

**EXPRESIÓN DE DESYODASA TIPO 3 (D3)
EN DIVERSOS TEJIDOS DE *Chiloscyllium punctatum*
Hernández Puga, A. G.; Mayorga Martínez, L.; Valverde-R., C.
Instituto de Neurobiología
Universidad Nacional Autónoma de México**

RESUMEN

Las hormonas tiroideas (HT) son esenciales para el crecimiento, el desarrollo y la regulación del metabolismo de los vertebrados, siendo la desyodación la vía más importante de su homeostasis. La desyodación es catalizada por las enzimas desyodasas, que remueven yodo de las moléculas de HT y se expresan de manera tejida específica siendo el controlador final de la actividad biológica de las HT. El estudio de la fisiología tiroidea en peces cartilaginosos ha recibido muy poca atención, por lo que en este proyecto se iniciaron estudios para determinar en que tejidos extrahepáticos de *Chiloscyllium punctatum* se expresa la D3; principal enzima que cataliza la inactivación de HT. Para lo cual se utilizó la metodología de RT-PCR para amplificar un fragmento específico de D3 y posteriormente éste fue identificado por Southern Blot. Se confirmó la presencia de D3 en hígado mientras que en otros tejidos no fue detectable. Se propone la aplicación de métodos alternativos para detectar su expresión extrahepática.

INTRODUCCIÓN

La glándula tiroides es la primera glándula endocrina que aparece durante el desarrollo embrionario, secreta las HT o yodotironinas (T_4 y T_3) encargadas de regular procesos metabólicos como el crecimiento somático, gasto energético, diferenciación y maduración del sistema nervioso central en vertebrados. Su principal mecanismo de acción es a nivel nuclear. La T_3 tiene la mayor afinidad a los receptores nucleares de hormona tiroidea (TR), los cuales son capaces de reconocer una secuencia específica de ADN (TRE); regulando la síntesis de proteínas que activan o inhiben procesos biológicos dependientes de yodotironinas (Tresguerres, 1992).

La tiroides esta formada por los folículos tiroideos, cada uno integrado por una monocapa de células epiteliales llamadas tirocitos, que rodean un lumen lleno de coloide rico en tiroglobulina; los tirocitos poseen la capacidad de concentrar yodo, elemento esencial para la síntesis de las yodotironinas (Tresguerres, 1992). La función de la tiroides es regulada por el eje hipotálamo-hipófisis-tiroides, en el que las neuronas del hipotálamo elaboran el tripéptido tiro liberina (TRH) que interacciona con sus receptores de membrana en los tirotropos hipofisarios, donde se controla la síntesis y secreción de la hormona estimulante de la tiroides (TSH). La TSH actúa a nivel de los folículos tiroideos, iniciando la síntesis y secreción de las hormonas tiroideas (Valverde et al, 1993). Se ha considerado a la desyodación de HT como un cuarto eslabón de dicho eje dado que regula la concentración de hormonas activas e inactivas en el organismo.

Las HT están formadas por dos anillos bencénicos unidos por un puente de oxígeno, uno unido a una cadena de alanina (anillo α ó interno) y otro con un grupo fenilo (anillo β ó externo), ambos con posibles átomos de yodo como radical (**Figura 1**); su nombre es determinado por la posición del yodo: 3,5,3',5'-L-tiroxina (T_4), 3,5, 3'-triyodo-L-tironina (T_3), 3,5,3'-triyodo-L-tironina (rT_3) y 3,3' T_2 . La desyodación es una reacción de remoción de yodo de manera esteroespecífica en la que participan tres desyodasas: D1, D2 y D3. Estas son

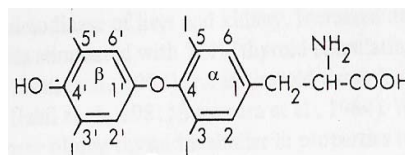


Figura 1. Estructura básica de las yodotironinas

proteínas integrales de membrana que pertenecen a la familia de las selenoproteínas; las cuales poseen el aminoácido selenocisteína (Se-Cys) en su sitio activo, el cual es codificado por el triplete de término UGA y traducido por la presencia del elemento SECIS (secuencia de inserción para selenocisteína) ubicado en el extremo 3'-UTR del mRNA (Orozco y Valverde, 2005). Existen dos vías de desyodación: la vía de desyodación del anillo externo o vía de activación (ORD) en la que participan D1 y D2 y la vía de desyodación del anillo interno o vía de inactivación (IRD) siendo D3 la enzima principal (Bianco *et al.*, 2005).

