

CARACTERIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE MEMBRANA IMPLICADAS EN EL METABOLISMO DEL YODO NIS Y SLC5A8

ALEJANDRO OYONO ONDO MÉNDEZ

TESIS PRESENTADA PARA OBTAR A LOS TÍTULOS DE:

DOCTOR EN CIENCIAS – QUÍMICA

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

DOCTOR EN CIENCIAS DE LA VIDA Y LA SALUD

UNIVERSITE DE NICE

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

BOGOTÁ D.C, COLOMBIA

UNIVERSITE DE NICE – SOPHIA ANTIPOLIS

FACULTE DES SCIENCES

NICE, FRANCE

2009

CARACTERIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE MEMBRANA IMPLICADAS EN EL METABOLISMO DEL YODO NIS Y SLC5A8

ALEJANDRO OYONO ONDO MÉNDEZ

Cod. 197969 Universidad Nacional de Colombia
N° étudiant. 20033414 Université de Nice – Sophia Antipolis

Directores

CLARA SPINEL GOMEZ Ph. D
Departamento de Biología
Universidad Nacional de Colombia

THIERRY POURCHER Ph. D
Universidad de Nice – Sophia Antipolis

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
DOCTORADO EN CIENCIAS - QUÍMICA
BOGOTÁ D.C.

UNIVERSITE DE NICE – SOPHIA ANTIPOLIS
DOCTORAT EN SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE
NICE, FRANCE

2009

CARACTERIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS IMPLICADAS EN EL METABOLISMO DEL YODO NIS Y SLC5A8

RESUMEN

El yodo es uno de los componentes de las hormonas tiroideas y es por lo tanto esencial en el metabolismo de los mamíferos. El transporte de yodo en la glándula tiroidea es un proceso muy eficaz y fuertemente regulado por la hormona tireotrópica (TSH) y por la concentración de yodo en la sangre. A nivel molecular, varias proteínas de membrana han sido implicadas en el metabolismo del yodo, como el cotransportador sodio-yodo (NIS, *symporteur Na⁺/I⁻*) y la proteína SLC5A8, también llamada AIT (por *Apical Iodide Transporter*).

Actualmente está bien establecido que la proteína NIS cataliza el transporte activo de yodo del torrente sanguíneo hacia interior de los folículos de la tiroides. Este trabajo consistió inicialmente en el estudio de 10 moléculas previamente identificadas por su capacidad de inhibir la captación de yodo en células de mamíferos que expresan la NIS. La rapidez y reversibilidad de la inhibición catalizada por estos compuestos fueron estudiadas sobre las corrientes inducidas por el yodo en ovocitos de *Xenopus laevis* que expresan la NIS. Los compuestos analizados mostraron una gran variabilidad en la intensidad de la inhibición y en su posible modo de acción. Estos compuestos constituyen moléculas interesantes para la caracterización funcional de NIS. Estos inhibidores podrían también ser útiles en aplicaciones médicas.

La función de NIS es esencial para el diagnóstico (disminución de la actividad posterior a la transformación tumoral de las células) y tratamiento (radioterapia metabólica con yodo 131) del cáncer tiroideo. Recientemente, algunos equipos han reportado un fuerte marcaje intracelular por inmunohistoquímica utilizando anticuerpos dirigidos contra la proteína NIS en diferentes cánceres de tiroides y de seno. En colaboración con un equipo de patólogos, se realizó un estudio de la expresión de NIS en una muestra de tejidos cancerosos de tiroides y de seno. El objetivo inicial era identificar los mecanismos implicados en la alteración de la localización subcelular de NIS. Se estudió la expresión de NIS por inmunohistoquímica con tres anticuerpos monoclonales diferentes sobre 93 muestras histológicas y por *Western blot* sobre 20 muestras. Los resultados obtenidos muestran: 1) ausencia significativa de la expresión de NIS en los cánceres de tiroides (excepto en adenomas tóxicos) y de seno; y 2) que el inmunomarcaje intracelular observado corresponde a un marcaje no específico de los anticuerpos.

Por otra parte, se realizó la optimización de un sistema de cultivo tridimensional de folículos de tiroides, con el fin de analizar el comportamiento de la proteína NIS en condiciones cercanas a las de *in vivo*. Un estudio preliminar de la regulación de la localización subcelular de NIS por la TSH y la concentración de yodo fue realizado utilizando dicho sistema.

SLC5A8 fue inicialmente identificada como una proteína expresada en la membrana apical de los tirocitos (células de los folículos de tiroides) y se propuso que SLC5A8 interviene en el transporte pasivo de yodo. Otros trabajos indicaron que SLC5A8 puede ser un supresor de tumores en cáncer de colon (y luego en otros órganos) y un cotransportador Na^+ /monocarboxilatos. Sin embargo, el rol de SLC5A8 en la tiroides sigue siendo especulativo. En esta Tesis se reportan los primeros experimentos *in vitro* que indican que la expresión de SLC5A8 en células de mamíferos conduce a una actividad canal inducida por bajas concentraciones de yodo oxidado o de otros aniones oxidados. Se postula entonces que SLC5A8 es un sensor de yodo implicado en la regulación de la tiroides por el yodo. Para verificar esta hipótesis, se realizó un ratón invalidado para el gen que codifica la SLC5A8. En estos animales se observa una pérdida de la etapa inicial de la respuesta tiroidea frente a una elevación de la concentración de yodo. SLC5A8 sería un sensor implicado en la fase inicial de la regulación de la tiroides por el yodo (efecto Wolff-Chaikoff). Adicionalmente, los resultados obtenidos *in vitro* señalan que las corrientes inducidas por los monocarboxilatos varían dependiendo del sistema de expresión, sugiriendo que el transporte de estas moléculas no es catalizado directamente por SLC5A8, o que esta proteína es fuertemente modulada por otras proteínas endógenas. Finalmente, los análisis de los efectos antiproliferativos relacionados con la expresión de SLC5A8 en células de mamífero indican que este efecto estaría relacionado con la actividad sensor de la proteína. Estos resultados son determinantes para la comprensión del rol fisiológico de SLC5A8 y su implicación como supresor de tumores.

CARACTERISATION DE PROTEINES MEMBRANAIRES IMPLIQUEES DANS LE METABOLISME DE L'IODE NIS ET SLC5A8

RESUME

L'iode est l'un des éléments constitutifs des hormones thyroïdiennes et il est donc essentiel au contrôle du métabolisme chez les mammifères. Le transport d'iode dans la thyroïde est un processus très efficace et fortement régulé par la TSH et par la concentration d'iode sanguin. Au niveau moléculaire, plusieurs protéines membranaires ont été impliquées dans le métabolisme de l'iode et notamment le symporteur Na^+/I^- (NIS) et la protéine SLC5A8 appelé aussi AIT (pour *Apical Iodide Transporter*).

Il est maintenant clairement établi que la protéine NIS catalyse le transport actif d'iode du milieu sanguin vers les follicules de la thyroïde. Mon travail a d'abord consisté à étudier 10 molécules préalablement identifiées pour leur capacité d'inhiber la captation d'iode de cellules de mammifères exprimant le NIS. La vitesse et la réversibilité de l'inhibition catalysées par ces composés ont été étudiées sur les courants induits par l'iode dans des ovocytes de *Xenopus laevis* exprimant NIS. Les composés analysés ont montré une grande variabilité dans leurs propriétés et dans leurs possibles modes d'action sur le NIS. Ils se révèlent donc, comme des molécules intéressantes pour la caractérisation fonctionnelle du NIS. Ces inhibiteurs pourraient également être utiles dans des applications médicales.

La fonction du NIS est essentielle pour le diagnostic (baisse d'activité consécutive à la transformation tumorale des cellules) et le traitement (radiothérapie métabolique à l'iode ^{131}I) des cancers thyroïdiens. Récemment, des équipes ont rapporté un fort marquage intracellulaire par immunohistochimie en utilisant des anticorps dirigés contre la protéine NIS dans différents cancers thyroïdiens et du sein. En collaboration avec des pathologistes, nous avons étudié l'expression du NIS dans des échantillons de cancers de la thyroïde et du sein. Le but initial était d'identifier les mécanismes impliqués dans l'altération de la localisation subcellulaire du NIS. Nous avons étudié par immunohistochimie l'expression du NIS avec trois anticorps monoclonaux différents sur 93 échantillons et par *Western blot* sur 20 échantillons. Nos résultats montrent: 1) l'absence d'expression significative du NIS dans les cancers de la thyroïde (à l'exception des adénomes toxiques) et du sein; 2) que l'immunomarquage intracellulaire observé correspond à un marquage non-spécifique des anticorps.

Par ailleurs, nous avons optimisé un système de culture tridimensionnelle de follicules thyroïdiens, dans le but d'analyser le comportement de la protéine NIS dans des conditions proches d'*in vivo*. Une étude préliminaire de la régulation de la localisation subcellulaire de NIS par la TSH et la concentration d'iode a été réalisée en utilisant ce système.

SLC5A8 a été initialement identifiée comme une protéine exprimée dans la membrane apicale des thyrocytes (cellules du follicule thyroïdien) et il a été proposé que SLC5A8 intervienne dans le transport passif de l'iode. D'autres travaux ont suggéré que SLC5A8 était un suppresseur de tumeur dans le cancer du colon (puis d'autres organes) et un symporteur sodium monocarboxylates. Cependant, le rôle de SCL5A8 dans la thyroïde restait spéculatif. Dans ma thèse, nous présentons les premières expériences *in vitro* indiquant que l'expression de SLC5A8 dans des cellules de mammifères conduit à une activité canal induite par de basses concentrations d'iode oxydée ou d'autres anions oxydés. Alors, nous avons postulé que SLC5A8 était un senseur d'iode impliqué dans la régulation de la thyroïde par l'iode. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons élaboré des souris invalidées pour le gène codant pour SLC5A8. Sur ces animaux nous avons observé une perte de l'étape initiale de la réponse thyroïdienne face à une élévation de la concentration d'iode. SLC5A8 serait donc un senseur impliqué dans la phase initiale de la régulation de la thyroïde par l'iode (effet Wolff-Chaikoff). De plus, nos résultats indiquent que les courants induits par les monocarboxylates varient selon le système d'expression, suggérant que le transport de ces molécules n'est pas directement catalysé par SLC5A8 ou que celui-ci est fortement régulé par d'autres protéines endogènes. Finalement, nos analyses sur les effets antiprolifératifs liés à l'expression de SLC5A8 dans les cellules de mammifères indiquent qu'ils seraient liés à l'activité senseur de la protéine. Nos résultats sont déterminants pour la compréhension du rôle physiologique de SLC5A8 et son implication comme suppresseur de tumeur.

