei (Venditti P et al., 2009). Per fare luce sulla relazione tra il trattamento con i due agonisti e l'espressione di queste proteine nucleari, ho misurato i livelli di espressione di PGC-1, NRF-1 e NRF-2. I risultati mostrano che il trattamento con PTU+IOP fa diminuire i livelli di PGC-1 e aumentare quelli di NRF-1 e NRF-2. Al contrario il trattamento con gli agonisti fa aumentare i livelli di espressione di tutte le proteine, anche se i livelli di PGC-1 restano comunque bassi rispetto a quelli dei controlli eutiroidei. Un aumento maggiore dei livelli di NRF-1 e NRF-2 indotti dalla T_3 è in accordo con i dati relativi all'attività della COX. Infatti, tale attività risulta maggiore nei ratti H+ T_3 che nei ratti H+GC-1. Poiché gli ormoni tiroidei sono coinvolti nell'espressione di geni che codificano per alcune subunità della citocromo ossidasi nel fegato di ratto (Sheehan TE et al., 2004) è lecito ricercare una relazione tra l'espressione delle proteine NRF-1 e NRF-2 e la concentrazione della COX. D'altra parte, la constatazione secondo cui il trattamento con T_3 non è in grado di ristabilire i livelli di controllo di PGC-1 e che li aumenta in misura minore

rispetto a GC-1, non sono in accordo con osservazioni precedenti, secondo cui 5 giorni di trattamento con T₃ inducono un aumento dell'espressione di PGC-1 nel muscolo e nel fegato (Irrcher et al., 2003). Probabilmente queste discrepanze sono dovute all'utilizzo di protocolli differenti per indurre lo stato ipertiroidico nei ratti. Il programma secondo Irrcher prevede infatti la somministrazione di dosi giornaliere di 40µg di T₃/100g di peso corporeo a ratti eutiroidei. È quindi probabile che, sia la dose ormonale più elevata, sia la sua somministrazione a ratti eutiroidei possano alterare la risposta alla T₃. Infatti, nei ratti eutiroidei la presenza della T₄ e di derivati della T₃ potrebbero essere presenti in concentrazioni tali da alterare la risposta alla T₃ esogena. Questa idea è supportata da precedenti lavori in cui gli animali venivano sottoposti a diversi trattamenti (somministrazione di T₃ o T₄ ed esposizione a freddo) e dove è stata trovata una forte correlazione tra l'attività della COX e i livelli di espressione di PGC-1 (Venditti P et al., 2009b) Oltre a queste considerazioni, precedenti risultati (Irrcher I et al., 2003) suggeriscono che l'attivazione di PGC-1 attraverso modificazioni post-traduzionali abbia un ruolo più importante rispetto alla quantità di proteine determinare mediante il contenuto di COX nel fegato di ratto; ciò fa, quindi, ipotizzare che i livelli di PGC-1 relativamente bassi nei ratti trattati con T₃ possono coesistere con l'elevata attività della COX.

Un considerevole numero di osservazioni sperimentale mettono in evidenza che lo stato ipermetabolico tipico dell'ipotiroidismo è associato ad un danno ossidativo dovuto ad un aumento della produzione di ROS e ad una riduzione del sistema di difesa antiossidante nei tessuti di roditori (Venditti P et Di Meo S, 2006; Fernández V et al., 2006).

E' noto anche che l'ormone tiroideo induce stress ossidativo negli uomini. Chiare evidenze a a tale proposito, mettono in risalto un aumento dei livelli circolanti di perossido di idrogeno e degli indici di danno per ossidativo in pazienti ipertiroidici (Venditti P et Di Meo S, 2006).

Inoltre, è stato suggerito che le ROS giochino un ruolo fondamentale nella miopatia e nella cardiomipatia, considerate entrambe le maggiori complicanze dell'ipertiroidismo (Asayama K. et Kato K, 1990). Poichè il GC-1 è in grado di indurre cambiamenti nella velocità metabolic basale e nel metabolismo aerobico di tessuti bersaglio dell'ormone tiroideo, è stato interessante valutare se tali variazioni fossero correlate ad una estensione del danno ossidativo. I risultati ottenuti mediante la valutazione degli idroperossidi lipidici e dei carbonili proteici, come markers di danno ossidativo a lipidi e proteine rispettivamente, ha messo in evidenza che il trattamento con T₃ di ratti ipotiroidici è associato ad un aumento dello stress ossidativo nel cuore, nel fegato e nel muscolo scheletrico e confermano dati precedenti riportati in letteratura (Venditti P et Di Meo S, 2006). La somministrazione di dosi equimolari di GC-1, induce un danno ossidativo minore rispetto a quello indotto dall'ormone tiroideo, sicchè solo il danno ossidativo ai lipidi epatici risulta

significativamente più alto nel gruppo H+GC-1 rispetto al gruppo dei ratti eutiroidei di controllo. Il danno ossidativo a lipidi e proteine dipende da caratteristiche biochimiche differenti, come il grado di insaturazione delle catene idrocarburiche e il contenuto di aminoacidi in grado di generare carbonili proteici rispettivamente. Quindi, non sorprende il fatto che nei tre tessuti i due agonisti inducano un diverso danno ossidativo. Quello che, invece, sorprende è il fatto di ritrovare un danno anche a livello dei preparati cardiaci in cui il GC-1 sembra avere effetto minore. Una possibile spiegazione potrebbe essere legata all'aumento delle richieste metaboliche del tessuto epatico indotto dal GC-1 a seguito dell'incremento delle sue capacità respiratorie. Tale aumento potrebbe indirettamente portare ad un aumento dell'attività cardiaca che si tradurrebbe, poi, in un aumento del danno ossidativo (Kumar CT et al., 1992). La successiva valutazione del danno ossidativo a livello dei preparati mitocondriali mette in evidenza che in seguito al trattamento con PTU + IOP il danno diminuisce, mentre aumenta nel trattamento con l'ormone tiroideo. Il trattamento con GC-1 induce, invece, un danno ossidativo più basso rispetto a quello indotto dalla T_3 e non significativamente differente da quello dei ratti eutiroidei, a conferma ulteriore dei risultati ottenuti mediante la valutazione del rilascio di H_2O_2 .

E' noto da tempo che gli ormoni tiroidei agiscono da modulatori dell'espressione genica mediante l'interazioni con recettori nucleari (TRs) (Samuels HH et al. 1988) Gli effetti genomici indotti dall'ormone tiroideo si verificano su una scala temporale relativamente lunga. Tuttavia vi sono numerosi effetti rapidi associati alla T_3 che si verificano su una scala temporale che esclude una interazione T_3 -TRs (Yen PM, 2001). L'evidenza sperimentale riportata da Horst e collaboratori (Horst C et al., 1989) secondo cui la 3,5-diiodo-L-tironina ($3,5-T_2$) è in grado di promuovere una rapida stimolazione del consumo di ossigeno epatico, ha fatto supporre che altre iodotironine, oltre alla T_4 ed alla T_3 , potessero svolgere un ruolo fisiologico. Tra queste, la $3,5-T_2$ sembra influenzare il metabolismo energetico. In vitro, essa stimola la citocromo ossidasi di fegato di ratto (Lanni A et al., 1994) e se iniettata a ratti ipotiroidei essa sembra aumentare la velocità metabolica basale attraverso un pathway biochimico che non dipende dalla sintesi proteica e che si attua più rapidamente di quello indotto dalla T_3 (Lanni A et al., 1996).

Più recentemente si è rivolta particolare attenzione ai derivati decarbossilati e deiodinati dell'ormone tiroideo, T_1AM e T_0AM che inducono rapidamente ipotermia e bradicardia in topi attraverso un meccanismo che è indipendente dalla trascrizione genica (Scanlan TS et al., 2004).

I risultati ottenuti nei miei lavori forniscono sostegno all'ipotesi secondo cui entrambe le tironamine siano in grado di influenzare le funzioni mitocondriali in preparati subcellulari. Infatti, sebbene sia noto che sia T_1AM che T_0AM siano in grado di indurre un aumento della concentrazione intracellulare di cAMP con un meccanismo dose-dipendente accoppiato a TAAR-1 (Scanlan TS et

al., 2004), attualmente non è noto se TAAR1 è l'unico recettore endogeno con cui queste molecole possono interagire. In particolare, l'abbassamento della temperatura corporea e della funzionalità cardiaca non sono compatibili con una aumentata produzione di cAMP intracellulare. Una ipotesi plausibile potrebbe essere il fatto che in altri tessuti, esistano recettori della famiglia TAAR che non sono accoppiati a proteine G_s e che le tironamine possano quindi interagire con sottotipi recettoriali diversi (Zucchi R et al., 2006).

Un'altra alternativa potrebbe essere il fatto che le tironamine possano interagire con recettori diversi dai TAAR. Infatti, recentemente è stato dimostrato che T_1AM è in grado di accumularsi all'interno delle cellule suggerendo che esistano dei bersagli intracellulari (Saba A et al., 2010). Quindi, sembra che come la 3,5- T_2 , anche le tironamine siano in grado di agire direttamente a livello mitocondriale. Tuttavia, a differenza della T_2 , T_1AM e T_0AM non sembrano richiedere l'intervento di fattori citoplasmatici per produrre gli effetti mitocondriali e esse inducono conseguenze funzionali opposte. Infatti, mentre il trattamento di ratti ipotiroidei con 3,5- T_2 stimola l'attività respiratoria di mitocondri isolati da fegato (Lanni A et al., 1993) l'aggiunta in vitro di T_1AM o di T_0AM produce un effetto inibitorio che potrebbe spiegare la capacità delle tironamine di indurre ipotermia in vivo (Scanlan TS et al., 2004).

Sembra incongruente il fatto che T_0AM influenzi la velocità del consumo di O_2 in misura maggiore rispetto a T_1AM ed il fatto che, invece, è meno efficace nell'indurre ipotermia in vivo. Una possibile spiegazione potrebbe essere legata al fatto che T_1AM si accumula a livello intracellulare in misura maggiore rispetto a T_0AM (Ianculescu AG, 2009).

