

En la búsqueda del “Eslabón perdido” en la acción del yodo sobre la célula tiroidea*

* Primer Premio “Fundación Dr. José Luis Novelli” para profesionales menores de 40 años, 2011.

Jurado: Marcelo Figari (Argentina), Paulo Luis Kowalski (Brasil), Hugo Niepomnische (Argentina), Ariel Sánchez (Argentina)

Lisa Thomasz, Luciano Rossich, Romina Oglio, María Alejandra Dagrosa,
Mario Alberto Pisarev, Guillermo Juan Juvenal
Comisión Nacional de Energía Atómica, Unidad Actividad Radiobiología,
División Bioquímica Nuclear. Buenos Aires, Argentina.

Glánd Tir Paratir 2011; (20): 8-13

Resumen

Introducción: El yodo es utilizado por la glándula tiroidea para sintetizar hormonas tiroideas, pero además cumple un rol regulatorio a través de la síntesis de lípidos yodados. De ellos se han identificado y caracterizado dos: la 6-yodo-11,14-eicosatrienoico- δ -lactona (IL- δ) y el 2-yodo-hexadecanal (IHDA) que inhiben varios parámetros tiroideos. *Objetivo:* investigar el efecto del IHDA sobre el crecimiento y la muerte celular programada, con el fin de determinar una posible aplicación de este compuesto como fármaco para el tratamiento del crecimiento de la glándula tiroidea. *Metodología y Resultados:* las células FRTL-5 fueron tratadas con concentraciones crecientes de IHDA o KI en presencia de TSH. El IHDA inhibió la proliferación celular en forma dosis y tiempo dependiente y el análisis del ciclo celular mostró que el IHDA produjo un aumento del número de células en G1. Al analizar la expresión del complejo AP-1 se observó que la expresión de c-jun cayó a partir de la primera hora de tratamiento. El IHDA produjo un incremento en la actividad de caspasa-3 y en la expresión de Bax luego de 6 h de tratamiento. *Conclusiones:* el IHDA sería un posible candidato como intermediario en la acción del yodo y podría utilizarse como fármaco para el tratamiento del crecimiento de la glándula tiroidea.

Palabras clave: iodolípidos, autorregulación, proliferación celular.

Summary

THE QUEST FOR THE LOST LINK IN THE ACTION OF IODINE ON THE THYROID CELL

Introduction: Iodine is used by the thyroid gland to synthesize thyroid hormones and also plays a regulatory role through the synthesis of iodinated lipids. Two of them have been identified and characterized: 6-iodo-11,14-eicosatrienoic- δ -lactone (IL- δ) and 2-iodo-hexadecanal (IHDA), which inhibit various thyroid parameters. *Objective:* To investigate the effect of IHDA on thyroid cell growth and apoptosis, in order to determine a possible application of this compound as a drug for the treatment of thyroid gland growth. *Methods and Results:* FRTL-5 cells were treated with increasing concentrations of IHDA or KI in the presence of TSH. The IHDA inhibited cell proliferation and cell cycle analysis showed that IHDA increased cell number in G1 phase. By analyzing the expression of AP-1 complex, it was observed that c-jun expression decreased from the first hour of treatment. IHDA increased also the activity of caspase-3 and Bax expression after 6 h of treatment. **Conclusions:** IHDA is a possible intermediary in the action of iodine in the autoregulatory mechanism and could be used in the treatment of thyroid gland growth.

Key words: iodolipids, self regulation, cellular proliferation.

Introducción

El yodo no sólo es utilizado por la glándula tiroidea para formar hormonas tiroideas,

sino que es un importante modulador de la función y crecimiento glandular. En condiciones de carencia de yodo, la glándula se hace hipersensible a la acción estimuladora de la TSH sobre el crecimiento y funciones diferenciadas. A esta regulación, vinculada a las va-

Recibido para publicación: 30/11/2010

Aceptado: 11/03/2011

Correspondencia: thomasz@cnea.gov.ar

riaciones del contenido intratiroideo de yodo y que es propia de la glándula, se la denomina *autorregulación tiroidea*. La carencia de yodo produce graves trastornos en la población afectada, tales como bocio endémico, hipotiroidismo y trastornos físicos y mentales.