TABLA DE CONTENIDO

I. INTRODUCCIÓN.....	12
II. OBJETIVOS.....	15
A. Objetivo General.....	15
B. Objetivos específicos.....	15
III. LA GLÁNDULA TIROIDES	16
A. Morfología de la glándula Tiroides	16
B. Función de la glándula tiroides	17
C. Modelos de cultivo del tejido tiroideo	18
1. CULTIVOS ORGANOTÍPICOS	18
2. CÉLULAS AISLADAS Y MONOCAPAS	19
3. ESTRUCTURAS SEUDOFOLICULARES	20
4. AISLAMIENTO DE FOLÍCULOS CERRADOS	22
IV. ESTUDIO DE LA FUNCIÓN Y REGULACIÓN DE NIS.....	24
A. EL COTRANSPORTADOR SODIO/YODO (NIS)	24
B. ESTUDIO DE POSIBLES INHIBIDORES ESPECÍFICOS DE NIS	27
B. 1. MATERIALES Y MÉTODOS	29
B. 2. RESULTADOS	31
B. 3. DISCUSIÓN.....	38
C. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN SUBCELULAR DE NIS EN DIFERENTES CANCERES DE TIROIDES Y EN CÁNCER DE SENO	44
C. 1. MATERIALES Y MÉTODOS	46
C. 2. RESULTADOS	50
C. 3. DISCUSIÓN.....	60

D. ESTUDIO DEL EFECTO DE LA TSH Y LA CONCENTRACIÓN DE YODO EN LA LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE NIS	66
D. 1. MATERIALES Y MÉTODOS	68
D. 2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	70
V. ESTUDIO DE LA FUNCIÓN DE SLC5A8.....	74
A. SLC5A8.....	74
A. 1. MATERIALES Y MÉTODOS	77
A. 2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	81
VI. CONCLUSIONES.....	95
VII. AGRADECIMIENTOS	96
VIII. BIBLIOGRAFÍA	97

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Efecto de los compuestos ITB 3, ITB 9, ITB 5 e ITB 4 sobre la corriente inducida por el yodo en ovocitos de <i>X. laevis</i> que expresan NIS.....	31
Figura 2: Efecto de los compuestos ITB 6, ITB 8, ITB 7, ITB 2, ITB 1 e ITB 10 sobre la corriente inducida por el yodo en ovocitos de <i>X. laevis</i> que expresan NIS.....	34
Figura 3: Efecto de disidenina, isodisidenina, ouabaina y DIDS sobre la corriente inducida por el yodo en ovocitos de <i>X. laevis</i> que expresan NIS.....	36
Figura 4: Efecto de los compuestos, por sí mismos, en la conductancia de membrana en ovocitos de <i>X. laevis</i> que expresan NIS.	38
Figura 5: Análisis inmunohistoquímico de la expresión y localización de NIS en tejidos tiroideos..	52
Figura 6: Análisis inmunohistoquímico de la expresión y localización de NIS en tejidos de carcinoma tiroideo.....	55
Figura 7: Western blot de preparaciones de membrana de tejidos tiroideos.	58
Figura 8: Análisis Inmunohistoquímico de la expresión y localización subcelular de NIS en folículos aislados de ratón.....	71
Figura 9: Análisis Inmunohistoquímico de la expresión y localización subcelular de NIS en folículos aislados humanos.....	73
Figura 10: Registros representativos de las Corrientes obtenidas en células HEK-293 que expresan la SLC5A8.....	84
Figura 11: Medida de la concentración de las hormonas tiroideas T3 y T4 en ratones invalidados para el gen que codifica la proteína SLC5A8 (KO) y ratones silvestres (WT)..	91

Figura 12: Variabilidad de la amplitud de las corrientes inducidas por monocarboxilatos en diferentes tipos celulares que expresan la SLC5A8..... 89

Figura 13: Estudio del efecto antiproliferativo de la expresión de SLC5A8..... 92

Figura 14: Estudio del efecto antiproliferativo de la expresión de SLC5A8..... 94

LISTA DE TABLAS

Tabla 1: Inmunomarcaje con anticuerpos anti-NIS en muestras de cáncer de tiroides..... 47

Tabla 2: Número de células HEK-293 que mostraron corrientes inducidas por monocarboxilatos, que también mostraron Corrientes inducidas por especies oxidadas de yodo (HOY) o por moléculas oxidadas (HOX)..... 85

ABREVIATURAS

HRP: Peroxidasa de rábano
DAB: 3,3'-Diaminobenzidina
FRTL : Fisher Rat Thyroid Cell line
ATPasa:
HEK-293: Human Embrionic Kidney Cell line
FRTL-5: Fisher Rat Thyroid Cell line 5
HDACs: deacetilasas de histonas
PDZ: es un acrónimo que combina las primeras letras de tres proteínas - proteína de densidad postsináptica (PSD95), una supresora de tumores en *Drosophila* (DlgA), y la proteína zonula occludens-1 (ZO-1)
ADNc: ADN complementario
ARNc: ARN complementario
CaCl₂: Cloruro de calcio
DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium
EGFP: *Enhanced Green Fluorescent Protein* o proteína promotora de fluorescencia verde.
EGTA: *chelating agent ethylene glycol tetraacetic acid*
HEPES : tampón ácido N-2-hidroxietilpiperazine- N0-etanesulfónico.
HOCl: Ácido hipocloroso (especie oxidada de cloro)
HOI: Ácido hipoyodoso (especie oxidada de yodo)
HOX: Ácido Hipohaloso moléculas oxidadas
I₂: Yodo molecular
ITB: *Iodide Transport Blocker*
KCl: Cloruro de potasio
KOH: Hidróxido de potasio
M: Molar
MgCl₂: Cloruro de MAGnesio
min: minuto
mV: milivoltios
NaCl: Cloruro de sodio
NaI: Yoduro de sodio
NaOCl: Hipoclorito de sodio
NaOH: Hidróxido de sodio
NIS: *symporteur* Na⁺/I⁻ o cotransportador Na⁺/I⁻
hNIS: NIS humana
Ori: solución de *Ringer* libre de calcio
S.E.M.: Error Estándar de la Media
SFB: Suero Fetal Bovino
T3: Triyodotironina
T4: Tetrayodotironina
TpNa: solución experimental
TPO: Tiroperoxidasa
TSH: Thyroid Stimulating Hormone
KO: ratones invalidados para SLC5A8
WT: ratones silvestres

I. INTRODUCCIÓN

El yodo es un componente esencial de las hormonas tiroides, las cuales son importantes en el control del metabolismo celular, la termorregulación, y en el desarrollo del sistema nervioso central y del sistema óseo en el feto y en los recién nacidos (Brown, 1956). La asimilación del yodo que hace parte de la dieta es la principal fuente de este elemento en los mamíferos (De La Vieja *et al.*, 2000). Al ser el yodo es un elemento poco abundante en la naturaleza (Braverman, 1998), la deficiencia de este elemento en la dieta ha sido relacionada con la aparición de una serie de fisiopatologías de la glándulas tiroides (hipotiroidismo, bocio endémico y cáncer de tiroides) en muchas regiones del mundo (especialmente de América Latina y África), constituyendo así un grave problema de salud pública (Patiño, 1976). En Colombia, este problema está presente principalmente en varias regiones de los departamentos de Caldas y Valle del Cauca, y especialmente en la población de La Candelaria (Valle del Cauca), que es una de las regiones del mundo con mayor incidencia de bocio endémico (Córdoba *et al.*, 1983, Gaitán *et al.*, 1991). Sin embargo, diferentes estudios realizados han demostrado que la deficiencia de yodo no es el único factor causante de estas patologías, e incluso la presencia de estas enfermedades en ausencia de deficiencia de yodo ha sido demostrada (Dunn *et al.* 1974). Varios agentes, denominados bociógenos (carbón, argil, disulfidos, entre otros), han sido relacionados con la aparición del bocio endémico y otras patologías de la tiroides (Gaitán, 1972), pero el desconocimiento de las bases moleculares del transporte de yodo en la glándula tiroides ha impedido determinar el efecto de los agentes bociógenos en la disfunción de los mecanismos de transporte de éste elemento en la glándula (Filetti *et al.* 1999). De igual forma, el yodo es uno de los radioelementos mayores en la toxicología relacionada con la industria nuclear. Dicha toxicidad es consecuencia directa de la eficacia en la capacidad de captación y transporte del yodo en el humano. Un mejor conocimiento de las bases moleculares del transporte de yodo en la tiroides y en los otros tejidos implicados en este transporte es esencial para comprender las fisiopatologías y el riesgo radio-toxicológico relacionados con este elemento, y para desarrollar terapias innovadoras basadas en las proteínas transportadoras de yodo (De

la Vieja *et al.*, 2000). La acumulación de yodo es utilizada igualmente para el diagnóstico de cánceres de tiroides, siendo la base para el desarrollo de las técnicas de imagenología utilizadas en los exámenes realizados en los departamentos de medicina nuclear (Carrasco, 1993). Esta acumulación es también la base de las técnicas de disminución de metástasis de tiroides por radioterapias metabólicas a base de yodo (De la Vieja *et al.* 2000).