Poiché il flusso elettronico attraverso la membrana mitocondriale interna è uno dei principali processi legati alla produzione delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) è stato interessante valutare anche il rilascio di H_2O_2 , ottenuta a partire dall'anione superossido, prodotto della riduzione univalente dell'ossigeno, in una reazione catalizzata dalla SOD. La velocità di rilascio di H_2O_2 da parte della catena respiratoria mitocondriale è legata al grado di riduzione dei carriers elettronici autossidabili (Boveris A et Chance B, 1973), il quale aumenta quando il flusso degli elettroni lungo la catena diminuisce (Tzagoloff A., 1982). La riduzione della velocità del consumo di O_2 osservata in presenza di tironamine, indica che il flusso di elettroni diminuisce il che è consistente con l'aumento della produzione di H_2O_2 osservata con la misura del rilascio. In realtà, anche l'enzima monoaminoossidasi potrebbe contribuire alla produzione delle ROS mitocondriale. Infatti, questo enzima, che è localizzato sulla membrana mitocondriale esterna, catalizza l'ossidazione delle amine biogene con la produzione di H_2O_2 e quindi potrebbe catalizzare l'ossidazione delle tironamine incrementando la quota di perossido prodotta a livello mitocondriale. L'aumento del rilascio di H_2O_2 ottenuto in assenza di substrato respiratorio conferma che le tironamine possano subire

deaminazione ossidativa da parte della MAO con produzione di perossido. Poiché i risultati mostrano che il rilascio è più alto in presenza di T₀AM sembra che quest'ultima sia un substrato migliore per l'attività della MAO. I dati ottenuti permettono anche di stabilire che la deaminazione ossidativa delle tironamine produce solo un lieve decremento delle loro concentrazioni che al massimo sarebbe pari al 6% per T₀AM. Per determinare poi la produzione di perossido indipendente dalla MAO, sono state anche eseguite delle misure del rilascio sia in presenza che in assenza di pargilina, un inibitore sia della MAO di tipo A che di tipo B. I risultati ottenuti confermano che, oltre all'ossidazione dei carriers elettronici, vi è un altro processo che contribuisce all'aumento del rilascio del perossido dopo esposizione a T₁AM e T₀AM. Infatti, nonostante la minore influenza delle tironamine sul consumo di O₂ in presenza di piruvato/malato, è stato comunque osservato un aumento del rilascio da parte di mitocondri supportati da tali substrati ed incubati con T₁AM e T₀AM. Inoltre, l'osservazione che la presenza di pargilina riduce significativamente il rilascio di H₂O₂, conferma l'ipotesi di partenza. Infine, l'analisi del rilascio di H₂O₂ in assenza dei substrati respiratori ci permette anche di concludere che la produzione di perossido dovuta ai carriers elettronici autossidabili e quella dovuta all'attività enzimatica della MAO non sono additive. Questo dato, in realtà, non è sorprendente, dato che è ben documentato in letteratura che mitocondri respiranti sono in grado di rimuovere ampiamente l'H₂O₂ prodotta sia dalla catena respiratoria che da altre fonti (Zoccarato F et al., 2004) e in accordo con tale ipotesi è stato anche suggerito che i substrati respiratori portino alla rimozione del perossido prodotto dalla MAO favorendo in questo modo la rigenerazione del glutatione ridotto (Sandri G et al., 1990).

Le misure della velocità del rilascio effettuate in presenza di inibitori della catena respiratoria (rotenone (Rot) che blocca il trasferimento degli elettroni dal Complesso I all'ubichinone e antimicina (AA) che interrompe il flusso elettronico all'interno del sito ubichinone-citocromo b del complesso III) hanno consentito di avere ulteriori informazioni sulle possibili alterazioni indotte dalle tironamine a carico dei siti produttori di ROS. L'aggiunta di rotenone a mitocondri supportati con succinato porta ad una riduzione del rilascio di perossido (dati non riportati). È interessante notare che, in presenza di piruvato/malato, l'aggiunta di rotenone a mitocondri pre-incubati con entrambe le tironamine non porta ad alcuna variazione del rilascio di H₂O₂ rispetto al controllo. Invece, l'aggiunta di antimicina, che in mitocondri di controllo porta ad un aumento del rilascio sia in presenza di succinato che di piruvato/malato (dati non riportati), sembra non sortire alcun effetto su mitocondri pre-incubati con entrambe le tironamine in esame. I risultati ottenuti suggeriscono che le tironamine portino ad un parziale blocco del flusso elettronico agendo in un sito prossimo al sito di azione dell'antimicina. La successiva analisi dell'attività dei complessi della catena respiratoria mostra che l'incubazione con le tironamine causa una riduzione dell'attività del

Complesso III, che rappresenta appunto il principale bersaglio dell'antimicina. Un'azione a tale livello potrebbe anche spiegare i diversi effetti indotti dalla tironamine sulla respirazione mitocondriale supportata da substrati legati al Complesso I o al Complesso II. Infatti, poiché il flusso degli elettroni attraverso la catena è maggiore in presenza di succinato rispetto al piruvato/malato, è possibile che un blocco parziale attraverso il Complesso III possa ridurre il flusso elettronico nella respirazione sostenuta dal succinato ed avere un effetto minore su quello sostenuto dal piruvato/malato.

In conclusione, i dati ottenuti mediante l'attivazione preferenziale dell'isoforma recettoriale di tipo β dell'ormone tiroideo da parte dell'agonista GC-1 mettono in evidenza che l'agonista induce variazioni della capacità metabolica tessutale e mitocondriale epatica minori rispetto a quelle indotte dall'ormone tiroideo. Tali variazioni sono associate ad un livello di danno ossidativo più basso e sono dovute ad una minore influenza del GC-1 sulla sintesi dei carriers della catena respiratoria mitocondriale che si attua mediante una influenza dell'agonista sulla espressione di fattori coinvolti nella sintesi di tali proteine (NRFs). Importanza rilevante ha il fatto che il GC-1 è in grado di indurre tali variazioni a concentrazioni che non influenzano la frequenza cardiaca esplicando così gli effetti benefici dell'ormone tiroideo quali abbassamento dei livelli serici di colesterolo e modesto aumento del metabolismo basale dovuto ad un incremento del metabolismo aerobico dei tessuto bersaglio della T_3 . Quindi, i risultati ottenuti permettono anche di candidare il GC-1 come potenziale agente terapeutico nel trattamento di patologie quali obesità e dislipidemie.

Gli studi effettuati sulle tironamine, invece, hanno permesso di concludere che esse sono in grado di influenzare il consumo di ossigeno e la produzione di ROS da parte di mitocondri isolati da fegato di ratto ipotiroideo agendo direttamente a livello mitocondriale. I cambiamenti nello stato 3 della respirazione sostenuta da succinato sono stati ottenuti con una concentrazione di T_1AM pari a 10nM. Sebbene la distribuzione subcellulare di T_1AM non sia ancora nota, recenti scoperte hanno messo in luce che la sua concentrazione è più alta nel fegato rispetto a tutti gli altri tessuti, incluso il cuore, con una media di circa 92 pmol/grammo di tessuto che è dell'ordine di circa 10^{-7} M (Saba A et al., 2010). Questi risultati sono in accordo con la osservazione che, nei ratti, le concentrazioni di T_3 e T_4 (Escobar-Morreale HF et al., 1996; Saba A et al., 2010), così come le attività decarbossilasiche degli aminoacidi aromatici, sono più alte nel fegato che nel cuore (Inagaki C et Tanaka C, 1974.). Poiché, quindi, i risultati ottenuti mettono in evidenza che le tironamine sono in grado di influenzare la funzionalità mitocondriale a concentrazioni corrispondenti a quelle riscontrate in vivo, è plausibile che fisiologicamente, attraverso la mediazione di effetti opposti rispetto a quelli indotti dall'ormone tiroideo, esse possano agire da modulatori dell'azione della T_3

rendendo ancora più fine il processo di regolazione ormonale. Al fine di avere ulteriori chiarimenti a riguardo, sono però necessari ulteriori esperimenti da effettuare in vivo.

