



**UNIVERSIDAD
ANDRÉS BELLO**

**UNIVERSIDAD ANDRÉS BELLO
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**ESTUDIO DEL MECANISMO DE
INHIBICIÓN DEL YODURO (I⁻) SOBRE EL
SIMPORTER Na⁺/I⁻ (NIS)**

**TESIS ENTREGADA A LA
UNIVERSIDAD ANDRÉS BELLO
PARA OPTAR AL GRADO DE
DOCTOR EN BIOCIENCIAS MOLECULARES**

ALEJANDRO ANDRÉS ARRIAGADA SERRANO

TUTOR: DRA. CLAUDIA RIEDEL SORIA

2013

RESUMEN

El yoduro (I^-) es un elemento escaso en la tierra y los vertebrados lo requieren de manera esencial para la síntesis de las hormonas tiroideas. Por ello, el primer paso y limitante en la biosíntesis de estas hormonas, es el transporte activo de I^- hacia la glándula tiroidea, proceso mediado por la proteína simporter Na^+/I^- (NIS). Esta proteína tiene una localización basolateral en las células foliculares de la tiroidea y su expresión está fuertemente regulada por la hormona estimulante de la tiroidea (TSH). También es conocido el efecto regulatorio del I^- sobre la síntesis de las hormonas tiroideas. Se ha determinado que altas concentraciones de I^- inhiben la síntesis de hormonas tiroideas (efecto Wolff-Chaikoff). Adicionalmente se ha demostrado que el exceso de I^- es capaz de disminuir la cantidad de NIS luego de 24 h de exposición, con lo cual la glándula tiroidea impide la excesiva entrada de este elemento como mecanismo adaptativo. Sin embargo, estos trabajos han sido realizados con cantidades extremadamente excesivas de I^- en la dieta, que se alejan dos mil veces sobre el consumo normal. Por ello, en esta tesis evaluamos si cantidades excesivas por sobre 20 veces de I^- el consumo normal de una rata, pueden inhibir la captura de I^- a tiempos tempranos sin afectar la localización ni cantidad de NIS. Además es conocido que el I^- puede inducir la producción de H_2O_2 en la tiroidea, por lo que un posible mecanismo de inhibición temprana puede estar dado a través la producción de especies reactivas derivadas de oxígeno (ROS), ejerciendo su efecto inhibitorio en la captura de I^- a tiempos cortos de exposición. Para ello planteamos la siguiente hipótesis: ***“Exceso de I^- , por tiempos cortos en la célula tiroidea, disminuye su captura mediante un mecanismo que involucra la producción de ROS sin modificar la presencia de NIS en la membrana plasmática”***

Con el objetivo de evaluar nuestra hipótesis, se utilizaron ratas adultas, que recibieron 20 veces la cantidad de I^- recomendada durante 5 h, 1 día ó 6 días. Estas ratas mostraron disminuida la captura de I^- en la tiroidea. El contenido de NIS en el tratamientos de 5 h no se vio alterado significativamente. En tanto, que los tratamientos de 1 ó 6 días indujeron una disminución en el contenido total de NIS en comparación a ratas control. Además esta disminución se correlacionó con la reducción de la captura de I^- . El análisis de inmunofluorescencia indicó que durante 5 h, 1 día o 6 días NIS mantiene su localización en

la superficie celular de la región basolateral como las tiroides provenientes de animales control.

El mecanismo que subyace la inhibición de la captura de I^- inducido por el exceso de I^- se analizó en una línea celular de tiroides de rata. Como se observó en la tiroides, las células FRTL-5 expuestas a exceso de I^- por periodos cortos significativamente disminuyen la captura de I^- sin alterar el contenido y la localización de NIS en la superficie celular. Encontramos que el exceso de I^- aumenta los niveles intracelulares de especies reactivas derivadas de oxígeno (ROS), que las moléculas ROS inhibieron la captura de I^- y que los inhibidores farmacológicos de ROS revirtieron la inhibición de la captura de I^- mediado por exceso de I^- . Estos resultados contribuyen con nueva información acerca de la regulación de NIS en células tiroideas. Además, este conocimiento permitirá el desarrollo de nuevas estrategias para mejorar la captura de I^- en el tratamiento del cáncer de tiroides.

ABSTRACT

Iodide (I^-) is a limited element on earth and vertebrates require it for the synthesis of thyroid hormones. Therefore, the first limiting step in the biosynthesis of these hormones is the active transport of I^- to the thyroid gland, process mediated by the Na^+/I^- symporter (NIS). This protein has basolateral localization in thyroid follicular cells and its expression is tightly regulated by thyroid stimulating hormone (TSH). It is also known that the regulatory effects of I^- on synthetic metabolism of thyroid hormones. It has been determined that high concentrations of I^- inhibit thyroid hormone synthesis (Wolff-Chaikoff effect). Additionally it has been shown that the excess of I^- is able to inhibit the amount of NIS, thereby preventing the excessive thyroid uptake of this element as adaptive mechanism. However, those studies have been performed with extremely high amounts of I^- in the diet, over 2,000 times normal consumption. Therefore, in this thesis we found that 20 times over the normal consumption of I^- inhibits the I^- uptake. It has been reported Even though it is known that I^- excess, for more than 24 h, inhibits NIS activity through reducing the synthesis of NIS, it is not known the mechanisms that underlay the inhibitor effect of excess of I^- for short periods. Given that I^- excess induces the production of H_2O_2 in the thyroid, we decided to evaluate whether I^- excess through the production of ROS, exerts its inhibitory effect on I^- uptake when thyroid cells are exposed to short time to I^- excess. To do this we propose the following hypothesis: "***Short times of I^- excess in the thyroid cells, inhibit its uptake by a mechanism that involves the production of ROS without altering the presence of NIS at the plasma membrane***"

In order to evaluate our hypothesis we used adult rats receiving 20 times the amount of I^- recommended for 5 h, 1 day and 6 days. These rats showed reduced thyroid I^- uptake. The content of NIS in the treatment of 5 h was not altered significantly. Meanwhile, the treatments of 1 and 6 days induced a decrease in the total NIS content compared to rats receiving a normal diet without I^- excess. Immunofluorescence analysis of these experiments for NIS localization in thyroid slices showed that NIS main localization remains in the basolateral region, without differences with the control group. The mechanism underlying I^- uptake inhibition induced by I^- excess was analyzed in a rat thyroid cell line FRTL-5. As in thyroid gland, FRTL-5 cells exposed to I^- excess for short times significantly decrease I^- uptake without altering the content and localization of NIS at

the cell surface. We found that I^- excess increases the intracellular level of reactive derived species of oxygen (ROS) in FRTL-5 cells, that ROS molecules inhibited I^- uptake and that pharmacological inhibitors of ROS revert I^- inhibition due to excess of I^- .

These results contribute with new information about NIS regulation in thyroid cells. In turn this knowledge will bring up new strategies to improve I^- uptake in the treatment of thyroid cancer.