

Expresión de la desyodasa tipo 3 (D3) en tejidos de la serpiente *Pitouphis deppei*.

Mendoza Cisneros, A.; Villalobos Aguilera, P.; Orozco, A.; Valverde, C.

Laboratorio de Fisiología evolutiva. Departamento de Neurobiología Celular y Molecular. Instituto de Neurobiología, UNAM Campus Juriquilla, Qro. Julio 2007

RESUMEN

En todos los vertebrados las hormonas tiroideas (HT) son esenciales para el crecimiento y desarrollo. Las HT son moléculas que se caracterizan por contener yodo y son producidas en la glándula tiroides. El 100 % de los niveles circulantes de la hormona tiroxina o tetrayodotironina (T_4) son secretados por dicha glándula, mientras que solamente aporta el 20 % de la concentración sérica de la triyodotironina (T_3). La T_4 es considerada una prohormona que mediante desyodación extratiroidea genera isómeros con tres o dos átomos de yodo. La T_3 es la yodotironina biológicamente activa. La desyodación extratiroidea constituye el paso final para el efecto de las HT, ya que mediante esta vía metabólica se asegura que cada célula obtenga la HT activa o inactiva que requiera. En la desyodación participan tres enzimas; la desyodasa tipo 1 (D1) que puede catalizar tanto la remoción de átomos de yodo del anillo externo (ORD) o del anillo interno (IRD). La desyodasa tipo 2 (D2) que cataliza exclusivamente la vía ORD y genera T_3 a partir de T_4 , y la desyodasa tipo 3 (D3) que inactiva la (T_3). La D3 se expresa en muchos tejidos durante varias etapas del desarrollo y su actividad es regulada por factores de crecimiento y varias hormonas. En este experimento se determinó la expresión de la (D3) en diferentes tejidos de la serpiente *Pitouphis deppei*. Así, mediante la extracción del RNA mensajero, la transcripción reversa, RT-PCR y southern blot se encontró que la enzima se expresa en cerebro, hígado, corazón, músculo, piel e intestino. Por lo que se concluyó que la expresión de esta enzima es importante en la etapa adulta de los reptiles para prevenir la sobre exposición de los tejidos a las hormonas tiroideas.

INTRODUCCION

Mediante la caracterización bioquímica, molecular y funcional de las desyodasas en otros grupos de vertebrados se sabe que son selenoproteínas que difieren en cuanto a su mecanismo de reacción, sensibilidad a inhibidores, sustrato preferencial, distribución tisular, localización intracelular, perfil ontogénico y su regulación. Las yodotironinas son muy importantes en el metabolismo y desarrollo de todos los vertebrados, en los reptiles participan específicamente en la muda de piel. Los estudios de desyodación en reptiles son escasos y se refieren a la caracterización cinética de esta vía. A la fecha no se ha clonado ningún mensajero de las desyodasas en este grupo de vertebrados. Previamente en nuestro laboratorio se reportó la caracterización cinética y la clonación del cDNA que codifica para la D3 en el hígado de organismos adultos de la serpiente *Pituophis deppei*. Este experimento se diseñó para evaluar la expresión del RNA mensajero que codifica para la D3 en otros tejidos de esta especie. Lo anterior resulta interesante dado que la D3 en otros vertebrados sólo se ha reportado en el hígado fetal, placenta, útero, piel y cerebro.

OBJETIVO: Demostrar la expresión del ARN mensajero que codifica para la desyodasa tipo 3 en cerebro, corazón, hígado, intestino, músculo y piel de *Pitouphis deppei*.

DESARROLLO EXPERIMENTAL

EXTRACCION DE RNA TOTAL. Se utilizo el método de extracción de RNA de un solo paso el cual utiliza Trizol (GibcoBRL), que contiene fenol e isotiocianato de guanidina. Agregando cloroformo se separan la mayoría las proteínas y grasas y el RNA permanece en la fase acuosa el luego se purifica mediante precipitación con isopropanol, se lava y se disuelve finalmente.

OBTENCION DEL DNA COMPLEMENTARIO (RT). Este método utiliza la enzima transcriptasa reversa (RT). Utilizando el RNA extraído del paso anterior como templado y un oligo dT se obtuvo el DNA complementario hibridado con RNA el cual se purifico agregando una RNasa H.

AMPLIFICACION DEL cDNA PARA LA DESYODASA TIPO 3 (RT-PCR). La amplificación del fragmento del cDNA que codifica para la D3 se realizó utilizando como templado el producto de la transcripción inversa. Como iniciadores se diseñaron oligonucleótidos a partir de secuencias de aminoácidos conservadas para la D3 en diferentes especies, los cuales permiten amplificar un fragmento de 300 pares de bases.