Se ha demostrado que para que el yodo ejerza su acción autorregulatoria debe ser incorporado a moléculas orgánicas. La mayoría de los parámetros tiroideos que son inhibidos por el exceso de yodo, son liberados de esta inhibición si se incuba *in vitro* o administra *in vivo*, simultáneamente con el exceso de yodo, drogas que bloquean la acción de la peroxidasa tiroidea, como el metilmercaptoimidazol (MMI) o el propiltiouracilo (PTU). Los estudios de nuestro y de otros laboratorios permitieron describir una nueva vía metabólica del yodo, que lleva a la biosíntesis de lípidos iodados. De ellos se han identificado y caracterizado dos: la 6-yodo-11,14-eicosatrienoico- δ -lactona (IL- δ)^{1,2} y el 2-yodo-hexadecanal (IHDA)^{3,4}. Estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que los iodolípidos reproducen los efectos de exceso de yodo. Específicamente podemos mencionar que la IL- δ posee efectos inhibitorios sobre el crecimiento. *In vitro* la IL- δ inhibe la proliferación celular en la línea FRTL-5⁵. En cortes de tiroides bovinas se ha demostrado que reproducen los efectos inhibitorios del yodo tanto en lo que respecta a la captación⁶, organificación⁷ y generación de H₂O₂⁸. A nivel de la membrana celular⁹, han demostrado que el I-HO-A y su omega lactona (IL- ω) reproducen los efectos inhibitorios del yodo sobre la captación de desoxiglucosa y la actividad de la Na⁺K⁺ ATPasa. Se ha demostrado que la IL- δ no solo previene el desarrollo del bocio cuando se administra simultáneamente con el bociógeno, sino que produce la involución del bocio preformado en ratas¹⁰. Sin embargo no reproduce la totalidad de los efectos del yodo¹¹.

El iodo-hexadecanal reproduce los efectos del exceso de yodo sobre la producción de AMPc y de H₂O₂¹²⁻¹⁵. *In vivo*, el IHDA inhibe la generación del bocio inducido por MMI¹⁶.

El IHDA sería el mediador de dos importantes mecanismos regulatorios en la glándula tiroides: el efecto Wolff-Chaikoff y la inhibición de la adenilato ciclasa.

El objetivo de este trabajo es investigar el efecto del IHDA sobre el crecimiento y la muerte celular programada, con el fin de determinar una posible aplicación de este compuesto como fármaco para el tratamiento del hipertiroidismo y/o crecimiento de la glándula tiroides.

Metodología

Cultivos celulares. Las células FRTL-5 fueron crecidas en placas de 96 pocillos (2.000 células por pocillo) en medio 6H (DMEM, antibióticos, somatostatina 10 ng/ml, hidrocortisona 0,4 ng/ml, transferrina 5 μ g/ml, glicil-L-histidil-L-lisina 10 ng/ml, insulina 10 μ g/ml y TSH 0,5 mU/ml) con 5% de SFB durante 48 h y mantenidas en estufa de cultivo a 37°C en atmósfera humidificada con 5% de CO₂. Luego se realizaron los distintos tratamientos.

Ensayos de proliferación celular. Las células se sembraron en placas de 96 pocillos (p96) a una densidad de 2.000 células/pocillo en medio DMEM-F12 con SFB 5%. Luego de 48 h se realizaron los tratamientos. Las células se trataron con dosis crecientes de IHDA y KI 0 μ M, 0,5 μ M, 5 μ M, 10 μ M y 33 μ M durante 24, 48 y 76 h. Al finalizar los tratamientos las células fueron incubadas con 10 μ l de una solución de MTT (5 mg/ml) durante 3 h a 37°C. Las placas se leyeron espectrofotométricamente a una longitud de 540 nm.