La capacidad de transporte de yodo es un proceso fuertemente regulado, especialmente por la TSH (hormona que regula la actividad tiroidea) y por la concentración de yodo (Carrasco 1993). A nivel molecular, algunas de las proteínas que participan en el transporte de yodo en la tiroides han sido identificadas, como el cotransportador sodio-yodo o NIS (Dai *et al.*, 1996; Smanik *et al.*, 1996) y, recientemente, una nueva proteína, SLC5A8, inicialmente denominada AIT (por *Apical Iodide Transporter*) (Rodríguez *et al.*, 2002). Sin embargo, la información obtenida hasta el momento es insuficiente para establecer claramente el rol de la SLC5A8 en la tiroides y, particularmente su contribución específica en el transporte de yoduro y/o en la regulación de la función tiroidea. De igual forma, varios aspectos de la función y regulación de la NIS son aún desconocidos, como por ejemplo, los mecanismos moleculares implicados en la modificación de su expresión en cáncer de tiroides y de otros tipos de tejidos. En este trabajo, se presentan los resultados obtenidos en el estudio de dos aspectos de la regulación de la proteína NIS: La identificación de inhibidores específicos, y la variación de la expresión de la proteína en diferentes tipos de cáncer, y se muestran algunos resultados preliminares obtenidos en el estudio del efecto de la TSH y de la concentración de yodo en la localización subcelular de NIS. De igual forma, se presentan los resultados obtenidos en el estudio de la función de la proteína SLC5A8 y se postula una hipótesis sobre su posible rol en la glándula tiroides. La comprensión de estos aspectos de la regulación de la NIS y de la función de SLC5A8 es importante para mejorar los tratamientos y las técnicas de diagnóstico de cáncer y otras patologías, basados en la utilización de esta proteínas, y para tener una mayor comprensión del funcionamiento y regulación general de la glándula tiroides, permitiendo así

el desarrollo de estrategias más eficaces para el diagnóstico y tratamiento de patologías de la tiroides.

II. OBJETIVOS

A. Objetivo General.

Determinar las propiedades funcionales y de regulación a nivel molecular de las proteínas NIS y SLC5A8 en la glándula tiroides.

B. Objetivos específicos.

1. Analizar el efecto de 10 compuestos diferentes sobre la función de la proteína NIS, en un sistema de expresión de la proteína en ovocitos de *Xenopus laevis*.
2. Determinar la variación de la expresión de la proteína NIS en diferentes muestras de tejido de cáncer de tiroides y de seno.
3. Determinar el efecto de la hormona TSH y de la concentración de yodo sobre la expresión de la proteína NIS en cultivos de folículos tiroideos.
4. Analizar las propiedades funcionales de la proteína SLC5A8 en diferentes sistemas *in vitro*, utilizando técnicas de electrofisiología, y análisis fisiológicos de ratones invalidados para SLC5A8.

III. LA GLÁNDULA TIROIDES

A. Morfología de la glándula Tiroides

La tiroides es una glándula endocrina formada por dos lóbulos unidos por un istmo y ubicados a los lados laterales de la laringe y de la tráquea. El istmo está localizado en la fase anterior del segundo y tercer anillo cartilaginoso de la tráquea. La forma ovalada de los lóbulos hizo pensar a los escudos antiguos, de ahí su nombre del griego *thureos*. La tiroides está rodeada por una fina cápsula fibrosa de donde se internan ramas que dividen en lóbulos incompletos al parénquima glandular (Nadler, 1974).

El folículo tiroideo es la unidad estructural y funcional de la tiroides (Denef *et al.*, 1980, Utiger, 1990). Su forma es ovoide y está constituido por una monocapa de células epiteliales cúbicas (tirocitos) alrededor de un líquido viscoso de proteínas, denominado el coloide, constituido en un 80% de tiroglobulina (Tg). La Tg es la molécula precursora de las hormonas tiroideas. La proporción de proteínas varía de una especie a otra y de un folículo a otro en el mismo animal (Smeds, 1972). El tamaño de los folículos también varía según la especie, la cepa, la edad de los individuos y su localización dentro de la tiroides, siendo los folículos periféricos más pequeños que los centrales (Nitsch y Wollman, 1980). Por ejemplo, en el pez cebra el diámetro oscila entre 14 y 140 μm (Wendl *et al.*, 2002), mientras que en el ratón el diámetro de los folículos varía de 50 a 150 μm , (Nitsch y Wollman, 1980). En el cerdo y el hombre el diámetro folicular varía entre 150 y 500 μm (Spinel, 1987). Se cree que existen alrededor de 30 millones de folículos en la tiroides humana (Fawcett, 1995). Además de los tirocitos se encuentran las células C o parafoliculares, que son neuroendocrinas y constituyen 1 a 2% de las células de la tiroides. Estas células C no están en contacto con el coloide sino en la base de las células foliculares y secretan la calcitonina (Nunez *et al.*, 1978; Hoff *et al.*, 2002).

Los tirocitos constituyen el epitelio simple que limita a los folículos. Esto determina 2 dominios funcionales en la membrana celular: la membrana apical, que está en contacto con el coloide y forma microvellosidades (Björkman y Ekholm, 1984); y la membrana basolateral, que está en contacto con las células vecinas y con la membrana basal del endotelio de los capilares (Seljelid, 1967). Las membranas laterales en su región apical, presentan complejos de unión, asegurando el aislamiento del lumen folicular (Tice *et al.*, 1975). La forma de las células de la tiroides depende de su estado funcional; poseen forma cúbica en condiciones fisiológicas normales, volviéndose cilíndricas bajo una fuerte y prolongada estimulación de TSH y planas en su ausencia (Denef *et al.*, 1980; Nitsch y Wollman, 1980).

B. Función de la glándula tiroides

La principal función de la glándula tiroides es la síntesis y secreción de las hormonas tiroides 3,5,3'-triyodotironina (T3) y 3,5,3',5'- tetrayodotironina (T4), para lo cual se realizan tres procesos básicos ligados a su morfología folicular y a la ultraestructura de los tirocitos (Giraud *et al.*, 1997):

1. Síntesis de la Tg e inicio de la glicosilación en el retículo endoplásmico rugoso (RER), maduración y finalización de la glicosilación en el complejo de Golgi (CG), y secreción de la Tg al coloide dentro de vesículas de exocitosis.
2. Captación del yoduro a través del cotransportador sodio/yodo (NIS) de la membrana basal, desde el exterior del tirocito a su interior (Spitzweg *et al.*, 2000), seguido de su transporte a la membrana apical. El o los efectores que catalizan el transporte de yoduro a través de la membrana apical de los tirocitos aún no han sido bien caracterizados. La Pendrina es una proteína implicada en una enfermedad genética (el síndrome de Pendred) que asocia un problema de sordera a una alta frecuencia de bocio (Kopp, 1999). La proteína ha sido localizada en la membrana apical de los tirocitos, y ha sido propuesta como la proteína que cataliza el paso de yoduro a través de dicha membrana (Bidart *et al.*, 2000; Royaux *et al.*,

2000). Si esta proteína participa en dicho transporte, no es el único efector implicado, ya que experiencias realizadas en laboratorio muestran que ratones a los que el gen de la Pendrina les ha sido invalidado, presentan un funcionamiento normal de la tiroides (Kohn *et al.*, 2001). En la membrana apical, la tiroperoxidasa (TPO) fija el yoduro a las tirosinas de la Tg formando yodotirosinas, proceso conocido como organificación (Björkman *et al.*, 1981; Medeiros-Neto *et al.*, 1993). La misma enzima y por replegamiento de la Tg, une las yodotirosinas formando los precursores de las hormonas tiroides, T3 y T4, aún acopladas a la Tg (Vono-Tonolio *et al.*, 2004).

3. La Tg yodada es endocitada y degradada en prelisosomas (Dubois *et al.*, 1991) y lisosomas, donde son liberadas las hormonas tiroides T3 y T4 y secretadas a la circulación (van den Hove-Vandenbroucke, 1980). Posteriormente, las hormonas tiroides serán transportadas por el torrente sanguíneo a las células del organismo por tres familias de proteínas sanguíneas, principalmente por la TBG, (*Thyroxin Binding globulin*) secretada por el hígado (Nonneman *et al.*, 2005).

C. Modelos de cultivo del tejido tiroideo

1. Cultivos organotípicos

Se conoce como cultivo organotípico aquel en el que se coloca un fragmento del tejido del animal en una caja de cultivo. Si bien desde 1911, fue posible el cultivo de grandes fragmentos tiroideos de diferentes mamíferos (Carrel y Burrow 1911), las condiciones de alta contaminación que presentaban estos cultivos hicieron muy difíciles los progresos en el área hasta ya bastante entrado el siglo XX (Paul, 1975). La incubación, que puede definirse como el mantenimiento de células o tejidos en suspensión dentro de un medio de cultivo sin pasar más de 24 horas, fue realizada en tiroides por primera vez por Morton y Chaikoff, quienes lograron en 1943 la primera incubación de tejido tiroideo de cordero; este tejido conservó su

función de incorporación de yodo en la diiodotirosina (DIT) y en la T4 en presencia de yodo radiactivo, pero no fue descrito el porcentaje de incorporación.

En los años 50, se realizaron cultivos organotípicos con tiroides de rata consiguiendo mantener el coloide en el lumen folicular durante 115 días; también se demostró la síntesis de hormonas tiroides en los lóbulos luego de 25 días, si bien esta síntesis era mínima y poco representativa. En años posteriores fue posible conservar la morfología de los lóbulos tiroideos durante 6 días (Trowell, 1959) o fragmentos de tiroides entre 10 a 14 días (Flanagan *et al.*, 1966). Los cultivos organotípicos de tiroides de ratón sobre una superficie hidrófoba se pueden conservar durante 14 días aunque se forme un tejido fibroso mayor entre los folículos que quedan (Parr *et al.*, 1980). El problema principal con los cultivos organotípicos radica en la rápida necrosis celular, siendo además cultivos de varios tipos celulares, como endoteliales, epiteliales etc. (Spinel, 1987).