TRANSFERENCIA DE DNA A MEMBRANA DE NYLON (SOUTHERN BLOT). Se utilizó la técnica modificada de Maniatis. El DNA se corrió en un gel de agarosa durante 45 minutos usando un marcador de peso para identificar la banda amplificada. El gel fue tratado con una solución de desnaturalización (NaOH 1.5 M/NaCl 0.5 M) por 45" y luego con una solución de neutralización a pH 7.4 (Tris 1.5 M/NaCl 0.5 M) posteriormente se colocó en la cámara de transferencia durante 3 horas hasta que pasaron 100 ml de buffer de transferencias. La membrana fue secada 60 ° durante 10 minutos y finalmente DNA se enlazo covalentemente a la membrana usando el cross-linker.

HIBRIDACIÓN DE DNA CON SONDA RADIATIVA.

La membrana fue tratada durante 45 minutos con una solución de prehibridación, luego se utilizó una sonda marcada con ³²P para hibridar el DNA fijado en la membrana de nylon durante 24 horas. Luego se retiró la sonda y se lavó la membrana dos veces. La membrana se colocó en un cassette con una pantalla que capta las emisiones del fósforo radiactivo, finalmente la pantalla se leyó en un escáner STORM.

RESULTADOS Y DISCUSION

EXTRACCION DE RNA TOTAL.

Tejido	Concentración ng/ul	Relación 260 nm/280 nm
Cerebro	752.71	1.77
Corazón	1063.81	1.91
Piel	8029.57	1.95

El RNA obtenido se corrió en un gel de agarosa al mismo tiempo que el RNA de músculo, hígado e intestino con el cual ya se contaba para el experimento. Con el fin de observar las bandas de RNA ribosomal y mensajero y determinar la pureza del mismo.

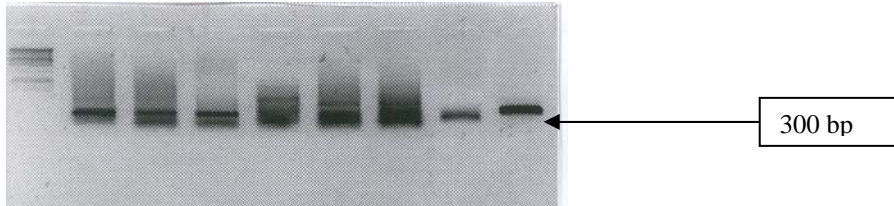
OBTENCION DEL DNA COMPLEMENTARIO (RT).

Por cada RT se utilizó como templado un volumen total de RNA equivalente a 10 ug. El producto de la transcripción inversa no se sometió a ningún análisis de pureza por UV o electroforesis.

AMPLIFICACION DEL cDNA PARA LA DESYODASA TIPO 3 (RT-PCR)

Para la amplificación del fragmento del cDNA de la desyodasa tipo 3, se utilizaron como iniciadores 0.025 μ mol de cada uno de los oligos. Como templado se utilizaron 2 μ l del RT del paso anterior. La reacción se llevo a cabo durante 40 ciclos a 55°, 72°, y 95° cada ciclo.

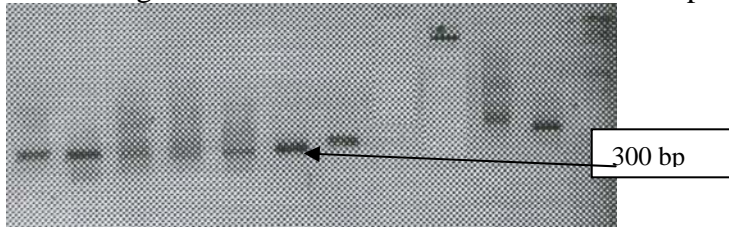
El fragmento de DNA amplificado es de alrededor de 300 pares de bases por, en la electroforesis en gel de agarosa se observa una banda que corresponde a este tamaño en todos los tejidos, utilizando el marcador 1 kb plus DNA ladder. La banda observada en el testigo negativo se descartará más adelante al realizar la hibridación.



La imagen muestra de izquierda a derecha: marcador de peso, cerebro, corazón, hígado, intestino, músculo, piel, testigo negativo y testigo positivo.

Las bandas que aparecen en todos los casos corresponden con el tamaño esperado del fragmento amplificado; en el caso del testigo negativo corresponde a una contaminación.