Ciclo celular. Las células fueron tratadas durante 24, 48 y 72 h con 10 y 33 μ M de IHDA. Finalizados los tratamientos las células fueron tripsinizadas, fijadas en etanol y teñidas con yoduro de propidio para el análisis por citometría de flujo.

Electroforesis y transferencia de proteínas. Para la siembra se utilizaron 40 μ g de muestra en *buffer* de carga 2x (glicerol 1,6 ml, β -mercaptoetanol 0,8 ml, Tris-HCl 0,5 M (pH 6,8) 2 ml, SDS 10% 3,2 ml y azul de bromofenol punta de espátula). Las proteínas fueron separadas por SDS-PAGE 10% (electroforesis en gel de poliacrilamida) en *buffer* de corrida (0,25 M Tris base, 1,92 M glicina, 1% SDS). Las electroforesis se llevaron a cabo durante una hora a un amperaje constante de 15 mA con el sistema *mini-protean* de Biorad. Finalizada la electroforesis los geles se transfirieron a membranas de nitrocelulosa sumer-

gidas en *buffer* de transferencia (0,25 M Tris base, 1,92 M glicina, 20% metanol). La transferencia se llevó a cabo por 90 min a 4°C a voltaje constante de 100 V en *buffer* de transferencia. Finalizada la transferencia las membranas se incubó con el primer anticuerpo durante toda la noche a 4°C. Los anticuerpos utilizados fueron: anti-Bax (*Calbiochem*) en una dilución 1:500, anti-Bcl-2 (*Calbiochem*) en una dilución 1:200, anti c-fos (*Calbiochem*) en una dilución 1:200, anti c-jun (*Calbiochem*) en una dilución 1:200, antiactina (*sigma*) en una dilución 1:1.000. Posteriormente se incubó con el segundo anticuerpo (dilución 1:3.000, *Amersham*) por una hora a temperatura ambiente. Se utilizó el método de quimioluminiscencia (*enhanced chemiluminescence*, *Amersham Biosciences*) para visualizar las proteínas específicas. Los resultados se expresan en unidades arbitrarias de densidad óptica, referidas en unidades porcentuales respecto al control.

Cuantificación de apoptosis por la actividad de Caspasa-3. Para cuantificar la actividad de caspasa-3 se utilizó el *Colorimetric Caspase-3 Assay Kit* (*Sigma CASP-3-C*, *Sigma-Aldrich*, St. Louis, Missouri). La reacción se basa en la hidrólisis del sustrato peptídico *Ac-DEVD-pNA* por la caspasa-3 resultando en la liberación de *pNA* que se cuantifica espectrofotométricamente a 405 nm. Las mues-

tras se rompieron con 50 µl del *buffer* de lisis adjunto en el kit durante 10 min en hielo. A continuación la actividad de de caspasa-3 fue cuantificada incubando las muestras con 10 µl del sustrato peptídico *Ac-DEVD-pNA* durante 3 h a 37°C.

Análisis estadístico. Se realizó el ANOVA haciendo las comparaciones con el test Student-Newman-Keuls (para comparaciones múltiples). Los resultados se expresan como la media ± el desvío estándar.

Resultados

Análisis de la proliferación celular en la línea FRTL-5.

Para estudiar el efecto del IHDA sobre la proliferación celular, las células FRTL-5 fueron tratadas con concentraciones crecientes de IHDA o KI (0,5 µM, 5 µM, 10 µM y 33 µM durante 24, 48 y 76 h), en presencia de TSH. Los valores obtenidos muestran que el IHDA inhibió la proliferación celular en forma dosis y tiempo dependiente (Fig. 1). Utilizando una dosis de 33 µM el IHDA produjo una inhibición del 30% ($p < 0,05$), 45% ($p < 0,01$) y 65% ($p < 0,001$) luego de 24, 48 y 72 h de tratamiento. A 10 µM la inhibición obtenida fue del 31% ($p < 0,05$) y 35% ($p < 0,01$) luego de 48 y 72 h respectivamente. Mientras que el ioduro de potasio inhibió la proliferación celular únicamente a 33 µM luego de 72 h de tratamiento (Fig. 2).