Recientemente, un nuevo cultivo organotípico de tejido tiroideo ha sido descrito (Toda *et al.*, 2002), en el que se mantiene la estructura folicular embebiendo el tejido en un gel de colágeno en contacto con el aire, manteniendo así los cultivos por más de 45 días, pero perdiendo la respuesta a la TSH.

2. CÉLULAS AISLADAS Y MONOCAPAS

El aislamiento de células de la tiroides humanas fue descrito por primera vez por Pulvertaft y colaboradores (1959), mediante digestión con tripsina. También se hicieron cultivos con células aisladas de cordero, ratón, rata, perro (Pastan y Wollman, 1967) y otros organismos. El grupo de Tong y Kerfof, describió un cultivo de células en monocapa de formas planas y poligonales, lo que hoy conocemos como cultivo primario de células epiteliales (Tong *et al.*, 1962; Kerkofof *et al.*, 1964 en Spinel, 1987). Los tirocitos cultivados en monocapa pierden su capacidad de incorporar yoduro desde el primer día (Fayet *et al.*, 1971). Se empezaron a

implementar en los años 70 los cultivos sobre geles de colágeno, donde se forma una monocapa polarizada con su polo apical en contacto con el medio, y la membrana basal en contacto con el colágeno (Spinel, 1987). De esta forma se demostró que el yoduro se concentra junto a la membrana basal donde se encuentran los receptores de TSH (Chambard *et al.*, 1983).

Por esta época también se comienzan a desarrollar las líneas celulares continuas de origen tiroideo como la FRLT (*Fischer Rat thyroid cell line*) que no exhiben polaridad celular (Ambesi-Impiombato *et al.*, 1980, Kogai *et al.*, 2000), OVNIS (*Ovine Nihil Serum*), PORTHOS (*Porcine Thyroid O Serum*) y posteriormente se desarrollaron otras líneas celulares provenientes de carcinomas o tumores como la línea humana SMC R86 F1, que expresa Tg-19S (Tsuda, 1992), y la FRTC de cáncer de tiroides de rata (Litaka *et al.*, 1997) entre otras. Si bien las líneas celulares son esencialmente “inmortales”, poseen serios problemas a largo plazo como pérdida de respuesta a la TSH, de producción de Tg y cambios cromosómicos, entre otros (Kimura *et al.*, 2001; Eggo *et al.* 2003). Dependiendo de las necesidades de la investigación, los cultivos primarios muestran algunas ventajas sobre los cultivos realizados a partir de líneas celulares (Kimura *et al.*, 2001), sobre todo si se quieren conservar las funciones básicas del tirocito como captación y organificación del yoduro, análisis de moléculas esenciales del metabolismo normal de los tirocitos, como las transportadoras de yoduro, la Tg y la TPO, entre otras de acuerdo con los intereses de estudio.

3. ESTRUCTURAS SEUDOFOLICULARES

Desde los años 70 numerosos autores han tratado de reproducir *in vitro* estructuras similares a folículos para poder homologar los resultados con los estudios *in vivo*, ya que es muy difícil estudiar los diferentes aspectos de la fisiología de la tiroides en monocapa, en animales de experimentación o en seres humanos. Para estudiar distintos aspectos de la función tiroidea es indispensable contar con una luz similar al coloide para tener la estructura funcional del

tirocito. En este sentido, el primer paso fue intentar la construcción de estructuras similares a los folículos, denominadas pseudofolículos (Fayet *et al.*, 1971; Lissinsky *et al.*, 1971), logrando que estos pseudofolículos concentraran yoduro en su cavidad (Rémy *et al.* 1977) y sintetizaran Tg-19S yodada sobretodo con fuertes concentraciones de TSH. Luego del cuarto día pierden la capacidad de captar e incorporar yoduro, pero conservan su morfología durante 6 días, tras lo cual pierden su lumen y se reorganizan de nuevo en monocapa.

Fue posible además generar estructuras pseudofoliculares a partir de cultivo de tiroides de rata en monocapa, mediante la utilización de TSH. Esta estructura se conservaba hasta el noveno día (Pantic *et al.* 1970), observando que se presentaban cambios de la ultraestructura en el RER, el complejo de Golgi y la síntesis de Tg, pero sin organización ni síntesis de hormonas tiroides. A partir de la línea celular FRLT, y usando medio Coon, sin suero y junto con 6 hormonas y microelementos demostraron mantener células epiteliales de la tiroides que retuvieran funciones específicas de la misma. Era igualmente notoria la formación de grandes estructuras vacuolares, semejantes al coloide folicular (Ambesi-Impiombato *et al.* 1980)

En los años 90 se continúa experimentando con la reorganización *in vitro* de estructuras pseudofoliculares, con el uso de moléculas de la matriz extracelular para formar estructuras tridimensionales, ya que estas brindan el soporte para una orientación espacial adecuada para que las células manifiesten la polaridad celular y la organización del citoesqueleto (Takasu *et al.*, 1992; Eggo *et al.*, 2003). En 1993, Toda y colaboradores, empleando geles de colágeno, logran reconstruir algunos folículos de 5 a 10 tirocitos y agregados celulares sin luz folicular a los 21 días de cultivo. Con líneas celulares también se logra obtener pseudofolículos con TSH y factor de crecimiento epidermal (EGF) (Curcio *et al.*, 1994).

Con tirocitos humanos transplantados en la dermis de ratones SCID (*Severe combined immunodeficient*), se logra obtener estructuras foliculares que los autores denominan -organoides o neofolículos- (Martín *et al.*, 1997), que sintetizan Tg y la almacenan en el lumen

del neofolículo, pero no aclaran que calidad de Tg se obtiene y si hay o no organificación y síntesis de hormonas. Algunas moléculas de la matriz extracelular secretadas por los tirocitos o añadidas al cultivo favorecen la polaridad celular en seudofolículos manteniendo su estabilidad hasta por 4 semanas de cultivo (André *et al.*, 1994; Pellerin *et al.*, 1999).

El grupo de Tonoli y colaboradores (2000) intenta la generación de estructuras foliculares porcinas mediante la transfección genética del gen connexin 32, implicado en la formación de las uniones cerradas (*tight junctions*) y también en la foliculogénesis. Desafortunadamente estas matrices contienen frecuentemente factores de crecimiento desconocidos que pueden afectar los experimentos, además de un mayor costo experimental (Eggo *et al.*, 2003).

Otros esfuerzos en los cultivos de tiroides van dirigidos a la generación de tirocitos humanos a partir de células madre embrionarias (*stem cells*), buscando dilucidar la embriogénesis de la tiroides y los factores moleculares implicados en la foliculogénesis (Lin *et al.* 2003).

4. AISLAMIENTO DE FOLÍCULOS CERRADOS

En los años 80 se logró desarrollar por primera vez la metodología de obtención de cultivos foliculares en suspensión (Denef *et al.*, 1980; Nitsch y Wollman 1980), mostrándose tanto aspectos de su morfología como de su fisiología, los cuales están estrechamente relacionados. En este último aspecto es esencial mencionar el trabajo de Karlsson y colaboradores (1982), sobre folículos porcinos tiroideos, en el cual conseguían mantener estructuras foliculares y folículos abiertos durante cuatro días en cultivos con un soporte de agarosa que impide la adhesión celular, logrando mantener su arquitectura sin coloide y respondían a la TSH con una mayor organificación de la Tg. Empleando esta técnica y una disociación enzimática y mecánica muy controlada se evita al máximo la apertura de los folículos. Si la digestión de la tiroides no es controlada, los folículos tiroideos se observan principalmente como folículos abiertos, presentando pérdida de coloide y en algunos casos

perdida de la membrana (Denef *et al.*, 1980). Si la digestión enzimática es controlada, la mayoría de los folículos son cerrados, es decir, mantienen su cerramiento estructural y su morfología es similar a la de los folículos observados *in vivo* (Spinel, 1987).

Con una metodología de disección y digestión controlada se puede llegar a obtener un 80% de folículos cerrados, que en cultivo mantienen su morfología y ultraestructura normales hasta por 12 días en ausencia de TSH, es decir que poseen la misma estructura de los folículos *in vivo* en ausencia de TSH. Además con TSH 0,1 y 1 mU/ml mantienen la captación y organificación del yoduro durante los 12 días de manera homóloga a *in vivo*, es decir, la relación organificación/captación del orden de 90% (Spinel-Gomez *et al.* 1990). En este trabajo se demostró por primera vez que, a partir de tejido de rata, se puede mantener por más de 24 horas la organificación del yoduro sobre la Tg y, lo más importante, la formación de T3 y T4. La regulación de los folículos cerrados en cultivo, es similar a la de la tiroides *in vivo*, que a fuertes concentraciones de yoduro deja de organificarlo, reproduciendo el efecto Wolff-Chaikoff (Spinel, 1987; Spinel-Gomez *et al.*, 1991), descrito *in vivo* en 1948 (Wolff y Chaikoff 1948) pero que no ha sido tomado en cuenta por la mayoría de los otros autores que realizan cultivos de la glándula tiroides.

A partir de los estudios realizados por Spinel (1990), se desarrolló un método de aislamiento y cultivo de folículos de ratón, cerdo y humano que permite mantener a partir de 24 h un cultivo de folículos cerrados que se mantienen durante todo el tiempo de cultivo como los descritos para rata (Cabezas *et al.* 2005). Este tipo de cultivo no requiere de elementos de la matriz extracelular, TSH, factores de crecimiento, ni ningún otro tipo de hormonas adicionales para mantener los folículos, siendo un modelo idóneo para el estudio *in vitro* de las funciones y de las bases moleculares de la tiroides, bajo condiciones controladas y que sean homologables a la glándula *in vivo*. Además, responden a la TSH como *in vivo* (Herrera *et al.*, 2009; en prensa).