Bibliografia

- Ademoglu, E., Gokkusu, C., Yarman, S., Azizlerli, H., 1998.** The effect of methimazole on the oxidant and antioxidant system in patients with hyperthyroidism. *Pharmacol. Res.* 38, 93–96.
- Adali, M., Inal-Erden, M., Akalin, A., Efe, B., 1999.** Effects of propylthiouracil, propranolol, and vitamin E on lipid peroxidation and antioxidant status in hyperthyroid patients. *Clin. Biochem.* 32, 363–367.
- Ailhaud, G., Grimaldi, G., Negrel, R., 1992.** Cellular and molecular aspects of adipose tissue development. *Annu Rev Nutr* 12: 207–233.
- Allain, T.J., McGregor A.M., 1993.** Thyroid hormones and bone. *JEndocrinol* 139: 9–18.
- Alvarez-Donaldo, Gonzales-Sancho, J.M., Bernal, J., Munoz, 1998.** Developmental expression of the tenascin-C is altered by hypothyroidism in the rat brain. *Neuroscience* 84: 309–322.
- Andican, G., Gelisgen, R., Civelek, S., Seven, A., Seymen, O., Altug, T., Yigit, G., Burcak, G., 2004.** Oxidative damage to nuclear DNA in hyperthyroid rat liver: inability of vitamin C to prevent the damage. *J. Toxicol. Environ. Health* 67, 413–420.
- Arnold, S., Goglia, F., Kadenbach, B., 1998.** 3,5-Diiodothyronine binds to subunit Va of cytochrome-c oxidase and abolishes the allosteric inhibition of respiration by ATP. *Eur. J. Biochem.* 252, 325–330.
- Asayama, K., Dobashi, K., Hayashibe, H., Megata, Y., Kato, K., 1987.** Lipid peroxidation and free radical scavengers in thyroid dysfunction in the rat: a possible mechanism of injury to heart and skeletal muscle in hyperthyroidism. *Endocrinology* 121, 2112–2118.
- Asayama, K., Kato, K., 1990.** Oxidative muscular injury and its relevance in hyperthyroidism. *Free Radic. Biol. Med.* 8, 293-303.
- Attardi, G., Schatz, G., 1988.** Biogenesis of mitochondria. *Annu Rev Cell Biol*; 4:289–333
- Bednarek, J., Wysocki, H., Sowinski, J., 2004.** Oxidation products and antioxidant markers in plasma of patients with Graves, disease and toxic multinodular goiter: effect of methimazole treatment. *Free Radic. Res.* 38, 659–664.
- Baker, S.B., Klitgaard, H.M., 1952.** Metabolism of tissues excised from thyroxine-injected rats. *Am. J. Physiol.* 170, 81–86.
- Barré, H., Bailly, L., Rouanet, J.L., 1987.** Increased oxidative capacity in skeletal muscles from acclimated ducklings: A comparison with rats. *Comp Biochem Physiol* 88B, 519-522.
- Bassett, J.H., Harvey, C.B., Williams, G.R., 2003.** Mechanism of thyroid hormone receptor-specific nuclear and extra nuclear actions. *Mol Cell Endocrinol*; 213:1-11.
- Baxter, J.D., Dillmann, W.H., West, B.L., Huber, R., Furlow, J.D., Fletterick, R.J., Webb, P., Apriletti, J.W., Scanlan, T.S., 2001.** Selective modulation of thyroid hormone receptor action. *J Steroid Biochem Mol Biol* Jan-Mar; 76(1-5):31-42.

Baxter, J.D., Webb, P., Grover, G., Scanlan T.S., 2004. Selective activation of thyroid hormone signaling pathways by GC-1: a new approach to controlling cholesterol and body weight. *Trends Endocrinol Metab* 15:154–157.

Benvenga, S., Gregg, R.E., Robbins, J., 1988. Binding of thyroid hormones to human plasma lipoproteins. *J Clin Endocrinol Metab* 67:6–16.

Berkenstam, A., Kristensen, J., Mellström, K., Carlsson, B., Malm, J., Rehnmark, S., Garg, N., Andersson, C.M., Rudling, M., Sjöberg, F., Angelin, B., Baxter, J.D., 2008. The thyroid hormone mimetic compound KB2115 lowers plasma LDL cholesterol and stimulates bile acid synthesis without cardiac effects in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:663–667.

Bernal, J., 1999. Iodine and brain development. *Biofactors* 10: 271–276.

Bianchi, G., Solaroli, E., Zaccheroni, V., Grossi, G., Bargossi, A.M., Melchionda, N., Marchesini, G., 1999. Oxidative stress and anti-oxidant metabolites in patients with hyperthyroidism: effect of treatment. *Horm. Metab. Res.* 31, 620– 624.

Bigler, J., Hokanson, W., Eisenman, R.N., 1992. Thyroid hormone receptor transcriptional activity is potentially autoregulated by truncated forms of the receptor. *Mol Cell Biol*;12:2406–17.

Blennemann, B. Leahy, P., Kim, T.S., Freake H.C., 1995. Tissue-specific regulation of lipogenic mRNAs by thyroid hormone. *Mol Cell Endocrinol* 110: 1–8.

Bylund, D.B., Ray-Prenger, C., Murphy, T.J., 1988. α -2A and α -2B adrenergic receptor subtypes: antagonist binding in tissues and cell lines containing only one subtype. *J Pharmacol Exp Ther* 245:600–607.

Borngraeber S, Budny M-J, Chiellini, G., Cunha-Lima, S.T., Togashi, M., Webb, P., Baxter, J.D., Scanlan, T.S., Fletterick, R.J., 2003. Ligand selectivity by seeking hydrophobicity in thyroid hormone receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 000:15358–15363

Boveris, A., Chance, B., 1973. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. *Biochem. J.* 134, 707–716

Braulke, L.J., Klingenspor, M., DeBarber, A., Tobias, S.C., Grandy, D.K., Scanlan, T.S., Heldmaier, G., 2008. Iodothyronamine: a novel hormone controlling the balance between glucose and lipid utilisation. *J CompPhysiol B* 178:167–177

Braverman, L.E., Utiger, R.D. eds 2000. *Werner's and Ingbar's The Thyroid: A Fundamental and Clinical Text*, Lippincott Williams & Wilkins

Breen, J.J., Hickock N.J., Gurr, J.A., 1997. The rat TSH β gene contains distinct response elements for regulation by retinoids and thyroid hormone. *Mol Cell Endocrinol* 131: 137–146

Brent G.A. The molecular basis of thyroid hormone action, 1994. *N Engl J Med* 331: 847–853

Buu-Hoi N.P., Chanh P.-H., Petit L., 1966. Some biological effects of thyronamine. *Med Pharmacol Exp Int J Exp Med* 15:17–23

Cannon, B., Nedergaard, J., 2010. Thyroid hormones: igniting brown fat via the brain. *Nature Med.* 16, 965–967

Casa, F., Rochard, P., Rodier, A., Cassar-Malek, I., Marchal-Victorion, S., Wiesner, R.J., Cabello, G., Wrutniak, C., 1999. A variant form of the nuclear triiodothyronine receptor c-ErbA α 1 plays a direct role in regulation of mitochondrial RNA synthesis. *Mol Cell Biol* 19:7913–24

Chatterjee, V.K., Lee J.K., Rentoumis, A., Jameson, J.L., 1989. Negative regulation of the thyroid-stimulating hormone alpha gene by thyroid hormone: receptor interaction adjacent to the TATA box. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 9114–9118

Chatterjee, V.K., 1997. Resistance to thyroid hormone. *Horm. Res.* 4 (Suppl.), 43–46

Chiellini, G., Apriletti, J.W., Yoshihara, H.A. Baxter, J.D., Ribeiro, R.C., Scanlan, T.S., 1998. A high affinity subtype-selective agonist ligand for the thyroid hormone receptor. *Chem Biol* 5:299–306.

Chiellini, G., Frascarelli, S., Ghelardoni, S., Carnicelli, V., Tobias, S.C., DeBarber, A., Brogioni, S., Ronca-Testoni, S., Cerbai, E., Grandy, D.K., Scanlan, T.S., Zucchi, R., 2007. Cardiac effects of 3-iodothyronamine: a new aminergic system modulating cardiac function. *FASEB J* 21:1597-1608

Chomczynski, P., Soszynski, P.A., Frohman, L.A., 1993. Stimulatory effect of thyroid hormone on growth hormone gene expression in a human pituitary cell line. *J Clin Endocrinol Metab* 77: 281–285

Cioffi, F., Lanni, A., Goglia, F., 2010. Thyroid hormones, mitochondrial bioenergetics and lipid handling. *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.* 17, 402–407

Cody, V., Meyer, T., Dohler, K.D., Hesch, R.D., Rokos, H., Marko, M., 1984. Molecular structure and biochemical activity of 3,5,3'-triiodothyronamine. *Endocr Res* 10:91–99

Columbano, A., Pibiri, M., Deidda, M., Cossu, C., Scanlan, T.S., Chiellini, G., Muntoni, S., Ledda-Columbano, G.M., 2006. The thyroid hormone receptor-b agonist GC-1 induces cell proliferation in rat liver and pancreas. *Endocrinology* 147:3211–3218

Cooper, D.S., 2003. Hyperthyroidism. *Lancet* 362, 459–468

Cutler, R.G., 1985. Peroxide-producing potential of tissues: correlation with longevity of mammalian species. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 1620–1624

Davis, P.J., Davis, F.B., 2002. Nongenomic actions of thyroid hormone. *Thyroid*;12:459–66

De Barber, A.E., Geraci, T., Colasurdo, V.P., Hackenmueller, S.A., Scanlan, T.S., 2008. Validation of a liquid chromatography tandem mass spectrometry method to enable quantification of 3-iodothyronamine from serum. *J Chromatogr A* 1210:55–59

Dhillon, W.S., Bewick, G.A., White, N.E., Gardiner, J.V., Thompson, E.L., Bataveljic, A., Murphy, K.G., Roy, D., Patel, N.A., Scutt, J.N., Armstrong, A., Ghatei, M.A., Bloom, S.R., 2009. The thyroid hormone derivative 3-iodothyronamine increases food intake in rodents. *Diabetes Obes Metab* 11:251–260

Dillmann, W.H., 1990. Biochemical basis of thyroid hormone action in the heart. *Am J Med* 88: 626–630

Dillmann, W.H., 1996. Thyroid hormone action and cardiac contractility—a complex affair. *Endocrinology* 137: 799–801

Doyle, K.P., Suchland, K.L., Ciesielski, T.M., Lessov, N.S., Grandy, D.K., Scanlan, T.S., Stenzel-Poore, M.P., 2007. Novel thyroxine derivatives, thyronamine and 3-iodothyronamine, induce transient hypothermia and marked neuroprotection against stroke injury. *Stroke* 38:2569–2576

Dratman, M.B., 1974. On the mechanism of action of thyroxin, an amino acid analog of tyrosine. *J Theor Biol* 46:255–270

Dupre, S.M., Guissouma, J., Flamant, F., Seugnet, I., Scanlan, T.S., Baxter, J.D., Samarut, J., Demeneix, B.A., Becker, N., 2004. Both thyroid hormone receptor (TR)b1 and TRb2 isoforms contribute to the regulation of hypothalamic thyrotropin-releasing hormone. *Endocrinology* 145:2337–2345

Engelken, S.F., Eaton, R.P., 1981. The effects of altered thyroid status on lipid metabolism in the genetic hyperlipemic Zucker rat. *Atherosclerosis* 38:177–188