Se ha descrito la presencia de desyodasas en diversos vertebrados (**Tabla 1**), las cuales difieren en su distribución tisular, preferencia al sustrato y factores de inhibición. También se han descrito homólogos de desyodasas en urocordados (Kuiper *et al.*, 2005).

Tabla 1. Características de desyodasas en mamíferos.

	D1	D2	D3
Localización en tejido	hígado, riñón y tiroides, glándula pituitaria	cerebro, pituitaria anterior, tiroides y músculo esquelético	placenta, útero gestante y tejidos fetales
Actividad	ORD e IRD	ORD	IRD

La D3 contribuye a la homeostasis de hormonas tiroideas protegiendo a los tejidos de un exceso de éstas, lo que es particularmente importante durante el desarrollo temprano pues previene la exposición prematura de niveles inapropiados de T₃ en tejidos fetales. Hasta la fecha se ha expresado y caracterizado cDNA's de D3 para diversos vertebrados. En el caso de peces óseos se ha clonado en tilapia, pez pulmonado y tiburón; y se ha encontrado que se expresa en tejidos como cerebro, branquia, piel, hígado, pulmón, riñón y corazón de tilapia (Sanders *et al.*, 1999) y en hígado de *Ch. punctatum* (Orozco y Valverde, 2005).

El estudio de la tiroides en peces cartilaginosos ha recibido muy poca atención; por lo que análisis sobre la actividad de las desyodasas en estos organismos es mínima. En el 2005 Leary *et al.* estudiaron la actividad ORD hepática en “dogfish” con el fin de comprender la regulación de hormona tiroidea y su homeostasis. El presente trabajo forma parte de un proyecto desarrollado en el laboratorio de Fisiología Evolutiva del Instituto de Neurobiología de la UNAM a cargo del Dr. Carlos Valverde-Rodríguez, donde principalmente se ha clonado la D3 hepática en *Ch. punctatum*.

OBJETIVO

Determinar la expresión de la desyodasa tipo 3 en diferentes tejidos *Chiloscyllium punctatum* mediante RT-PCR.

METODOLOGÍA

Se realizó la extracción de RNA total a partir de diversos tejidos (hígado, estómago, músculo, corazón, branquia) de *Ch. punctatum* utilizando el método de Trizol (Invitrogen) (**Anexo 1**). La integridad del RNA extraído se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. La pureza y concentración del RNA extraído se determinó espectrofotométricamente (**Anexo 2**). Se utilizaron 10 µg de RNA total para llevar a cabo la síntesis de cDNA por RT (Reverse Transcription) (**Anexo 3**) usando enzima SuperScript II (Invitrogen). El cDNA obtenido se sometió a PCR para amplificar un fragmento específico que codifica para la D3 (≈800 pb) para lo cual se utilizó el siguiente par de oligonucleótidos: oligonucleótido sentido tib1 ATGGCGCGCCTCAAGTCC y oligonucleótido antisentido Asd3 ATTATATTTAATAATAAATATTCCAGG, diseñados en base a la secuencia de cDNA que fue previamente clonada. Para la reacción de PCR se usó Platinum®Taq DNA Polymerase (Invitrogen) con el siguiente esquema de amplificación {94°C x 5', (94°C x 1', 57°C x 1, 72°C x

1`} x 35 ciclos, 72°C x 1`} (Anexo 4). Los productos de PCR se sometieron a electroforesis en gel de agarosa utilizando marcador de peso molecular de 1kb (Promega). Finalmente para determinar la presencia de fragmentos específicos para D3 se realizó Southern Blot (Anexo 5), utilizando una sonda específica para la D3 de tiburón. Las muestras se transfirieron a una membrana de nylon, la cual se sometió a hibridación con la sonda marcada con P³² y se expuso en una pantalla sensible a radiaciones y se reveló en un escáner.

RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS

En la **Figura 1** se observa un gel de electroforesis que muestra la integridad del RNA total extraído de todos los tejidos *Ch. punctatum*; el RNA total está compuesto en un 98-99% por RNA ribosomal, la presencia de bandas bien definidas correspondientes a RNA ribosomal son indicador de la integridad del RNA total extraído. En la **Tabla 2** se muestran los valores de absorbancia obtenidos para cada uno de los tejidos y las relaciones A₂₆₀/A₂₈₀ que se encuentran por debajo del rango establecido para RNA puro (1.9-2.1). Se puede deducir que las muestras presentaban algún contaminante, probablemente proteínas. Estas muestras de RNA fueron sometidas a RT-PCR. La **Figura 2** muestra los productos de PCR en el gel de electroforesis. En el **carril c** correspondiente a hígado, se observa una banda bien definida de aproximadamente 800 pb, mientras que en los demás tejidos se observa una banda de menor peso. Este gel se sometió a Southern Blot para lo cual una vez transferido a una membrana de nylon se hibridó con una sonda específica para D3. La **Figura 3** muestra los resultados de la hibridación, se observa que la expresión de D3 solo ocurre en hígado y esta ausente en las demás muestras.

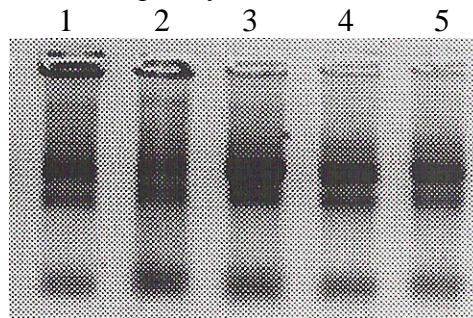


Figura 1. RNA total extraído de *Ch. punctatum*.
Carril 1. Hígado 2. Estómago 3. Músculo
4. Corazón 5. Branquia.

Tabla 2. Pureza y concentración del RNA total.

Tejido	A ₂₆₀	A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	Concentración RNA (µg /µL)
Hígado	0.187	0.117	1.59	3.74
Estómago	0.399	0.228	1.75	7.98
Músculo	0.181	0.115	1.58	3.62
Corazón	0.075	0.050	1.50	2.30
Branquia	0.101	0.070	1.44	2.02

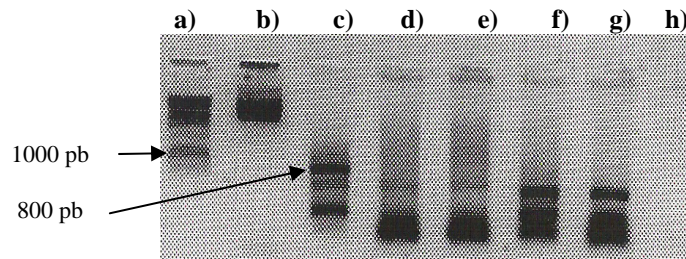


Figura 2. Electroforesis en gel de los productos de PCR. **Carril a)** Marcador de Peso Molecular **b)** Plásmido PG-MT con la secuencia de D3 **c)** Hígado **d)** Estómago **e)** Músculo **f)** Corazón **g)** Branquia