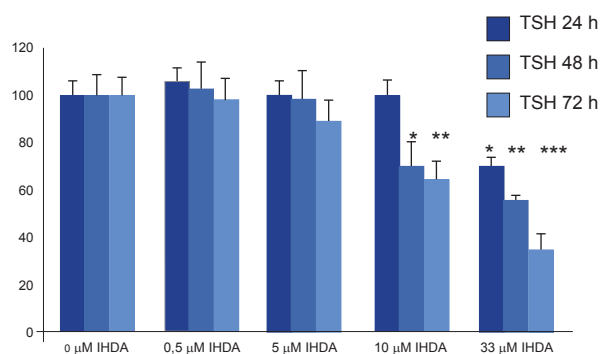


Figura 1. Efecto del IHDA sobre la viabilidad celular en la línea FRLT-5. Luego de 24, 48 y 72 hs de tratamiento las células fueron incubadas con 10 µl de una solución de MTT (5 mg/ml) durante 3 h, se disolvió en DMSO y se cuantificó espectrofotométricamente a 540 nm. Los datos se expresan como la media ± DE de cinco experimentos independientes (* $p < 0,05$ versus 0 µM IHDA, ** $p < 0,01$ versus 0 µM IHDA, *** $p < 0,001$ versus 0 µM IHDA).

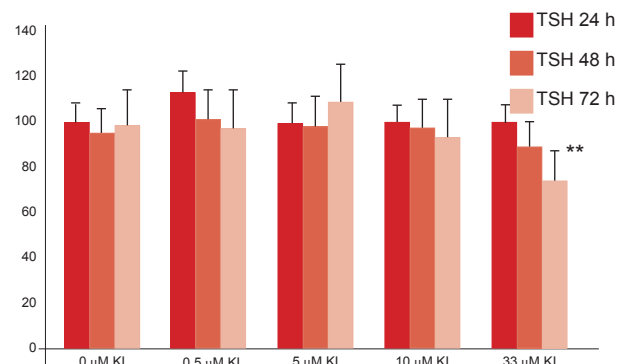


Figura 2. Efecto del KI sobre la viabilidad celular en la línea FRLT-5. Luego de 24, 48 y 72 h de tratamiento las células fueron incubadas con 10 µl de una solución de MTT (5 mg/ml) durante 3 h, se disolvió en DMSO y se cuantificó espectrofotométricamente a 540 nm. Los datos se expresan como la media ± DE de cinco experimentos independientes (* $p < 0,05$ versus 0 µM IHDA, ** $p < 0,01$ versus 0 µM IHDA, *** $p < 0,001$ versus 0 µM IHDA).

El análisis del ciclo celular por citometría de flujo mostró que el IHDA produjo un aumento del número de células en la fase G1 (Fig. 3).