IV. ESTUDIO DE LA FUNCIÓN Y REGULACIÓN DE NIS

A. EL COTRANSPORTADOR SODIO/YODO (NIS)

La síntesis de las hormonas tiroideas requiere del transporte activo y acumulación de yodo desde el torrente sanguíneo hacia el interior de la glándula, específicamente al interior de los folículos. La NIS (también llamada SLC5A5), es una proteína miembro de la familia de cotransportadores sodio/soluto, y es una proteína integral de membrana que reside en la membrana basolateral de los tirocitos (Dohan *et al.*, 2001). Predicciones por análisis bioinformáticos y datos experimentales indican que la NIS se organiza en 13 dominios transmembranales y contiene tres sitios de glicosilación (Levy *et al.*, 1998). Actualmente, está claramente establecido que la NIS cataliza la primera etapa del transporte de yodo a través de la membrana basolateral de las células epiteliales tiroideas. La NIS es un cotransportador que cataliza un transporte acoplado de yodo y sodio, con una estequiometría de transporte de 1 I⁻ por 2 Na⁺, utilizando como fuerza motriz para transportar el yodo en contra de su gradiente de concentración, el gradiente favorable de sodio creado por la Na⁺/K⁺ ATPasa. Así, el yodo es acumulado al interior de los tirocitos a una concentración 40 mayor que la concentración en el plasma. NIS fue identificada en la rata (Dai *et al.*, 1996), y luego en el hombre (Smanik *et al.*, 1996), y posteriormente en el ratón por el equipo *Unité Transporteurs en Imagerie et radiothérapie oncologique* (TIRO) (Perron *et al.*, 2001). Dada su importancia en la fisiología de la tiroides y en las patologías asociadas, numerosos estudios se han realizado desde la identificación de la NIS. La expresión de NIS y una acumulación activa de yodo dependiente de sodio ha sido observada, además de en la tiroides, en la mucosa gástrica, glándulas salivares y glándula mamaria lactante (Cho *et al.*, 2000, Tazebay *et al.*, 2000). Al igual que en la tiroides, la actividad de NIS genera una captación importante de yodo en estos tejidos. La presencia de NIS, pero no una acumulación activa de yodo, ha sido observada en el cerebro, intestino, piel, testículos y otros tejidos (Perron *et al.*, 2001).

Además de yodo, la NIS también transporta otros aniones monovalentes como el perclorato (ClO_4^-), clorato (ClO_3^-), tiocianato (SCN^-) y nitrato (NO_3^-) (Eskandari *et al.*, 1997, Lindencrona *et al.*, 2001) y diferentes radioisótopos tales como el pertecnato (TcO_4^-) (Tazebay *et al.*, 2000, Van Sande *et al.*, 2003), perrenato (ReO_4^-) (Dadachova *et al.*, 2002) y astatina (At) (Lindencrona, *et al.* 2001). El ClO_4^- es el único inhibidor competitivo eficaz de la actividad de NIS. Recientemente, Dohan y colaboradores (2007) mostraron que el ClO_4^- es transportado activamente por NIS en la glándula mamaria de ratas lactantes, conduciendo a una acumulación de este anión en la leche. La estequiometría del transporte sodio/anión catalizado por NIS depende del anión transportado, siendo de 2:1 para el yodo, y 1:1 o 2:2 para el perclorato (Dohan *et al.*, 2003).

Hasta ahora, sólo algunas moléculas orgánicas han mostrado un efecto inhibitorio sobre el transporte de yodo en tejidos que expresan la proteína NIS. La mayoría de estas moléculas corresponden a bloqueadores de canales de cloro, como la difenilamina-2-carboxilato (DPC) y el 5-nitro-2-(3-fenilpropilamino)-benzoato (NPPB) (Gerard *et al.*, 1994), o a inhibidores de otros transportadores dependientes de sodio, como la harmalina (Kaminsky *et al.*, 1991). Inhibidores de la actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa, como la ouabaina, también conllevan a una inhibición de la actividad de transporte de NIS. Sin embargo, en este caso no existe una interacción directa con la proteína NIS. La inhibición de la Na^+/K^+ -ATPasa elimina el gradiente de entrada de sodio que provee la energía necesaria para la translocación del yodo por la NIS. Hasta la fecha, solo la disidenina, una toxina aislada de la esponja marina *Dysidea herbacea*, ha sido reportada como un inhibidor específico de la NIS. La disidenina inhibe de forma rápida y fuerte el transporte de yodo en tajadas de tiroides, vesículas de membrana plasmática de tirocitos y en las líneas celulares que expresan la NIS (FRTL-5 y células COS transfectadas) (Van Sande *et al.*, 1990). Estos autores sugieren una interacción directa de la disidenina con el sitio de unión del yodo en la NIS.

La clonación de la NIS ha permitido la utilización de este transportador en terapia génica, ya sea como marcador en imagenología no invasiva o como gen suicida asociado a técnicas de

radioterapia metabólica (Carvalho y Ferreira 2007). Los resultados en la estrategia antitumoral en carcinomas hepáticos y en mielomas múltiples han sido muy prometedores (Dohan y Carrasco 2003). De igual forma, durante décadas la acumulación de yodo catalizada por NIS en los tirocitos ha sido una herramienta útil para el diagnóstico (cintigrafía de la tiroides) y tratamiento (radioterapia) de varias patologías de la tiroides. Una disminución en la capacidad de captar yodo ha sido asociada a la mayoría de los cánceres tiroideos, produciéndose la aparición de nódulos “fríos”. Tras la identificación del ADNc que codifica para la proteína NIS humana, como ha sido reportado por varios grupos (Arturi *et al.*, 1998, Lazar *et al.*, 1999, Ryu *et al.*, 1999, Liou *et al.*, 2000, Park *et al.*, 2000, Arturi *et al.*, 2001, Ringel *et al.*, 2001; Trouttet-Masson *et al.*, 2004), está ahora bien establecido que las células cancerosas de tiroides presentan niveles menores de ARNm de NIS que el tejido normal, pudiendo explicar la disminución en la captación de yodo, aunque una disminución en el ARNm no está siempre relacionada con una disminución en la expresión de la proteína. En varias de las primeras publicaciones sobre NIS se reporta una baja expresión de la proteína en tejidos tumorales de tiroides (Caillou *et al.*, 1998, Jhiang *et al.*, 1998, Castro *et al.*, 1999b), confirmando la correlación esperada entre los bajos niveles de ARNm de NIS, de la proteína y de la captación de yodo. Posteriormente, dos grupos han reportado resultados, a partir de técnicas de inmunohistoquímica, que sugieren una sobreexpresión de la NIS en la mayoría de cánceres de tiroides o en nódulos benignos no funcionales (Dohan *et al.*, 2001; Tonacchera *et al.*, 2002; Wapnir *et al.*, 2003; Riesco-Eizaguirre *et al.*, 2006). Según estos autores, en lugar de localizarse en la membrana basolateral, la proteína NIS estaría predominantemente localizada intracelularmente. De igual forma, ha sido establecida una inducción de la expresión de la proteína NIS en la glándula mamaria durante la lactancia (Cho *et al.*, 2000; Tazebay *et al.*, 2000; Perron *et al.*, 2001), aunque la captación de yodo también ha sido detectada en tejido mamario no lactante en casos particulares (Ronga *et al.*, 2007). Más aún, Tazebay y colaboradores (2000) observaron que Por técnicas de inmunohistoquímica con anticuerpos anti-NIS, 80% de los tumores de seno exhiben un marcaje intracelular (Tazebay *et al.*, 2000). En otro estudio, un marcaje con anticuerpos anti-NIS fue detectado en la mayoría de tumores de seno y otros carcinomas (Wapnir *et al.*, 2003). Estos autores

proponen que la proteína NIS se expresa en tumores de seno, pero que un error en el direccionamiento de la proteína hacia la membrana plasmática conduce a una pérdida total o parcial en las capacidades de transporte de yodo.

En esta parte del trabajo, se presentan los resultados obtenidos en el estudio de dos aspectos de la función y regulación de la proteína NIS: La identificación de inhibidores específicos, y la variación de la expresión de la proteína en diferentes tipos de cáncer. De igual forma, se muestran algunos resultados preliminares obtenidos en el estudio del efecto de la TSH y de la concentración de yodo en la localización subcelular de NIS. La comprensión de estos tres aspectos de la regulación de la NIS es importante para mejorar los tratamientos y técnicas de diagnóstico de cáncer y otras patologías, basados en la utilización de esta proteína.

B. ESTUDIO DE POSIBLES INHIBIDORES ESPECÍFICOS DE NIS

La búsqueda de inhibidores específicos de NIS es importante por sus posibles aplicaciones en el tratamiento de varias patologías de la tiroides. Por ejemplo, el yodo es uno de los radioelementos mayores en la toxicología relacionada con la industria nuclear. Accidentes como el de Chernobyl, recuerdan de forma dramática los niveles de toxicidad de los diferentes radioisótopos de yodo al ser ingeridos por la población, particularmente en el feto y los recién nacidos (Nauman y Wolff, 1993; Williams, 1994). Dicha toxicidad es consecuencia directa de la eficacia en la capacidad de captación y transporte del yodo en los tejidos humanos. En la actualidad, la administración de yoduro de potasio (KI) es la única medida de protección existente contra una acumulación de yodo radioactivo en la tiroides (Dayem *et al.*, 2006). Además de implicar una alteración en la síntesis de las hormonas tiroideas (efecto Wolff-Chaikoff), este método sólo es relativamente efectivo si se utiliza antes o inmediatamente después de la exposición al radioisótopo (Dayem *et al.*, 2006). Un inhibidor

específico de NIS ha sido buscado para poder suprimir la acumulación de yodo radioactivo en la tiroides, sin afectar la secreción y eliminación de los isótopos radioactivos de yodo ya acumulados en la glándula. Por otro lado, la amiodarona es un poderoso anti-arítmico, frecuentemente utilizado en el tratamiento de múltiples desordenes cardiacos. Sin embargo, la amiodarona es una molécula fuertemente yodada y su administración induce una sobrecarga crónica de yodo que con frecuencia causa hipertiroidismo, requiriéndose un tratamiento con perclorato de potasio (Bartalena *et al.*, 2004). Debido a la corta duración del efecto inhibitorio, deben administrarse altas dosis de perclorato, causando varios efectos secundarios indeseables como vómito, fiebre y disfunción renal. Esto señala la necesidad de nuevos inhibidores específicos de NIS que podrían ser alternativas terapéuticas al tratamiento con perclorato. Los inhibidores de NIS también podrían reemplazar al perclorato en el diagnóstico de patologías tiroideas en las que se utiliza la cintigrafía con I^{131} y el test de depleción con perclorato.