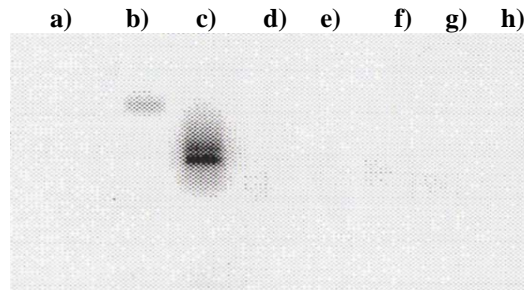


Figura 3. Membrana de nylon revelada del Southern Blot. **Carril a)** Marcador de Peso Molecular **b)** Plásmido PG-MT con la secuencia de D3 **c)** Hígado **d)** Estómago **e)** Músculo **f)** Corazón **g)** Branquia

CONCLUSIONES

La expresión de D3 en la especie *Chiloscyllium punctatum* fue confirmada en hígado, mientras que en otros tejidos no se observó expresión según lo revela el Southern Blot.

Se propone realizar estudios alternativos como PCR en tiempo real o Northern Blot para determinar la expresión de D3 en otros tejidos de *Chiloscyllium punctatum*.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Bianco, A., y Reed Larsen, P., "Cellular and Structural Biology of the Deiodinases", *Thyroid*, 15, 777-786, **2005**
- Kuiper, G., et al., "Biochemical Mechanisms of Thyroid Hormone Deiodination", *Thyroid*, 15, 787-798, **2005**
- Leary, S., Ballantyne, J., Leatherland, J., "Evaluation of Thyroid Hormone Economy in Elasmobranch Fishes, With Measurements of Hepatic 5'-Monodeiodinase Activity in Wild Dogfish", *Journal of Experimental Zoology*, 284, 492-499, **1999**
- Núñez, J., y Pommer, J., "Vitamins and Hormones", *Academic Press, Inc.*, Vol 3, **1998**
- Orozco, A., y Valverde-R, C., "Thyroid Hormone Deiodination in Fish", *Thyroid*, 15, 799-813, **2005**
- Tresguerres, J., "*Fisiología Humana*", Interamericana Mc Graw- Hill, Madrid, **1992**
- Valverde, C., Aceves C., Navarro, L., "Hormonas a la medida y para toda ocasión", *Ciencia y Desarrollo*, 11, 22-33, **1993**

ANEXOS

Anexo 1: “Extracción de RNA total”

1. Agregar 1 mL de TRIzol por cada 100 mg de tejido. Homogenizar el tejido usando un pistilo estéril o el Polytron.
2. Incubar la solución homogenizada a temperatura ambiente por 5 min. Agregar 0.2 mL de cloroformo por 1 mL de TRIzol, agitar vigorosamente e incubar a temperatura ambiente por 2-3 min.
3. Centrifugar a 12000g por 15 min a 4°C. Transferir la fase acuosa a un tubo limpio.
4. Agregar 0.5 mL de isopropanol por 1 mL del volumen original de TRIzol. Incubar a temperatura ambiente por 10 min, centrifugar a 12000g por 10 min a 4°C.
5. Remover y descartar el sobrenadante. Enjuagar el pellet con 1 mL de etanol 75% por 1 mL del volumen de TRIzol original. Centrifugar a 7500g por 5 min a 4°C.
6. Secar el pellet en campana de flujo laminar (Air-dry). No permitir que seque completamente. Eluir el RNA en agua DEPC e incubar a 60° para disolver el pellet.
7. Determinar la pureza del RNA en un espectrofotómetro. Almacenar el RNA en agua a -80°, o en acetato de sodio y etanol a -20°.

Anexo 2: “Determinación de la pureza y concentración del RNA total”

1. Tomar 2 µL del RNA total extraído y hacer una dilución 1:500 en agua DEPC. Agitar en vortex por unos segundos.
2. Prender el espectrofotómetro y elegir la molécula a analizar. Calibrar con 1 mL de agua DEPC.
3. Desechar el agua y colocar 1 mL de la muestra en la celda de cuarzo y leer absorbancia a 260 nm, 280 nm y la relación A_{260}/A_{280} . Registrar datos en la bitácora y repetir el procedimiento para cada una de las muestras.
4. Calcular la concentración de RNA total ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) utilizando la siguiente formula:
[RNA total]= (A_{260})(40)(Factor de Dilución).
5. Determinar los µg de RNA total en el volumen de muestra con la siguiente formula:
 $\mu\text{g RNA} = \text{RNA total } \mu\text{g}/\mu\text{L} (\text{volumen de elución}).$