Erion, M.D., Cable, E.E., Ito, B.R., Jiang, H., Fujitaki, J.M., Finn, P.D., Zhang, B.H., Hou, J., Boyer, S.H., Van Poelje, P.D., Linemeyer, D.L., 2007. Targeting thyroid hormone receptor-b agonists to the liver reduces cholesterol and triglycerides and improves the therapeutic index. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:15490–15495

Ernster, L., Lee, C.P., 1967. Energy-linked reduction of NADC by succinate. *Methods in Enzymology* 10 729–738

Escobar-Morreale, H.F., Escobar del Rey, F., Obregón, M.J., Morreale de Escobar, G., 1996. Only the combined treatment with thyroxine and triiodothyronine ensures euthyroidism in all tissues of the thyroidectomized rat. *Endocrinology* 137, 2502–2940

Farsetti, A., Mitsushashi, T., Desvergne, B., Robbins, J., Nikodem, V.M., 1991. Molecular basis of thyroid hormone regulation of myelin basic protein gene expression in rodent brain. *J Biol Chem* 266: 23226– 23232

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

Fernandez, V., Barrientos, X., Kipreos, K., Valenzuela, A., Videla, L.A., 1985. Superoxide radical generation, NADPH oxidase activity, and cytochrome P450 content in an experimental hyperthyroid state: relation to lipid peroxidation. *Endocrinology* 117, 496–501

Fernandez, V., Llesuy, S., Solari, L., Kipreos, K., Videla, L.A., Boveris, A., 1988. Chemiluminescence and respiratory responses related to thyroid hormone-induced liver oxidative stress. *Free Radic. Res. Commun.* 5, 77– 84

- Fernandez, V., Simizu, K., Barros, S.B.M., Azzalis, L.A., Pimentel, R., Junqueira, V.B.C., Videla, L.A., 1991.** Effects of hyperthyroidism on rat liver glutathione metabolism: related enzymes, activities, efflux, and turnover. *Endocrinology* 129, 85– 91
- Fernandez, V., Videla, L.A., 1993a.** Influence of hyperthyroidism on superoxide radical and hydrogen peroxide production by rat liver submitochondrial particles. *Free Radic. Res. Commun.* 18, 329– 335
- Fernandez, V., Videla, L.A., 1993b.** 3,3',5-Triiodothyronine-induced hepatic respiration: effects of desferrioxamine and allopurinol in the isolated perfused rat liver. *Toxicol. Lett.* 69, 205– 210
- Fernandez, V., Videla, L.A., 1996a.** Hepatic glutathione biosynthetic capacity in hyperthyroid rats. *Toxicol. Lett.* 89, 85– 89
- Fernandez, V., Cornejo, P., Tapia, G., Videla, L.A., 1997.** Influence of hyperthyroidism on the activity of liver nitric oxide synthase in the rat. *Nitric Oxide Biol. Chem.* 1, 463–468
- Fernández, V., Tapia, G., Varala, P., Romanque, P., Cartier-Ugarte, D. and Videla, L.A. 2006.** Thyroid hormone-induced oxidative stress in rodents and humans: A comparative view and relation to redox regulation of gene expression. *Comp. Biochem. Physiol.* 142C, 231-239
- Flores-Delgado, G., Marsch-Moreno, M., Kuri-Harcuch, W., 1987.** Thyroid hormone stimulates adipocyte differentiation of 3T3 cells. *Mol Cell Biochem* 76: 35–43
- Forrest, D., Hanebuth, E., Smeyne, R.J., Everds, N., Stewart, C.L., Wehner, J.M., Curran, T., 1996.** Recessive resistance to thyroid hormone in mice lacking thyroid hormone receptor beta: Evidence for tissue-specific modulation of receptor function. *EMBO J* 15:3006-3015
- Forrest, D., Vennstrom, B., 2000.** Functions of thyroid hormone receptors in mice. *Thyroid* 10, 41–5
- Fraichard, A., Chassand, O., Plateroti, M., Roux J.P., Trouillas, J., DeHay, C., Legrand, C., Gauthier, K., Kedinger, M., Malaval, L., Rousset, B., Samanet, J., 1997.** The T3R α gene encoding a thyroid hormone receptor is essential for post-natal development and Thyroid hormone production. *EMBO J* 16: 4412-4420
- Freitas, F.R.S., Moriscot, A.S., Jorgetti, V., Soares, A.G., Passarelli, M., Scanlan, T.S., Brent, G.A., Bianco, A.C., Gouveia, C.H., 2003.** Sparing bone mass in rats treated with thyroid hormone receptor TR β -selective compound GC-1. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 285:E1135–E1141
- Freitas, F.R.S., Capelo, L.P., O'Shea, P.J., Jorgetti, V., Moriscot, A.S., Scanlan, T.S., Williams, G.R., Zorn, T.M., Gouveia, C.H., 2005.** The thyroid hormone receptor β -specific agonist GC-1 selectively affects bone development in hypothyroid rats. *J Bone Miner Res* 20:294–304
- Furlow, J.D., Yang, H.Y., Hsu, M., Lim, W., Ermio, D.J., Chiellini, G., Scanlan, T.S., 2004.** Induction of larval tissue resorption in *Xenopus laevis* tadpoles by the thyroid hormone receptor agonist GC-1. *J Biol Chem* 279:26555–26562

Garcia-Fernandez, L.F., Rauselle, E., Urade, Y., Hayaishi, O., Bernal, J., Munoz, A., 1997. Hypothyroidism alters the expression of prostaglandin D₂ synthase/beta trace in specific areas of the developing rat brain. *Eur J Neurosci* 9: 1566–1573

Gauthier, K., Chassande, O., Plateroti, M., Roux, J.P., Legrand, C., Pain, B., Rousset, B., Weiss, R., Trouillas, J., Samarut, J., 1999. Different functions for the thyroid hormone receptors TR α and TR β in the control of thyroid hormone production and post-natal development. *EMBO J* 18: 623-631

Geraci, T., Fjeld, C., Colasurdo, V., Samuels, M., Schuff, K., Scanlan, T., 2008. 3-Iodothyronamine (T₁AM) levels in human serum and tissue. Proc 79th Annual Meeting of the American Thyroid Association, Chicago, IL

Gharbi-Chihi J., Facchinetti, T., Berge-Lefranc J., Bonne J., Torresani, J., 1991. Triiodothyronine control of ATP-citrate lyase and malic enzyme during differentiation of a murine preadipocyte cell line. *Horm Metab Res* 23: 423–427

Ghelardoni, S., Suffredini, S., Frascarelli, S., Brogioni, S., Chiellini, G., Ronca-Testoni, S., Grandy, D.K., Scanlan, T.S., Cerbai, E., Zucchi, R., 2009. Modulation of cardiac ionic homeostasis by 3-iodothyronamine. *J Cell Mol Med* 13:3082–3090

Glick, Z., Wu, S.Y., Lupien, J., Reggio, R., Bray, G.A., Fisher, D.A., 1985. Meal-induced brown fat thermogenesis and thyroid hormone metabolism in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 249: E519–E524

Goglia, F., Liverini, G., Lanni, A., Iossa, S., Barletta, A., 1989. The effect of thyroid state on respiratory activities of three rat liver mitochondrial fractions. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 62,41-46

Goglia, F., Lanni, A., Horst, C., Moreno, M., Thoma, R., 1994. In vitro binding of 3, 5-di-iodo-L-thyronine to rat liver mitochondria. *J. Mol. Endocrinol.* 13, 275–282

Goglia, F., Moreno, M., Lanni, A., 1999. Actions of thyroid hormones at the cellular level: the mitochondrial target. *FEBS Lett.* 452, 115– 120

Gong, D.W., He, Y., Karas, M., Reitman, M., 1997. Uncoupling protein-3 is a mediator of thermogenesis regulated by thyroid hormone, beta3- adrenergic agonists, and leptin. *J Biol Chem* 272: 24129–24132

Goeptar, A.R., Scheerens, H., Vermeulen, N.P.E., 1995. Oxygen and xenobiotic reductase activities of cytochrome P450. *Crit. Rev. Toxicol.* 25, 25– 65

Gornall, A.G., Bardawill, C.J., David, M.M., 1949. Determination of serum proteins by mean of the biuret reaction. *J Biol Chem* 177, 751-766

Gothe, K., Wang, Z., Ng, L., Kindblom, J.M., Barros, A.C., Ohisson, C., Vennstrom, B., Forrest, D., 1999. Mice devoid of all known thyroid hormone receptors are viable but exhibit disorders of the pituitary-thyroid axis, growth, and bone maturation. *Genes Dev* 13:1329-1341

Greenspan, F.S., 1997. The thyroid gland. *Basic and clinical Endocrinology.* Greenspan FS, Strewler GJ, Appleton e Lange, Stamford, CA, USA: 192-262

Greenspan, S.L., Greenspan, F.S., 1999. The effect of thyroid hormone on skeletal integrity. *Ann Intern Med* 130: 750–758

Grimaldi, P., Djian, P., Negrel, R., Ailhaud, G., 1982. Differentiation of Ob 17 preadipocytes to adipocytes: requirement of adipose conversion factor(s) for fat cell cluster formation. *EMBO J* 1: 687–692

Grover, G.J., Mellström K, Ye L., Malm, J., Li, Y.L., Bladh, L.G., Sleph, P.G., Smith, M.A., George, R., Vennström, B., Mookhtiar, K., Horvath, R., Speelman, J., Egan, D., Baxter, J.D., 2003. Selective thyroid hormone receptor-b activation: a strategy for reduction of weight, cholesterol, and lipoprotein (a) with reduced cardiovascular liability. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 10067–10072