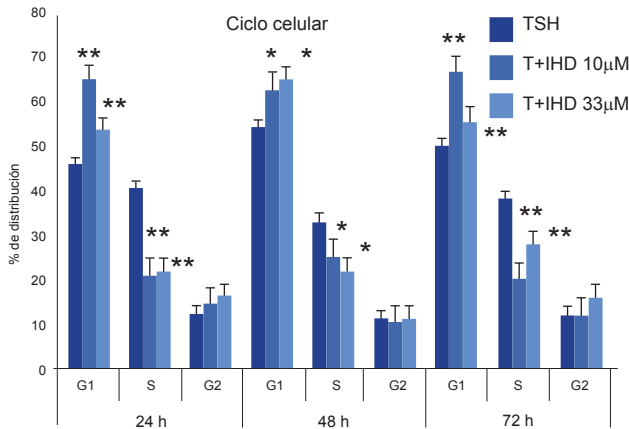


Figura 3. Análisis del ciclo celular por citometría de flujo. Las células fueron tratadas durante 24, 48 y 72 h con 10 y 33 µM de IHDA. Finalizados los tratamientos se cuantificó por citometría de flujo la progresión del ciclo celular. Los resultados se expresan como la media ± DE de tres experimentos independientes (* p< 0,05 versus TSH, **p<0,01 versus TSH)

Se llevó a cabo el análisis de la expresión de c-fos y c-jun, dos componentes del complejo AP-1 por *Western blot* (Fig. 4). Para ello se incubaron las células durante 0, 1, 3 y 6 h con 10 y 33 µM de IHDA [Fig. 4(a)]. En la Figura 4(b) se representa la densitometría de los resultados de la expresión de c-fos y c-jun. La expresión de c-fos se mantuvo en los tiempos ensayados, mientras que la expresión de c-jun cayó a partir de la primera hora de tratamiento a ambas dosis ensayadas.

Análisis de la muerte por apoptosis

Se analizó la muerte celular programada cuantificando la actividad de caspasa-3 luego de 1, 3 y 6 h de tratamiento a 33 y 10 µM de IHDA. Los resultados se encuentran representados en la Figura 5. Tras el agregado de IHDA encontramos un aumento significativo en la actividad de caspasa-3 a partir de las 6 h de tratamiento a 33 µM (**p<0,01). Luego analizamos la expresión de Bax y Bcl-2 por *Western blot* [Fig. 6 (a)]. No se observaron cambios significativos en la expresión de Bcl-2, mientras que los niveles de Bax (proteína proapoptótica) se vieron aumentados significativamente luego de 6 h de

tratamiento a una dosis de 33 µM. En la figura 6 (b) se muestra la densitometría de los resultados obtenidos como la relación Bax/Bcl-2.

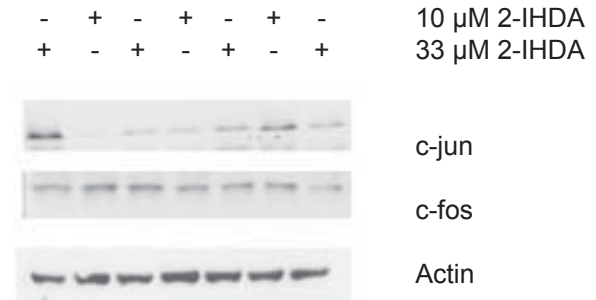


Figura 4 (a y b). Análisis por *Western Blot* de c-fos y c-jun. Las células fueron incubadas con 10 µM y 33 µM de IHDA durante 0, 1, 3 y 6 hs.

Fig. 4a. Autorradiografías de c-fos y c-jun.

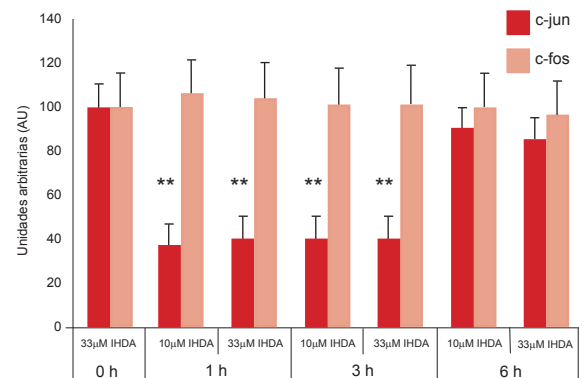


Fig. 4b. Cuantificación densitométrica de las autorradiografías. Los valores están expresados en unidades densitométricas arbitrarias como media ± SEM de cuatro experimentos independientes.