Un proyecto de identificación de nuevos inhibidores de la NIS fue realizado en colaboración con un equipo de químicos de la plataforma de fraccionamiento de alto rendimiento del Comisariato de Energía Atómica (CEA) de Saclay, Francia. Una prueba de acumulación de yodo sobre células en cultivo, adaptada al fraccionamiento de alto rendimiento fue puesta a punto (Lecat-Guillet *et al.*, 2007). Un banco de 17040 moléculas fue analizado. 62 compuestos (10 familias de moléculas) fueron seleccionadas por su efecto inhibitorio sobre la captación de I^{125} en células de la línea HEK-293 transfectadas de forma estable con el ADNc de NIS con esta técnica (Lecat-Guillet *et al.*, 2008). De estos 62, 10 compuestos fueron escogidos para una caracterización más completa de su capacidad inhibidora por técnicas de electrofisiología. Los compuestos fueron llamados ITB 1 a ITB 10 por *Iodide Transport Blocker* (Lecat-Guillet *et al.*, 2008). En este trabajo se analizó si estos 10 ITBs poseen una acción rápida, específica y reversible sobre las corrientes de la membrana inducidas por el yodo en ovocitos de *Xenopus laevis* que expresan la NIS. Las corrientes corresponden al transporte electrogénico del yodo acoplado al sodio catalizado por la NIS.

B. 1. MATERIALES Y MÉTODOS

a. Materiales

Los compuestos, identificados como ITB (*Iodide Transport Blockers*), fueron comprados de una librería química (*Diverset*, Chembridge, UK). La pureza e identidad de cada compuesto fue verificada por resonancia magnética nuclear (^1H NMR, *Bruker avance distrene-plasticizer-xylene* 400) y espectrometría de masas (LC-MS, *Water, Saint-Quentin* en Yvelines, France). La disidenina y la isodisidenina fueron aisladas de la esponja marina *Dysidea herbacea* como ha sido reportado en trabajos anteriores (Lecat-Guillet *et al.*, 2007 y 2008). La pureza de los compuestos utilizados fue superior al 98%.

b. Preparación de ARNc de NIS

El ARNc de NIS de ratón fue sintetizado a partir de un vector de clonación pcDNA3.1 (Invitrogen) con el *mMessage mMachin*e T7 Ultra kit (Ambion, *Applied Biosystems*, Courtaboeuf, France), siguiendo las recomendaciones del fabricante.

c. Aislamiento e inyección de Ovocitos de *Xenopus laevis*

Partes de los lóbulos de ovarios fueron removidos de hembras de *X. laevis* anestesiadas (compradas en el *Centre d'Élevage du CNRS*, Montpellier, France) e incubados durante 4 horas a 18 °C en una solución de *Ringer* libre de calcio (Ori) que contenía 2 mg/ml de colagenasa (tipo A, (Sigma-Aldrich), 1 mg/ml de inhibidor de tripsina (Sigma-Aldrich) y 0.1 mg/ml de gentamicina (Invitrogen).

Los ovocitos en etapa de desarrollo V-VI fueron microinyectados (*microinjector Nanoject II*, *Drummond, Broomall*, PA, USA) con 23 ng de ARNc de NIS y conservados en solución Ori a 18°C hasta el momento de ser utilizados en los experimentos. La composición de la solución

Ori fue: 110mM de NaCl, 5 mM de KCl, 1 mM de MgCl₂, 2 mM de CaCl₂ y 5 mM del tampón ácido N-2-hidroxietilpiperazine- NO-etanesulfónico (HEPES) (pH 7.5).

d. Medidas electrofisiológicas

Para estudiar las corrientes asociadas al cotransportador Na⁺/I⁻ clonado en los ovocitos, se utilizó la técnica de *Voltage Clamp* de dos microelectrodos convencional (Eskandari *et al.*, 1997). Todos los experimentos fueron realizados con los ovocitos de 4 a 6 días después de la inyección del ARNc de NIS. El potencial de reposo de los ovocitos se fijó a -40 mV y la corriente necesaria para mantener dicho potencial fue medida (*Dagan TEV-200A Two Electrode Voltage Clamp*). Durante los experimentos, cada ovocito se mantuvo bajo perfusión constante (con un flujo de aproximadamente 1.5 ml/min) con una solución experimental (TpNa) que contenía: 100 mM de NaCl, 2 mM de KCl, 1 mM de MgCl₂, 1 mM de CaCl₂ y 10 mM de HEPES (pH 7.5), suplementado con yodo y/o ITB de acuerdo con el siguiente orden: 1) 50 mM NaI, 2) 50 mM ITB, 3) 50 mM NaI/50 mM ITB/0.5% DMSO and 4) 50 mM NaI. Cada ovocito fue perfundido con cada una de las soluciones de yodo y/o ITB durante 50 segundos, seguido de una perfusión con TpNa hasta que el yodo y/o el compuesto ITB precedente fuera completamente lavado, y la corriente necesaria para mantener el potencial regresara a la línea de base. Se utilizaron diferentes concentraciones de los compuestos ITB para la determinación del IC₅₀ (5; 10; 20; 30; 40 y 80 mM). Cada ovocito fue desechado después del paso 4. La solución *stock* de los compuestos ITB fue almacenada en DMSO a 20°C, y posteriormente descongelada y diluida 200 veces en TpNa inmediatamente antes de ser utilizada. La solución de pipeta contenía KCl 3 M. Todos los resultados mostrados en este trabajo son el promedio de al menos tres experimentos independientes.

e. Análisis estadísticos

El Error Estándar de la Media (S.E.M por sus siglas en inglés) fue calculado para todos los experimentos utilizando el programa Excel. Igualmente, se realizó una prueba t de Student

para determinar diferencias significativas, utilizando el programa SigmaStat (*Systat Software Inc., London, UK*).

B. 2. RESULTADOS

a. Efecto de los ITB sobre la corriente inducida por el yodo en ovocitos de *X. laevis* que expresan la proteína NIS

Los compuestos ITB fueron identificados a través de un sistema de escaneo de alto rendimiento por su capacidad para inhibir la captación de yodo en células de mamífero que expresan el cotransportador NIS. Estos compuestos presentaron diferentes efectos sobre la corriente inducida por el yodo en ovocitos de *X. laevis* inyectados con el ARNc de dicha proteína.

Para cada experimento, un ITB fue analizado utilizando un ovocito. El potencial de reposo del ovocito fue fijado a -40 mV, y cada ensayo se llevó a cabo de la siguiente manera: Primero, se verificó la actividad de la proteína NIS expresada, con una solución de perfusión con yodo (TpNa/I), la adición de 50 μM de I^- al medio de perfusión causó una corriente de entrada de aproximadamente 30 nA. Después de lavar el yodo con la solución TpNa, la corriente inducida regresó rápidamente al nivel basal, como se muestra en la Figura 1A. Luego, se observó el efecto del ITB solo sobre la corriente de reposo (solución de perfusión con ITB (TpNa/ITB)). La mayoría de las veces, el compuesto ITB solo no mostró ningún efecto significativo sobre la conductancia de membrana del ovocito (por ejemplo, ITB 5, Figura 1A). Sólo en algunos casos un efecto del compuesto ITB por sí mismo fue observado (por ejemplo ITB 4, Figura 1A). En general, estos efectos fueron reversibles y desaparecieron luego de lavar