Grover, G.j., Egan, D.M., Sleph, P.G., Beehler, B.C., Chiellini, G., Nguyen, N.H., Baxter, J.D., Scanlan, T.S., 2004. Effects of the thyroid hormone receptor agonist GC-1 on metabolic rate and cholesterol in rats and primates: selective actions relative to 3,5,3'-triiodo-L-thyronine. *Endocrinology* 145:1656-61

Hansson, P., Valdermarsson, S., Nilsson Ehke, P., 1983. Experimental hyperthyroidism in man; effects on plasma lipoprotein, lipoprotein lipase and hepatic lipase. *Horm Metab Res* 15:449-452

Hayashi, Y., Refetoff, S., 1995. A mouse model of resistance to thyroid hormone in liver produced by somatic gene transfer of a mutant thyroid hormone receptor. *Proc Endocr Soc Meet Washington DC* p. OR34–6

Hart, M.E., Suchland, K.L., Miyakawa, M., Bunzow, J.R., Grandy, D.K., Scanlan, T.S., 2006. Trace amine-associated receptor agonists: synthesis and evaluation of thyronamines and related analogues. *J Med Chem* 49:1101–1112

Heat R.L., Tappel A.L., 1976. A new sensitive assay for the measurement of hydroperoxides. *Anal Biochem* 76: 184–191

Hillmann, G., Keil, B., Taslimi, P., 1958. Determination of thyroxamine in the thyroid gland and plasma. *Z Naturforsch B* 13B:820–821

Hillmann, G., Keil, B., 1961. The distribution of I-131-labelled thyroxamine in the body of the rat. *Z Gesamte Exp Med* 134:380–382

Himms-Hagen, J., 1989. Brown adipose tissue thermogenesis and obesity. *Prog Lipid Res* 28: 67–115

Hyslop, P.A., Sklar, L.A., 1984. A quantitative fluorimetric assay for the determination of oxidant production by polymorphonuclear leukocytes: its use in the simultaneous fluorimetric assay of cellular activation processes. *Anal Biochem* 141: 280 - 286

Hiyoshi, H., Yanagimachi, M., Ito, M., Ohtsuka, I., Yoshida, I., Saeki, T., Tanaka, H., 2000. Effect of ER-27856, a novel squalene synthase inhibitor, on plasma cholesterol in rhesus monkeys: comparison with 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibitors. *J. Lipid Res* 41, 1136–1144

Horst, C., Rokos, H., Seitz, H.J., 1989. Rapid stimulation of hepatic oxygen consumption by 3,5-diiodo-L-thyronine. *Biochem. J.* 261, 945–950

- Huang, S.A., 2005.** Physiology and pathophysiology of type 3 deiodinase in humans. *Thyroid* 15:875–881
- Huh, K., Kwon, T.H., Kim, J.S., Park, J.M., 1998.** Role of the hepatic xanthine oxidase in thyroid dysfunction: effect of thyroid hormones in oxidative stress in rat liver. *Arch. Pharm. Res.* 21, 236– 240
- Jacovic, S., Swift, H.H., Gross, N.J., Rabinowitz, M., 1978.** Biochemical and stereological analysis of rat liver mitochondria in different thyroid states
- Ianculescu, A.G., Giacomini, K.M., Scanlan, T.S., 2009.** Identification and characterization of 3-iodothyronamine intracellular transport. *Endocrinology* 150:1991–1999
- Inagaki, C., Tanaka, C., 1974.** Neonatal and senescent changes in L-aromatic amino acid decarboxylase and monoamine oxidase activities in kidney, liver, brain and heart of the rat. *Jpn. J. Pharmacol.* 24, 439–446
- Irrcher, I., Adhietty, P.J., Sheehan, T., Joseph, A.M., Hood, D.A., 2003.** PPARgamma coactivator-1alpha expression during thyroid hormone- and contractile activity-induced mitochondrial adaptations. *American Journal of Physiology* 284 1669–1677
- Ishikawa, Y., Genge, B.R., Wuthier, R.E., Wu, L.N., 1998.** Thyroid hormone inhibits growth and stimulates terminal differentiation of epiphyseal growth plate chondrocytes. *J Bone Miner Res* 13: 1398–1411
- Jekabsons, M.B., Gregorie, F.M., Schonfeld-Wardenn, N.A., Warden, C.H., Horwitz, B.A., 1999.** T₃ stimulates resting metabolism and UCP-2 and UCP-3 mRNA but not nonphosphorylating mitochondrial respiration in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 277: E380–E389
- Johansson, L., Rudling, M., Scanlan, T.S., Lundåsen, T., Webb, P., Baxter, J., Angelin, B., Parini, P., 2005.** Selective thyroid receptor modulation by GC-1 reduces serum lipids and stimulates steps of reverse cholesterol transport in euthyroid mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:10297–10302
- Johnston, T.P., Nguyen, L.B., Chu, W.A., Shefer, S., 2001.** Potency of select statin drugs in a new mouse model of hyperlipidemia and atherosclerosis. *Int. J. Pharmaceut.* 229, 75–86
- Jorgensen, E.C., 1978.** Thyroid hormones and analogs. I. Synthesis, physical properties and theoretical calculations. In: Li CH (ed) *Hormonal proteins and peptides*. Academic Press, New York, pp 57–105 11
- Jorgensen, E.C., 1978.** Thyroid hormones and analogs. II. Structure- activity relationships. In: Li CH (ed) *Hormonal proteins and peptides*. Academic Press, New York, pp 107–20
- Katzenellenbogen, J.A., Katzenellenbogen, B.S., 1996.** Nuclear hormone receptors: Ligand-activated regulators of transcription and diverse cell responses. *Chem Biol* 3: 529-536
- Klatt, P., Lamas, S., 2000.** Regulation of protein function by S-glutathiolation in response to oxidative and nitrosative stress. *Eur. J. Biochem.* 267, 4928– 4944

Klaushofer, K., Varga, F., Glantschnig, H., Fratzl-Zelmann, N., Czerwenka, E., Leis, H.J., Koller, K., Peterlik, M., 1995. The regulatory role of thyroid hormones in bone cell growth and differentiation. *J Nutr* 125: 1996S–2003S

Klein, I., 1990. Thyroid hormone and cardiovascular system. *Am J Med* 88:631-637

Klein, I., Ojama, A.K., 1998. Thyrotoxicosis and the heart. *Endocrinol Metab Clin N Am* 27: 51–62

Klieverik, L.P., Foppen, E., Ackermans, M.T., Serlie, M.J., Sauerwein, H.P., Scanlan, T.S., Grandy, D.K., Fliers, E., Kalsbeek, A., 2009. Central effects of thyronamines on glucose metabolism in rats. *J Endocrinol* 201:377–386

Komosinska-Vessey, K., Olczyk, K., Kucharz, E.J., Marcisz, C., Winsz- Szczotka, K., Kotulska, A., 2000. Free radical activity and antioxidant defense mechanisms in patients with hyperthyroidism due to Graves' disease during therapy. *Clin. Chim. Acta* 300, 107– 117

Kohrle, J., 2002. Iodothyronine deiodinases. *Methods Enzymol* 347:125–167

Kumar, C. T., Reddy, V. K., Prasad, M., Thyagaraju, K. and Reddanna, P., 1992. Dietary supplementation of vitamin E protects heart tissue from exercise-induced oxidant stress. *Mol. Cell. Biochem.* 111, 109-115

Landriscina, C., Petragallo, V., Morini, P., Marcotrigiano, G.O., 1988. Lipid peroxidation in rat liver microsomes: I. Stimulation of the NADPH– cytochrome P450 reductase-dependent process in hyperthyroid state. *Biochem. Int.* 17, 385– 393

Lanni, A., Moreno, M., Cioffi, M., Goglia, F., 1993. Effect of 3,30-di-iodothyronine and 3,5-di-iodothyronine on rat liver mitochondria. *J. Endocrinol.* 136, 59–64

Lanni, A., Moreno, M., Lombardi, A., Goglia, F., 1994. Rapid stimulation in vitro of rat liver cytochrome oxidase activity by 3,56-diiodothyronina and by 3,30- diiodothyronine. *Mol. Cell. Endocrinol.* 99, 89–94

Lanni, A., Moreno, M., Lombardi, A., Goglia, F., 1996. Calorigenic effect of diiodothyronines in the rat. *J. Physiol. (London)* 494, 831–837

Lanni, A., Lombardi, A., Goglia, F., 2003. Thyroid hormone and uncoupling proteins. *FEBS Lett.* 543, 5 – 10

Larkin, S., Mull, E., Miao, W., Pittner, R., Albrandtk, K., Moore, C., Young, A., Denaro, M., Beaumontk, K.,1997. Regulation of the third member of the uncoupling protein family, UCP3, by cold and thyroid hormone. *Biochem Biophys Res Commun* 240: 222–227

Lazar, M.A., 1993. Thyroid hormone receptors: Multiple forms, multiple possibilities. *Endocr rev* 14:184-19