Para corregir este error realizamos nuevamente la amplificación por PCR.



En esta imagen se muestra de izquierda a derecha: cerebro, corazón, hígado, intestino, músculo, piel, testigo positivo 1, negativo, plasmido, banda purificada (pd4/3'), banda purificada 5'pd, y marcador de peso. Las bandas observadas en todas las muestras corresponden al peso esperado, lo cual indica que se amplificó el fragmento de DNA deseado pero se comprueba en el siguiente paso al realizar la transferencia de DNA y posteriormente la hibridación con sonda marcada.

TRANSFERENCIA DE DNA A MEMBRANA DE NYLON (SOUTHERN BLOT).

HIBRIDACIÓN DE DNA CON Sonda RADIOACTIVA.

La hibridación con sonda marcada con 32 P del DNA transferido a la membrana de nylon confirma la presencia del fragmento del gen que codifica para D3 en todos los tejidos en los que se realizó el experimento, así mismo demuestra que la banda observada en el testigo negativo corrido en el gel de agarosa es una contaminación que no corresponde al DNA amplificado en los otros casos.

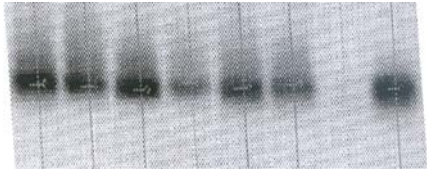


Figura 3. Membrana 1

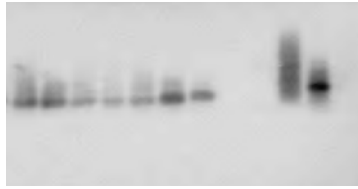
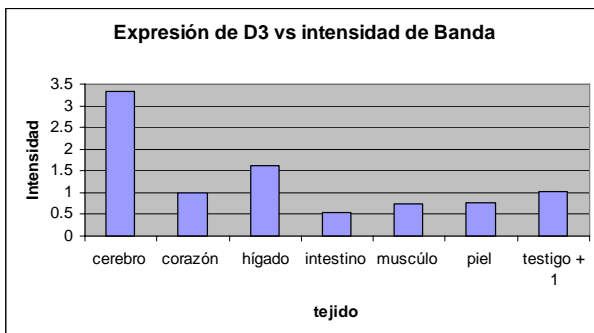


Figura 2. Membrana 2

La membrana 1 muestra de izquierda a derecha las bandas que corresponden al fragmento de cDNA que codifica para D3 hibridado con la sonda marcada; así se confirma que el gen se expresa en todos los tejidos que analizamos.

La membrana 2 se realizó para confirmar los resultados obtenidos en la membrana 1; en este caso utilizamos como testigos positivos tres bandas purificadas obtenidas en un experimento previo; la amplificación del fragmento buscado se confirma con la hibridación en todos los carriles; las bandas purificadas usadas como testigo positivo también presentan hibridación.



La grafica 1. Expresión del gen que codifica para D3 en los diferentes tejidos.

En la grafica 1 se observa la mayor expresión del gen que codifica para D3 en el tejido cerebral, y la menor en el caso del intestino.

CONCLUSIONES

El RNA mensajero que codifica para la D3 se expresa en cerebro, corazón, hígado, intestino, músculo y piel de *Pitouphis deppei*.

Se observó la relación entre la expresión del RNA mensajero de la D3 y su actividad enzimática.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

DLS Germain, "5-Deiodinase A Thyroid Hormone-Regulated Gene in *Xenopus laevis* Encodes a Type III Iodothyronine" PNAS, USA. Abril 2007

García, M. C. "Efecto de las yodotironinas sobre la regulación de las desyodasas tipo 1 y 2 en el Hígado de *Fundulus heteroclitus*". Tesis de maestría. Instituto de neurobiología campus UNAM-UAQ, gro.

Kathryn B. "The Type III 5-Deiodinase in *Rana catesbeiana* Tadpoles Is Encoded by a Thyroid Hormone-Responsive Gene" Department of Physiology, Dartmouth Medical School, Lebanon, New Hampshire 03756-0001

Maniatis. "Molecular Cloning" Cold spring harbor laboratory press. 1989 USA.

Tres Guerras. "Fisiología humana" Interamericana Mc Graw Hill.

Villalobos, P "Clonación y caracterización del DNA complementario (cDNA) que codifica para la desydaso tipo 1 en el hígado de *Fundulus Heteroclitus*". Tesis de Maestría. Instituto de neurobiología campus UNAM-UAQ, qro.