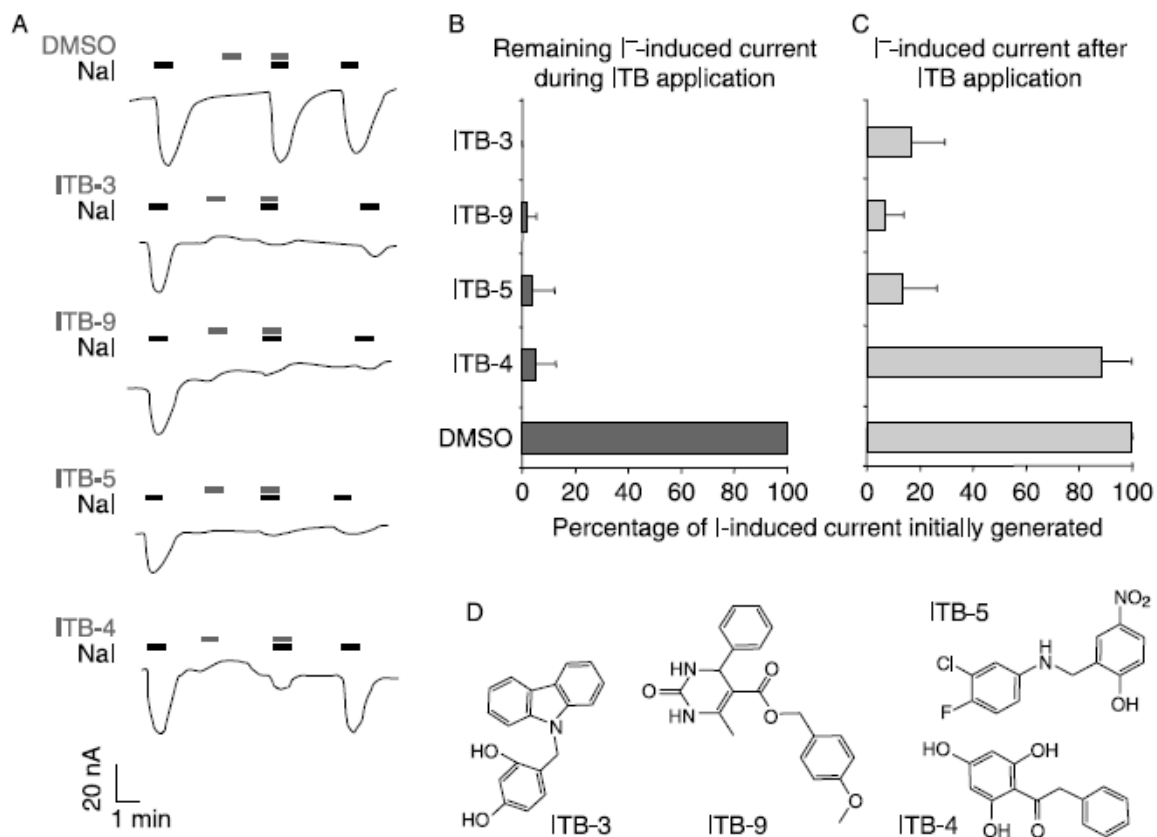


Figura 1: Efecto de los compuestos (*Iodide Transport Blocker*) ITB 3, ITB 9, ITB 5 e ITB 4 sobre la corriente inducida por el yodo en ovocitos de *X. laevis* que expresan NIS. (A) Registros de corrientes representativas en ovocitos inyectados con el ARNc de NIS cuyo potencial fue fijado a -40 mV y perfundidos con ITB 3, ITB 9, ITB 5, ITB 4, DMSO y/o Nal siguiendo el protocolo estándar indicado en el panel superior: 50 μ M Nal (barras negras); 50 μ M ITB/0.5% DMSO (barras grises). La línea de base fue establecida en la solución TpNa. (B) Inhibición de la corriente inducida por el yodo. La corriente de entrada inducida por 50 μ M Nal en presencia de 50 μ M ITB/0.5% DMSO se expresó como el porcentaje de la corriente inicial generada por 50 μ M Nal en el mismo ovocito. Las corrientes fueron normalizadas respecto a la corriente inducida por el yodo generada en presencia de 0.5% DMSO, el solvente utilizado para todos los compuestos (barras oscuras). (C) Reversibilidad del efecto inhibitorio. Los ovocitos fueron perfundidos con 50 μ M Nal después de la aplicación y lavado del compuesto, es decir, regreso de la corriente a la línea de base. La línea de base se estableció con la solución TpNa (solución experimental). La corriente generada se expresó como porcentaje de la corriente inicial generada por el yodo, y fue normalizada respecto a la corriente generada por el yodo después de la aplicación de DMSO (barras claras). Los datos se reportan como media \pm S.E.M de al menos tres experimentos independientes. (D) Estructuras químicas de ITB 3, ITB9, ITB5 e ITB4.

el ITB con la solución de perfusión, retornando la corriente a su nivel basal. En el siguiente paso se analizó la capacidad del compuesto ITB para inhibir la corriente inducida por el yodo, para lo cual la corriente necesaria para mantener el potencial de reposo fue medida en presencia de yodo y el ITB (solución de perfusión con yodo e ITB (TpNa/I/ITB)). Si el ITB tenía un efecto sobre la actividad de transporte catalizada por NIS, la presencia de yodo en la

solución de perfusión ya no debía conducir a la aparición de la corriente dependiente de yodo característica de NIS, como se ilustra con el ITB 5 en la Figura 1A. En el último paso, se estudió la reversibilidad de la inhibición. El ovocito fue perfundido con TpNA hasta que la línea de base fue recuperada y luego fue nuevamente perfundido con la solución TpNa/I, y se observó la reaparición o no de la corriente inducida por el yodo. Todos los compuestos ITB fueron estudiados siguiendo el protocolo descrito anteriormente, en ovocitos inyectados con el ARNc de NIS o con agua.

El efecto de los ITB del 1 al 10 se muestra en las Figuras 1 y 2. Los compuestos fueron ordenados de acuerdo a su capacidad para inhibir rápidamente la corriente inducida por el yodo. La Figura 1 muestra los resultados obtenidos con un primer grupo de cuatro compuestos (las estructuras químicas se muestran en la Figura 1D) que inhiben completamente la corriente inducida por el yodo (ITB 3) o muestran al menos una inhibición mayor al 90 o 95% (ITB 9, ITB 5 e ITB 4). La Figura 1A ilustra los registros típicos de corrientes obtenidos con ITB 3, ITB 9, ITB 5, ITB 4 y DMSO (el solvente utilizado para solubilizar los compuestos). El DMSO por sí mismo no alteró la conductancia de membrana del ovocito y no presentó ningún efecto sobre la corriente inducida por el yodo. ITB 3, ITB 9 e ITB 5 inhibieron más del 95% de la corriente de yodo (Figura 1B). Cuando estos compuestos fueron lavados con la solución TpNa por varios minutos, sólo entre el 0 y el 18% de la corriente inicial inducida por el yodo fue recuperada (Figura 1C). Sin embargo, el efecto inhibitorio del ITB 4 ($95\pm 8\%$) fue reversible, recuperándose el $89.5\pm 9.7\%$ de la corriente inicial inducida por el yodo. Se encontró también que el ITB 4 por sí mismo induce la aparición de una corriente de salida de 9 ± 5.6 nA (ver registros Figura 1A), fenómeno que será discutido más adelante.

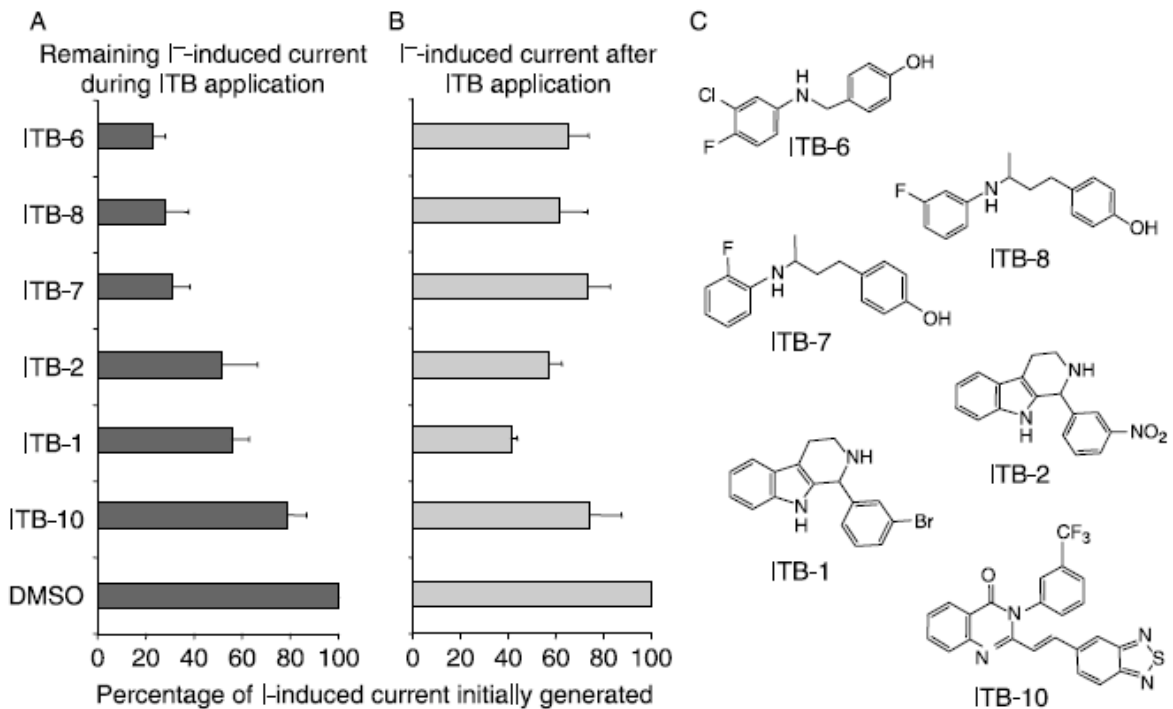


Figura 2: Efecto de los compuestos ITB 6, ITB 8, ITB 7, ITB 2, ITB 1 e ITB 10 sobre la corriente inducida por el yodo en ovocitos de *X. laevis* que expresan NIS. (A) Inhibición de la corriente inducida por el yodo en presencia de ITB 6, ITB 8, ITB 7, ITB 2, ITB 1, ITB 10 y DMSO. El potencial de membrana fue fijado a -40 mV. Las corrientes fueron registradas en ovocitos inyectados con el ARNc de NIS, de acuerdo con el protocolo estándar. La corriente de entrada inducida por 50 μ M NaI en presencia de 50 μ M ITB/0.5% DMSO se expresó como el porcentaje de la corriente inicial generada por 50 μ M NaI en el mismo ovocito. Las corrientes fueron normalizadas respecto a la corriente inducida por el yodo generada en presencia de 0.5% DMSO, el solvente utilizado para todos los compuestos (barras oscuras). (B) Reversibilidad del efecto inhibitorio. Los ovocitos fueron perfundidos con 50 μ M NaI después de la aplicación y lavado del compuesto, es decir, regreso de la corriente a la línea de base. La línea de base se estableció con la solución TpNa. La corriente generada se expresó como porcentaje de la corriente inicial generada por el yodo, y fue normalizada respecto a la corriente generada por el yodo después de la aplicación de DMSO (barras claras). Los datos se reportan como media +S.E.M de al menos tres experimentos independientes. (C) Estructuras químicas de ITB 6, ITB 8, ITB 7, ITB 2, ITB 1 e ITB 10.