Liggett, S.B., 2004. The two-timing thyroid. *Nat Med* 10:582– 583

- Lin, H.Y., Davis, F.B., Gordinier, J.K., Martino, L.J., Davis, P.J., 1999.** Thyroid hormone induces activation of mitogen-activated protein kinase in cultured cells. *Am J Physiol* 276:C1014–C1024
- Lombardi, A., De Lange, P., Silvestri, E., Busiello, R.A., Lanni, A., Goglia, F., Moreno, M., 2009.** 3,5-Diiodo-L-thyronine rapidly enhances mitochondrial fatty acid oxidation rate and thermogenesis in rat skeletal muscle: AMP-activated protein kinase involvement. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 296: E497–E50
- Lowell, B.B., Spiegelman, B.M., 2000.** Towards a molecular understanding of adaptative thermogenesis. *Nature* 404:652–660
- Madison, L.D., Ahlquist, J.A., Rogers, S.D., Jameson, J.L., 1993.** Negative regulation of the glycoprotein hormone alpha gene promoter by thyroid hormone: mutagenesis of a proximal receptor binding site preserves transcriptional repression. *Mol Cell Endocrinol* 94: 129– 136
- Mangelsdorf, D.J., Thummel, C., Beato, M., Herrlich, P., Schuts, G., Umesono, K., Blumberg, B., Kastner, P., Mark, M., Chambon, P., 1996.** The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 83: 835–839
- Manzano, J., Morte, B., Scanlan, T.S., Bernal, J., 2003.** Differential effects of triiodothyronine and the thyroid hormone receptor b-specific agonist GC-1 on thyroid hormone target genes in the brain. *Endocrinology* 144:5480–548
- Martindale, J.L., Holbrook, N.J., 2002.** Cellular responses to oxidative stress: signaling for suicide and survival. *J. Cell. Physiol.* 192, 1 –15
- Meunier, P.J., Bianchi, G.G.S., Edouard, C.M., Bernard, J.C., Courpron, P., Vignon, G.E., 1972.** Bony manifestations of thyrotoxicosis. *Orthoped Clin N Am* 3: 745–774
- Meyer, T., Hesch, R.D., 1983.** Triiodothyronamine α - β - adrenergic metabolite of triiodothyronine?, *Horm Metab Res* 15:602–606
- Miyabara, E.H., Aoki, M.S., Soares, A.G., Saltao, R.M., Vilicev, C.M., Passarelli, M., Scanlan, T.S., Gouveia, C.H., Moriscot, A.S., 2005.** Thyroid hormone receptor-b-selective agonist GC-24 spares skeletal muscle type I to II fiber shift. *Cell Tissue Res* 321:233–241
- Mollica, M.P., Lionetti, L., Moreno, M., Lombardi, A., De Lange, P., Antonelli, A., Lanni A., Cavaliere, G., Barletta, A., Goglia, F., 2009.** 3,5-Diiodo-L-thyronine, by modulating mitochondrial functions, reverses hepatic fat accumulation in rats fed a high-fat diet. *J Hepatol* 51:363–370
- Moreno, M., Lombardi, A., Beneduce, L., Silvestri, E., Pinna, G., Goglia, F., Lanni, A., 2002.** Are the effects of T3 on resting metabolic rate in euthyroid rats entirely caused by T3 itself? *Endocrinology* 143, 504– 510
- Moreno, M., De Lange, P., Lombardi, A., Silvestri, E., Lanni, A., Goglia, F., 2008.** Metabolic effects of thyroid hormone derivatives. *Thyroid* 18:239–253

- Morte, B., Manzano, J., Scanlan, T.S., Vennström, B., Bernal, J., 2002.** Deletion of the thyroid hormone receptor $\alpha 1$ prevents the structural alterations of the cerebellum induced by hypothyroidism. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:3985–3989
- Morte, B., Manzano, J., Scanlan, T.S., Vennström, B., Bernal, J., 2004.** Aberrant maturation of astrocytes in thyroid hormone receptor $\alpha 1$ knockout mice reveals an interplay between thyroid hormone receptor isoforms. *Endocrinology* 145:1386–1391
- Mosekilde, L., Eriksen, E.F., Charles, P., 1990.** Effects of thyroid hormones on bone and mineral metabolism. *Endocrinol Metab Clin N Am* 19: 35–63
- Mousa, S.A., O'Connor, L.J., Bergh, J.J., Davis, F.B., Scanlan, T.S., Davis, P.J., 2005.** The proangiogenic action of thyroid hormone analogue GC-1 is initiated at an integrin. *J Cardiovasc Pharmacol* 46:356–360
- Mundy, G.R., Shapiro, J.L., Bandelin, J.G., Canalis, E.M., Raisz, L.G., 1976.** Direct stimulation of bone resorption by thyroid hormones. *J Clin Invest* 58: 529–534
- Munoz, A., Bernal, J., 1997.** Biological activities of thyroid hormone receptors. *Eur J Endocrinol* 137:443-445
- Murakami, T., Shimomura, Y., Yosimura, A., Sokabe, M., Fujitsuka, N., 1998.** Induction of nuclear respiratory factor-1 expression by an acute bout of exercise in rat muscle. *Biochim Biophys Acta* 1381, 113-122
- O'Shea, P.J. and Williams, G.R., 2002.** Insight into the physiological actions of thyroid hormone receptors from genetically modified mice. *J. Endocrinol.* 175, 553–570
- Ojamaak, K., Sabet, A., Kenessey, A., Shenoy, R., Klein I., 1999.** Regulation of rat cardiac Kv1.5 gene expression by thyroid hormone is rapid and chamber specific. *Endocrinology* 140: 3170–3176
- Oppenheimer, J.H., Schwartz, H.L., Mariash, C.N., Kinlaw, W.B., Wong, N.C.W., Freake, H.C., 1987.** Advances in our understanding of thyroid hormone action at the cellular level. *Endocr Rev* 8: 288–308
- Oppenheimer, J.H., Schwartz, H.L., Lane, J.T., Thompson, M.P., 1991.** Functional relationship of thyroid hormone-induced lipogenesis, lipolysis, and thermogenesis in the rat. *J Clin Invest* 87: 125–132
- Oppeneihmer, J.H., Schwartz, H.L., Strait, K.A., 1994.** Thyroid hormone action: The plot thickens. *Eur J Endocrinol* 130:15-24
- Oppenheimer, J.H., Schwartz, H.L., Straitka, K.A., 1995.** An integrated view of thyroid hormone actions in vivo. In: *Molecular Endocrinology: Basic Concepts and Clinical Correlations*, edited by Weintraub B. New York: Raven p. 249–268
- Oppenheimer, J.H., Schwartz, H.L., Strait, K.A., 1996.** The molecular basis of thyroid hormone action. In: Barverman, L.E., Utiger, R.D. (Eds.), *Werner and Ingbar's The Thyroid. A Fundamental and Clinical Text*, 7th edR Lippincott-Raven, New York, pp. 161–184

Oppenheimer, J.H., Schwartz, H.L., 1997. Molecular basis of thyroid hormone- dependent brain development. *Endocr Rev* 18: 462–475

Pachucki, J., Burmeister, L.A., Larsen, P.R., 1999. Thyroid hormone regulates hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel (HCN2) mRNA in the rat heart. *Circ Res* 85: 498–503

Palmer, G., Horgan, D.J., Tisdale, H., Singer, T.P., Beinert, H., 1968. Studies on the respiratory chain-linked reduced nicotinamide adenine di nucleotide dehydrogenase. XIV. Location of the sites of inhibition of rotenone, barbitures and piericidin by means of electron paramagnetic resonance spectroscopy. *J.Biol.Chem.*243, 844-847

Panova, N.G., Zemskova, M.A., Axenova, L.N., Medvedev, A.E., 1997. Does isatin interact with rat brain monoamine oxidase in vivo? *Neurosci.Lett.*233, 58-60

Piehl, S., Heberer, T., Balizs, G., Scanlan, T.S., Smits, R., Kokschi, B., Köhrle, J., 2008. Thyronamines are isozyme-specific substrates of deiodinases. *Endocrinology* 149:3037–3045

Piehl, S., Heberer, T., Balizs, G., Scanlan, T.S., Köhrle, J., 2008. Development of a validated liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for the distinction of thyronine and thyronamine constitutional isomers and for the identification of new deiodinase substrates. *RapidCommunMass Spectrom* 22:3286–3296

Pietsch, C.A., Scanlan, T.S., Anderson, R.J., 2007. Thyronamines are substrates for human liver sulfotransferases. *Endocrinology* 148:1921–1927

Pillar, T.M., Seitz, H.J., 1997. Thyroid hormone and gene expression in the regulation of mitochondrial respiratory function. *Eur J Endocrinol* 136:231–9

Pinna, G., Brödel, O., Visser, T., Jeitner, A., Grau, H., Eravci, M., Meinhold, H., Baumgartner, A., 2002. Concentrations of seven iodothyronine metabolites in brain regions and the liver of the adult rat. *Endocrinology* 143:1789–1800

Pittman, C.S., 1979. Hormone metabolism. In: DeGroot LJ, ed. *Endocrinology*. 1st ed. New York: Grune, Stratton; 365–372

Poli, G., Leonarduzzi, G., Biasi, F., Chiarpotto, E., 2004. Oxidative stress and cell signaling. *Curr. Med. Chem.* 11, 1163– 1182

Puigserver, P., Wu, Z., Park, C.W., Graves, R., Wright, M., Spiegelman, B.M., 1998. A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell* 92 829–839

Puigserver, P., Wu, Z., Andersson, U., Zhang, A., Adelmant, G., Mootha, A., Troy, A., Cinti, S., Lowell, B., Scarpulla, R.C., Spiegelman, B.M. 1999. Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and function through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell* 98, 115-124

Rabie, A., Legrand, J., 1973. Effects of thyroid hormone and undernourishment on the amount of synaptosomal fraction in the cerebellum of the young rat. *Brain Res* 61: 267–278