Anexo 3: “Transcripción Reversa (RT)”

1. Precipitar 10 µg de RNA total o 1 µg de RNA poli A⁺; secar el pellet.
2. Disolver el RNA en agua libre de RNAsas y agregar el primer para obtener un volumen final de 11.5 µL. Para primers oligo-dT use 100 pmol. Para primers específicos para genes, use 2 pmol.
3. Incubar la mezcla RNA/primer a 65° por 3 min para desnaturalizar, agitar brevemente y colocar en hielo.
4. Combinar en un tubo a temperatura ambiente:

µL	5X first strand buffer (BRL)
2 µL	0.1 M DTT
0.5 µL	RNAsin
1 µL	20 mM dNTPs
11.5 µL	mezcla RNA/primer

5. Colocar el tubo en un termociclador y caliente a 42°.
6. Después de que el tubo haya alcanzado los 42°, agregar 1.0 µL de transcriptasa reversa Super Script II.

7. Incubar a 42° por 2 h.
8. Incubar la reacción a 65° por 20 min para inactivar la enzima.
9. Agregar 1 µL de RNAsa H; incubar a 55° por 20 min para digerir el RNA.
10. Usar 1 µL de la reacción de RT para PCR.

Anexo 4: “Reacción de Cadena de la Polimerasa (PCR)”

1. Rotular los tubos marcando el control +, control – y muestras.
2. Preparar en cada tubo la mezcla de reacción para obtener un volumen final de 50 µL:

Agua DEPC	40.5 µL
Buffer 10 X	5 µL
MgCl ₂	1.5 µL
dNTPs	0.5 µL
Oligo Sentido	0.5 µL
Oligo Antisentido	0.5 µL
Taq polimerasa	0.5 µL
Templado	1 µL para controles 3 µL para muestras

3. Seguir el esquema de amplificación elegido y al terminar almacenar los tubos a 4°C.

Anexo 5: “Southern Blot”

Soluciones:

- ~ Solución de desnaturalización. NaCl 1.5 M/NaOH 0.5 M
 - ~ Solución de Neutralización. NaCl 1.5 M/Tris.Cl 1M pH 7.4
 - ~ Solución de Transferencia. SSC 20X (NaCl 3M/ Na₃ citrato. 2H₂O 0.3 M)
 - ~ Solución para gel DNA. TBE 0.5 X.
1. Esterilizar todo el material y soluciones que se vayan a utilizar.
 2. Cargar las muestras de DNA con buffer de cargado Syber Green y correr a 96 V durante 30 min.
 3. Lavar el gel con agua estéril y sumergir 20´ en 10 vol:gel de solución de desnaturalización agitando ligeramente.
 4. Lavar el gel con agua estéril y sumergir 20´ en 10 vol:gel de solución de neutralización agitando ligeramente.
 5. Cortar la membrana de nylon para la transferencia y sumergir 5´ en agua estéril.
 6. Cortar 2 pedazos de papel filtro y una cartera de papel filtro al tamaño del gel.
 7. Colocar la membrana en el sistema de transferencia de geles al vacío.
 8. Bañar la membrana con solución de transferencia SSC 20X y colocar sobre ésta el gel.
 9. Transferir al vacío hasta que hayan pasado 100 mL de solución de transferencia.
 10. Tomar una fotografía del gel con luz UV para asegurar que se realizó la transferencia.
 11. Colocar la membrana dentro de la cartera de papel filtro con ayuda de pinzas e incubar a 60° por 10 min.
 12. Someter la membrana seca al UV cross-linking.
 13. Hibridar con la sonda específica marcada. Exponer a una pantalla sensible a radiaciones y revelar en un escáner.