La Figura 2 se ilustra los resultados obtenidos con los compuestos ITB 6, ITB 8, ITB 7, ITB 2, ITB 1 e ITB 10. Las estructuras químicas de estas moléculas se muestran en la Figura 2C. El efecto inhibitorio de estos compuestos sobre la corriente inducida por el yodo fue menor al 80% (Figura 2A). ITB 6, ITB 7 e ITB 8 inhibieron cerca del 72% de la corriente de yodo (Figura 2A) y el lavado de los compuestos llevó a una recuperación del 67% de la corriente inicial (Figura 2B). ITB 1 e ITB 2 causaron una inhibición de más o menos 50% de la corriente inducida por el yodo, y el efecto inhibitorio persistió después del lavado de los compuestos con la solución TpNa y la perfusión con la solución TpNa/I (Figura 2B). ITB 10 sólo afectó

ligeramente la corriente inducida por el yodo (Figura 2A). Sin embargo, este pequeño efecto inhibitorio no fue reversible (Figura 2B). De forma más precisa, ITB 6, ITB 8, ITB 7, ITB 2, ITB 1 e ITB 10 mostraron una inhibición de la corriente inducida por el yodo de 76.8 ± 5 , 72 ± 10 , 69 ± 7 , 48 ± 14 , 44 ± 7 y $21 \pm 8\%$ respectivamente. Después del lavado del compuesto y de la adición del yodo $50 \mu\text{M}$, 65 ± 8.5 , 62 ± 11 , 74 ± 9 , 57 ± 5 , 41 ± 2.5 y $76 \pm 5\%$ respectivamente de la corriente inicial observada fue recuperada.

Para garantizar que la concentración de $50 \mu\text{M}$ induce el máximo efecto inhibitorio, se determinó el valor de IC_{50} para cuatro de los compuestos más eficaces. Los valores encontrados fueron $5.87 \mu\text{M} \pm 0.87 \mu\text{M}$ para ITB 9, $4.18 \mu\text{M} \pm 1.1 \mu\text{M}$ para ITB 3, $7.9 \mu\text{M} \pm 2.4 \mu\text{M}$ para ITB 5 y $12 \mu\text{M} \pm 1.9 \mu\text{M}$ para ITB 4.

b. Efecto de otras moléculas, descritas como inhibidores de NIS sobre la corriente inducida por el yodo

Además de los compuestos ITB, se analizó el efecto sobre la corriente inducida por el yodo de las moléculas orgánicas disidenina, isodisidenina, ouabaina y 4,4'-diisotiociano-2,2'-estilbeno disulfonato (DIDS) (Figura 3). La disidenina es una toxina proveniente de la esponja marina *D. herbacea* (para la estructura química ver la Figura 3C), y ha sido descrita como un inhibidor específico del cotransportador Na^+/I^- en organocultivos de tiroides bovina, en vesículas membranales provenientes de tiroides bovina y en líneas celulares de mamífero que expresan la proteína NIS (Vroye *et al.*, 1998). En los resultados obtenidos en este trabajo, la disidenina mostró una inhibición del $42 \pm 21\%$ de la corriente inducida por el yodo (Figura 3A). El efecto inhibitorio de la disidenina fue completamente reversible (Figura 3B). Con la isodisidenina, un epímero sintetizado de la disidenina (Figura 3C), se observó una inhibición del $29 \pm 5\%$ de la corriente de entrada inducida por el yodo (Figura 3A). Sin embargo, y en contraste con la disidenina, el efecto inhibitorio de la isodisidenina fue irreversible (Figura 3B).

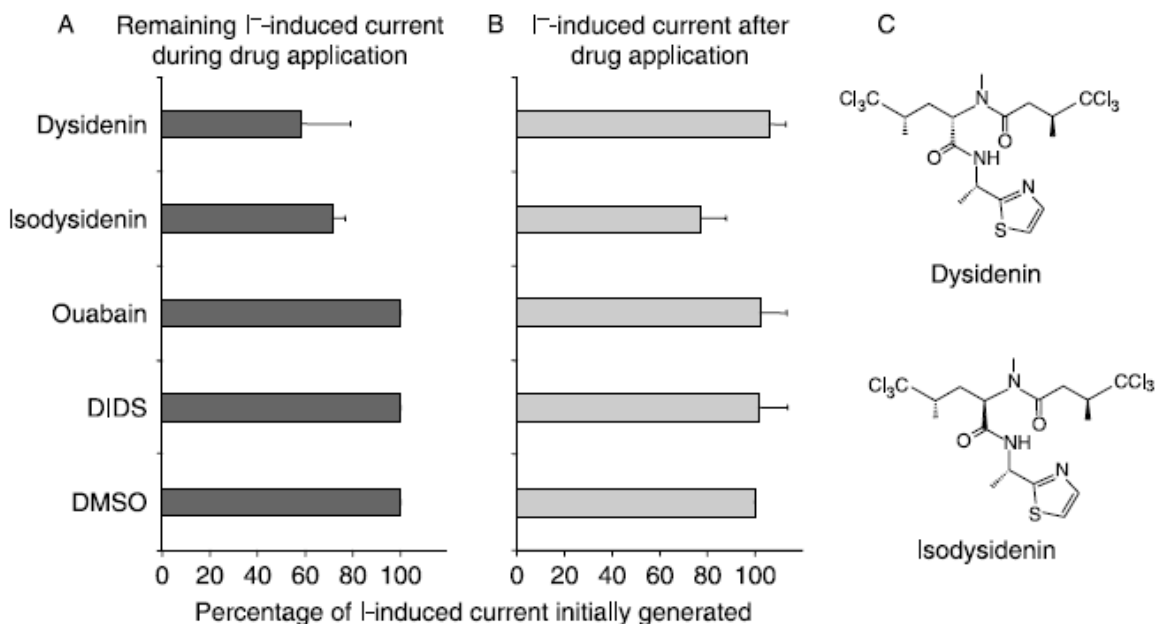


Figura 3: Efecto de disidenina, isodisidenina, ouabaina y DIDS sobre la corriente inducida por el yodo en ovocitos de *X. laevis* que expresan NIS. (A) Inhibición de la corriente inducida por el yodo en presencia de disidenina, isodisidenina, ouabaina, DIDS y DMSO. El potencial de membrana fue fijado a -40 mV. Las corrientes fueron registradas en ovocitos inyectados con el ARNc de NIS, de acuerdo con el protocolo estándar. La corriente de entrada inducida por 50 μ M Nal en presencia de 50 μ M del compuesto/0.5% DMSO se expresó como el porcentaje de la corriente inicial generada por 50 μ M Nal en el mismo ovocito. Las corrientes fueron normalizadas respecto a la corriente inducida por el yodo generada en presencia de 0.5% DMSO, el solvente utilizado para todos los compuestos (barras oscuras). (B) Reversibilidad del efecto inhibitorio. Los ovocitos fueron perfundidos con 50 μ M Nal después de la aplicación y lavado del compuesto, es decir, regreso de la corriente a la línea de base. La línea de base se estableció con la solución TpNa. La corriente generada se expresó como porcentaje de la corriente inicial generada por el yodo, y fue normalizada respecto a la corriente generada por el yodo después de la aplicación de DMSO (barras claras). Los datos se reportan como media \pm S.E.M de al menos tres experimentos independientes. (C) Estructura químicas de la disidenina y la isodisidenina.

De igual forma, se estudió el efecto (como controles negativos) de la ouabaina y del DIDS, cuyo efecto sobre la captación de yodo en líneas celulares derivadas de tiroides y en células que expresan la proteína NIS ha sido reportado, pero no como una interacción directa con la NIS. La ouabaina, un conocido inhibidor de la Na^+/K^+ ATPasa, induce una disminución del gradiente transmembranal de sodio, afectando la fuente de energía necesaria para el transporte de yodo (Tyler *et al.*, 1968). Sin embargo, la ouabaina no interactúa directamente con la proteína NIS y, por lo tanto, no debería mostrar un efecto rápido sobre la corriente inducida por el yodo medida en los experimentos de *Voltage Clamp*. Como se esperaba, no se observó ninguna inhibición sobre la corriente de entrada inducida por el yodo con esta

molécula (Figura 3A). Por otra parte, un aumento de la captación de yodo radioactivo en células que expresan la proteína NIS en presencia de DIDS, un conocido bloqueador de canales de cloro (Chow *et al.*, 1987, Amphoux-Fazekas *et al.*, 1998). Los resultados obtenidos por ambos grupos indican que este efecto se debe más a una inhibición de la salida de yodo que a un efecto directo sobre la actividad de la NIS. Como se esperaba, no se observó ninguna inhibición sobre la corriente inducida por el yodo con DIDS (Figura 3A).

c. Efecto de los ITB sobre la conductancia de membrana basal de los ovocitos de *X. laevis*

En la Figura 4 se observa el efecto de los diferentes compuestos en la conductancia de membrana de los ovocitos que expresan la proteína NIS en ausencia de yodo. ITB 3, ITB 9, ITB 4 y la disidenina inducen una significativa corriente de salida de 4 ± 2.4 , 9 ± 3.2 , 7.5 ± 5.4 y 8 ± 3.5 nA, respectivamente. La amplitud de estas pequeñas corrientes varía notoriamente, como se observa en la Figura 4. Con excepción de la disidenina, estos compuestos también inducen una inhibición casi total de la corriente inducida por el yodo, como se observa en la Figura 3. Contrariamente a la disidenina, la isodisidenina no induce ninguna corriente, como era de esperarse. La ouabaina induce una corriente de entrada de 8.25 ± 0.35 nA que se debió a la inhibición de la salida de sodio catalizada por la Na^+/K^+ ATPasa. Ninguna corriente fue inducida en presencia de DIDS.