- Rabie, A., Favre, C., Clavel, M.C., Legrand, J., 1977.** Effects of thyroid dysfunction on the development of the rat cerebellum, with special reference to cell death within the internal granular layer. *Brain Res* 120: 521–531
- Ram, P.A., Waxman, D.J., 1992.** Thyroid hormone stimulation of NADPH P450 reductase expression in liver and extrahepatic tissues. *J. Biol. Chem.* 267, 3294–3301
- Reznick, A.Z., Packer, L., 1994.** Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol* 233: 357–363
- Refetoff, S., Weiss, R.E., Usala, S.J., 1993.** The syndromes of resistance to thyroid hormone. *Endocr. Rev.* 14, 348–399 10
- Ragan, M.T., Wilson, V.M., Darley-USmar, P.N., Lowe, P.N., 1987.** Sub-fractionation of mitochondria and isolation of the proteins of oxidative phosphorylation. In *Mitochondria: A practical approach*, pp 79-112. Eds VM Darley-USmar, D Rickwood, MT Wilson Oxford: IRL Press
- Regard, J.B., Kataoka, H., Cano, D.A., Camerer, E., Yin, L., Zheng, Y.W., Scanlan, T.S., Hebrok, M., Coughlin, S.R., 2007.** Probing celltype-specific functions of Gi in vivo identifies GPCR regulators of insulin secretion. *J Clin Invest* 117:4034–4043
- Ribeiro, M.O., Carvalho, S.D., Schultz, J.J., Chiellini, G., Scanlan, T.S., Bianco, A.C., Brent, G.A., 2001.** Thyroid hormone –sympathetic interaction and adaptative thermogenesis are thyroid hormone receptor isoform-specific. *J Clin Invest* 108:97-105
- Ribeiro, M.O., Bianco, S.D., Kaneshige, M., Schultz, J.J., Cheng, S.Y., Bianco, A.C., Brent, G.A., 2010.** Expression of uncoupling protein 1 in mouse brown adipose tissue is thyroid hormone receptor- β isoform specific and required for adaptive thermogenesis. *Endocrinology* 151:432–440
- Ridgway, N.D., Dolphin, P.J., 1985.** Serum activity and hepatic secretion of lecithin:cholesterol acyltransferase in experimental hypothyroidism and hypercholesterolemia. *J Lipid Res* 26: 1300–1313
- Rivkess, S.A., Bode, H.H., Crawford, J.D., 1988.** Long-term growth in juvenile acquired hypothyroidism: the failure to achieve normal adult stature. *N Engl J Med* 318: 599–602
- Roherer, D.K., Dillmann, W.H., 1988.** Thyroid hormone markedly increases the mRNA coding for sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase in the rat heart. *J Biol Chem* 263: 6941–6944
- Ross, D.S., 1994.** Hyperthyroidism, thyroid hormone therapy, and bone. *Thyroid* 4: 319–326
- Rubio, R., Raasmaia, A., Silva, J.E., 1995.** Thyroid hormone and norepinephrine signaling in brown adipose tissue: differential effects of thyroid hormone on beta 3-adrenergic receptors in brown and white adipose tissue. *Endocrinology* 136: 3277–3284
- Saba, A., Chiellini, G., Frascarelli, S., Marchini, M., Ghelardoni, S., Raffaelli, A., Tonacchera, M., Vitti, P., Scanlan, T.S., Zucchi, R., 2010.** Tissue distribution and cardiac metabolism of 3-iodothyronamine. *Endocrinology* 151, 5063–5073
- Samuels, H.H., Forman, B.M., Horowitz, Z.D., Ye, Z.S., 1988.** Regulation of gene expression by thyroid hormone. *J. Clin. Invest.* 81, 957–967

Sandri, G., Panfili, E., Ernster, L., 1990. Hydrogen peroxide production by monoamine oxidase in isolated rat-brain mitochondria: its effect on glutathione levels and Ca²⁺ efflux. *Biochim. Biophys. Acta* 1035, 300–305

Scanlan, T.S., Yoshihara, H.A., Nguyen, N.H., Chiellini G., 2001. Selective thyromimetics: tissue-selective thyroid hormone analogs. *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* 4, 614–622

Scanlan, T.S., Suchland, K.L., Hart, M.E., Chiellini, G., Huang, Y., Kruzich, P.J., Frascarelli, S., Crossley, D.A., Bunzow, J.R., Ronca-Testoni, S., Lin, E.T., Hatton, D., Zucchi, R., Grandy, D.K., 2004. 3-Iodothyronamine is an endogenous and rapid-acting derivative of thyroid hormone. *Nat Med* 10:638-642

Scanlan, T.S., 2009. Minireview: 3-iodothyronamine (T₁AM): a new player on the thyroid endocrine team? *Endocrinology* 150:1108–1111

Scarabottolo, L., Trezzi, E., Roma, P., Catapano, A.L., 1986. Experimental hyperthyroidism modulates the expression of the low density lipoprotein receptor by the liver. *Atherosclerosis* 59: 329-333

Scarpulla, R.C., 2002. Nuclear activators and coactivators in mammalian mitochondrial biogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta* 1576 1–14

Scarpulla, R.C., 2008. Transcriptional paradigms in Mammalian mitochondrial biogenesis and function. *Physiol Rev* 88, 611-638

Schild, L., Reinheckel, T., Wiswedel, I., Augustin, W., 1997. Short-term impairment of energy production in isolated rat liver mitochondria by hypoxia/reoxygenation: involvement of oxidative protein modification. *Biochem J* 328: 205–210

Schwartz, H.L., Strait, K.A., Ling, N.C., Oppenheimer, J.H., 1992. Quantitation of rat tissue thyroid hormone binding receptor isoforms by immunoprecipitation of nuclear triiodothyronine binding capacity. *J Biol Chem* 267:11794-11799

Schwartz, H.L., Lazar, M.A., Oppenheimer, J.H., 1994. Widespread distribution of immunoreactive thyroid hormone β_2 receptor (TR β_2) in the nuclei of extrapituitary rat tissue. *J Biol Chem* 269: 24777-24782

Seo, H., Vassart, G., Brocas, H., Refetoff, S., 1977. Triiodothyronine stimulates specifically growth hormone mRNA in rat pituitary tumor cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 2054–2058

Severson, D.L., Fletcher, T., 1981. Effect of thyroid hormones on acid cholesterol ester hydrolase activity in rat liver, heart and epididymal fat pads. *Biochim Biophys Acta* 675: 256–264

Sewerynek, J., Wiktorska, J., Nowak, D., Lewinski, A., 2000. Methimazole protection against oxidative stress induced by hyperthyroidism in Graves disease. *Endocr. Regul.* 34, 83–89

Sheehan, T.E., Kumar, P.A., Hood, D.A., 2004. Tissue specific regulation of cytochrome c oxidase subunit expression by thyroid hormone. *American Journal of Physiology* 286 E968–E974

Shupnik, M.A., Greenspan, S.L., Ridgway, E.C., 1986. Transcriptional regulation of thyrotropin subunit genes by thyrotropin-releasing hormone and dopamine in pituitary cell culture. *J Biol Chem* 261:12675–12679

Shupnik, M.A., Chin, W.W., Ridgway, E.C., 1989. T₃ regulation of TSH gene expression. *Endocr Res* 15: 579–599

Sies, H., 1986. Biochemistry of oxidative stress. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* 25, 1058–1071

Silva, J.E., 1995. Thyroid hormone control of thermogenesis and Energy balance. *Thyroid* 5:481-492

Silva, J.E., 2001. The multiple contributions of thyroid hormone to heat production. *J Clin Invest* 108:35-37

Simon, L.M., Robin, E.D. ,1971. Relationship of cytochrome oxidase activity to vertebrate total and organ oxygen consumption. *Int J Biochem* 2: 560-573

Simon-Giavarotti, K.A., Rodrigues, L., Rodrigues, T., Junqueira, V.B.C., Videla, L.A., 1998. Liver microsomal parameters related to oxidative stress and antioxidant systems in hyperthyroid rats subjected to acute lindane treatment. *Free Radic. Res.* 29, 35– 42

Simon-Giavarotti, K.A., Giavarotti, L., Gomes, L.F., Lima, A.L., Veridiano, A.M., Garcí'a, E.A., Mora, O.A., Fernandez, V., Videla, L.A., Junqueira, V.B.C., 2002. Enhancement of lindane-induced liver oxidative stress and hepatotoxicity by thyroid hormone is reduced by gadolinium chloride. *Free Radic. Res.* 36, 1033– 1039

Sir, T., Wolff, C., Soto, J.R., Armas-Merino, R., 1987. Relationship between hepatic levels of glutathione and sulphobromophthalein retention in hyperthyroidism. *Clin. Sci.* 73, 235– 237

Soboll, S., 1993. Thyroid hormone action on mitochondrial energy transfer. *Biochim. Biophys. Acta* 1144, 1 – 16

Snead, A.N., Santos, M.S., Seal, R.P., Miyakawa, M., Edwards, R.H., Scanlan, T.S., 2007. Thyronamines inhibit plasma membrane and vesicular monoamine transport. *ACS Chem Biol* 2:390–398

Schwartz, H. L., Strait, K. A., Ling, N. C. and Oppenheimer, J. H., 1992. Quantitation of rat tissue thyroid hormone binding receptor isoforms by immunoprecipitation of nuclear triiodothyronine binding capacity. *J. Biol. Chem.* 267, 11794-11799

Tan, K.C., Shiu, S.W., Kung, A.W., 1998. Effect of thyroid dysfunction on high-density lipoprotein subfraction metabolism: roles of hepatic lipase and cholesteryl ester transfer protein. *J Clin Endocrinol Metab* 83: 2921–2924

Tan, E.S., Naylor, J.C., Groban, E.S., Bunzow, J.R., Jacobson, M.P., Grandy, D.K., Scanlan, T.S., 2009. The molecular basis of species- specific ligand activation of trace amine-associated receptor 1 (TAAR(1)). *ACS Chem Biol* 4:209–220

Tapia, G., Cornejo, P., Fernandez, V., Videla, L.A., 1999. Protein oxidation in thyroid hormone-induced liver oxidative stress: relation to lipid peroxidation *Toxicol. Lett.* 106, 209– 214

Tata, J.R., Ernster, L., Lindberg, O., 1962. Control of basal metabolic rate by thyroid hormones and cellular function. *Nature* 193, 1058– 1060

Taylor, A.H., Stephan, Z.F., Steele, R.E., Wong, N.C., 1997. Beneficial effects of a novel thymomimetic on lipoprotein metabolism. *Mol Pharmacol* 52:542-7

Thannickal, V.J., Fanburg, B.L., 2000. Reactive oxygen species in cell signaling. *Am. J. Physiol., Lung Cell. Mol. Physiol.* 279, L1005– L1028

Thompson, C.C., 1996. Thyroid hormone-responsive genes in developing cerebellum include a novel synaptotagmin and a hairless homolog. *J Neurosci* 16: 7832–7840

Trost, S.U., Swanson, E., Ioss, B., Wang-Iverson, D.B., Zhang, H., Volodarsky, T., Grover, G.J., Baxter, J.D., Chiellini, G., Scanlan, T.S., Dillmann, W.H., 2000. The thyroid hormone receptor-beta-selective agonist GC-1 differentially affects plasma lipids and cardiac activity. *Endocrinology* 141:3057-64

Tsukamoto, H., Lin, M., 1997. The role of Kupffer cells in liver injury. In: Wisse, E., Knook, D.L., Balabaud, C. (Eds.), *Cells of the Hepatic Sinusoid, Kupffer Cell Foundation*. Leiden, The Netherlands, pp. 244– 250

Tuca, A., Giralt, M., Villarroya, F., Vinas, O., Mampel, T., Iglesias, R., 1993. Ontogeny of thyroid hormone receptors and c-erbA expression during brown adipose tissue development: evidence of fetal acquisition of the mature thyroid status. *Endocrinology* 132: 1913–1920

Turrens J.F., Alexandre A., Lehninger A.L., 1985. Ubisemiquinone is the electron donor for superoxide formation by complex III of heart mitochondria. *Arch.Biochem.Biophys.* 237, 408-414

Tzagoloff, A., 1982. *Mitochondria*. Plenum Press, New York Utiger LEB, Utiger RD. The thyroid:A Fundamental and Clinical Text

Valdermarsson, S., Nilsson Ehke, P., 1983. Experimental hyperthyroidism in man; effects on plasma lipoprotein, lipoprotein lipase and hepatic lipase. *Horm Metab Res* 15:449-452

Valcavir, R., Ieguez, C., Zini, M., Muruais, C., Casanueva, F., Portioli, I., 1993. Influence of hyperthyroidism on growth hormone secretion. *Clin Endocrinol* 38: 515–522

Valente, M., De Santo, C., De Martino, Rosaroll, P., Di Maio, V., Di Meo, S., De Leo, T., 1995. The direct effect of thyroid hormone on cardiac chronotropism. *Arch Int Physiol Biochim* 97, 431-440

Vanamala, S.K., Ryeom, S.W., McKeon, F., Hacker, T.A., Heberer, C.J., Sharma, A., Kayi, H., 2003. Calcineurin mediates triiodothyronine induced cardiac hypertrophy in mice. *Circulation*;108 (Suppl IV):47

Venditti, P., Di Meo, S., De Leo, T., 1996. Effect of thyroid state on characteristics determining the susceptibility to oxidative stress of mitochondrial fractions from rat liver. *Cell. Physiol. Biochem.* 6: 283-295

- Venditti, P., Balestrieri, M., Di Meo, S., De Leo, T., 1997.** Effect of thyroid state on lipid peroxidation, antioxidant defenses, and susceptibility to oxidative stress in rat tissues. *J. Endocrinol.* 155, 151– 157
- Venditti, P., De Rosa, R., Di Meo, S., 2003.** Effect of thyroid state on H₂O₂ production by rat liver mitochondria. *Mol. Cell. Endocrinol.* 205, 185– 192
- Venditti, P., De Rosa, R., Di Meo, S., 2004a.** Effect of cold-induced hyperthyroidism on H₂O₂ production and susceptibility to stress conditions of rat liver mitochondria. *Free Radic. Biol. Med.* 36, 348– 358
- Venditti, P., De Rosa, R. and Di Meo, S. (2004b).** Effect of thyroid state on susceptibility to oxidants and swelling of mitochondria from rat tissues. *Free Radic. Biol. Med.* 35, 485-494
- Venditti, P., Pamplona, R., Ayala, V., De Rosa, R., Caldarone, G., Di Meo, S. 2006.** Differential effects of experimental and cold-induced hyperthyroidism on factors inducing rat liver oxidative damage. *Journal of Experimental Biology* 209 817–825.
- Venditti, P., Di Meo, S., 2006.** Thyroid hormone-induced oxidative stress. *Cell. Mol. Life Sci.* 63, 414-434
- Venditti, P., Bari, A., Di Stefano, L., Cardone, A., Della Ragione, F., D'Esposito, M., Di Meo, S., 2009b.** Involvement of PGC-1, NRF-1, and NRF-2 in metabolic response by rat liver to hormonal and environmental signals. *Molecular and Cellular Endocrinology* 305 22–29
- Videla, L.A., Sir, T., Wolff, C., 1988.** Increased lipid peroxidation in hyperthyroid patients: suppression by propylthiouracil treatment. *Free Radic. Res. Commun.* 5, 1 –10
- Videla, L.A., 2000.** Energy metabolism, thyroid calorogenesis, and oxidative stress: functional and cytotoxic consequences. *Redox Rep.* 5, 265– 275
- Videla, L.A., 2010.** Hormetic responses of thyroid hormone calorogenesis in the liver: association with oxidative stress. *IUBMB Life* 62, 460–466
- De Vijlder, J.J.M., Vulsma, T., 1996.** Hereditary metabolic disorders causing hypothyroidism. In: *Werner and Ingbar's The Thyroid* (7th ed.), edited by Braverman L and Utiger R. Philadelphia, PA: Lipincott- Raven, p. 749–778
- Villicev, C.M., Freitas, F.R., Aoki, M.S., Taffarel, C., Scanlan, T.S., Moriscot, A.S., Ribeiro, M.O., Bianco, A.C., Gouveia, C.H., 2007.** Thyroid hormone receptor β -specific agonist GC-1 increases energy expenditure and prevents fat-mass accumulation in rats. *J Endocrinol* 193:21–29
- Wagner, R.L., Huber, B.R., Shiau, A.K., Kelly, A., Cunha Lima, S.T., Scanlan, T.S., Apriletti, J.W., Baxter, J.D., West, B.L., Fletterick, R.J., 2001.** Hormone selectivity in thyroid hormone receptors. *Mol Endocrinol* 15:398-410
- Weitzel, J.M., Iwen, K.A., Seitz, H.J., 2003.** Regulation of mitochondrial biogenesis by thyroid hormone. *Exp Physiol*; 88(Pt 1):121–8

Weitzel, J.M., Hamann, S., Jauk, M., Lacey, M., Filbry, A., Radtke, C., Iwen, K.A.H., Kutz, S., Harneit, A., Lizardi, P.M. Seitz H.J., 2003b. Hepatic gene expression patterns in thyroid hormone-treated hypothyroid rats. *Journal of Molecular Endocrinology* 31 291–303

White, P., Burton, K. A., Fowden, A. L. and Dauncey, M. J., 2001. Developmental expression analysis of the thyroid hormone receptor isoforms reveals new insights into their essential functions in cardiac and skeletal muscles. *FASEB J.* 15, 1367- 1376

Wikestrom, L., Johansson, C., Salto, C., Barlow, C., Campos Barros, A., Baas, F., Forrest, D., Thoren, P., Vennstrom, B., 1998. Abnormal heart rate and body temperature in mice lacking thyroid hormone receptor $\alpha 1$. *EMBO J* 17:455-461

Williams, L.T., Lefkowitz, R.J., Watanabe, A.M., Hathaway, D.R., Besch, H.R. J.R., 1977. Thyroid hormone regulation of beta-adrenergic receptor number. *J Biol Chem* 252: 2787–2789

Wilson, R., Chopra, M., Bradley, H., McKillop, J.H., Smith, W.E., Thomson, J.A., 1989. Free radicals and Graves, disease: the effect of therapy. *Clin. Endocrinol.* 30, 429–433

Wiseman, S.A., Powell, J.T., Humpheries, S.E., Press, M., 1993. The magnitude of the hypercholesterolemia of hypothyroidism is associated with variation in the low density lipoprotein receptor gene. *J Clin Endocrinol Metab* 77: 108–112

Wood, D.F., Docherty, K., Ramsden, D.B., Shennan, K.I., Sheppard, M.C., 1987. Thyroid status affects the regulation of prolactin mRNA accumulation by tri-iodothyronine and thyrotrophin-releasing hormone in cultured rat anterior pituitary cells. *J Endocrinol* 115: 497–503

Wood, W.J., Geraci, T., Nilsen, A., De.Barber, A.E., Scanlan, T.S., 2009. Iodothyronamines are oxidatively deaminated to iodothyroacetic acids in vivo. *Chembiochem* 10:361–365

Wu, Z., Puigserver, P., Andersson, U., Zhang, C., Adelmant, G., Mootha, V., Troy, A., Cinti, S., Lowell, B., Scarpulla, R.C., Spiegelman, B.M., 1999. Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell* 98:115–124

Yalcin, Y., Carman, D., Shao, Y., Ismail-Beigi, F., Klein, I., Ojamaa, K., 1999. Regulation of Na/K-ATPase gene expression by thyroid hormone and hyperkalemia in the heart. *Thyroid* 9: 53–59

Yen, P.M., 2001. Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. *Physiol Rev* 81:1097–1142

Yokoyama, N., Walker, G.N., Main, A.J., Stanton, J.L, Morrissey, M.M., Boehm, C., Engle, a., Neubert, A.D., Wasvary, J.M., Stephan, Z.F., et al., 1995. Synthesis and structure-activity relationships of oxamic acid and acetic acid derivatives related to L-thyronine. *J Med Chem* 38:695–707

Zhang, J., Lazar, M.A., 2000. The mechanism of action of thyroid hormones. *Annu Rev Physiol* 62:439-466

Zoccarato, F., Cavallini, L., Alexandre, A., 2004. Respiration-dependent removal of exogenous H₂O₂ in brain mitochondria. *J. Biol Chem.* 279, 4166–4174

Zucchi, R., Chiellini, G., Scanlan, T.S., Grandy, D.K., 2006. Trace amine-associated receptors and their ligands. *Brit. J. Pharmacol.* 149, 967–978