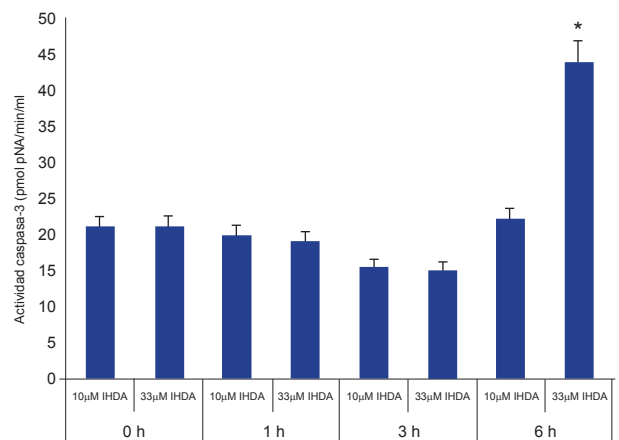


Figura 5. Actividad de caspasa-3 luego de 0, 1, 3 y 6 h de tratamiento con IHDA. La actividad de caspasa-3 se midió como pmol de pNA/min.ml. Los datos se expresan como la media ± DE de cuatro experimentos independientes (**p<0,01 versus 0 µM 2-IHDA).

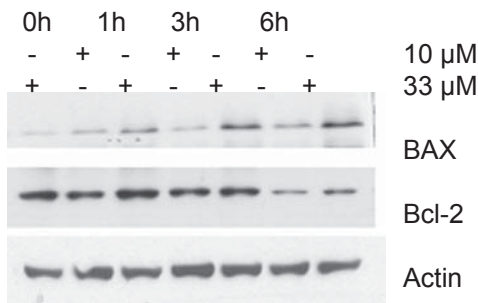


Figura 6 (a y b). Análisis por *Western blot* de Bax y Bcl-2. Las células fueron incubadas con 10 μM y 33 μM de IHDA durante 0, 1, 3 y 6 h.

Fig. 6a. Autorradiografías de c-fos y c-jun.

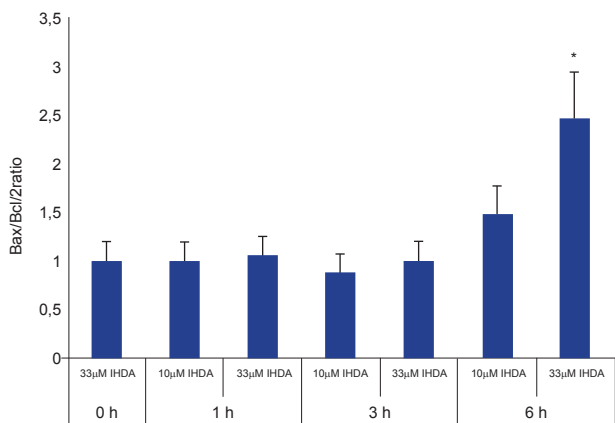


Fig. 6b. Cuantificación densitométrica de las autorradiografías. Los valores están expresados como la relación Bax/Bcl-2 en unidades densitométricas arbitrarias como media ± EEM de cuatro experimentos independientes.

Discusión

Como se ha descrito en la introducción, el IHDA reproduce los efectos del exceso de yodo sobre la producción de AMPc y de H_2O_2 ¹²⁻¹⁵. Por ese motivo se decidió analizar el efecto del IHDA sobre el crecimiento y la muerte celular programada en la línea celular FRTL-5. Se demostró que el IHDA inhibe la proliferación celular en forma dosis dependiente, mientras que el yoduro de potasio solo tuvo efecto a la dosis más alta. Los resultados de proliferación celular se correlacionan con el aumento del número de células en la fase G1 del ciclo celular y la disminución en la expresión de c-jun. Es conocido que frente a señales mitogénicas el complejo AP-1 (conformado por c-fos y c-jun) se une a secuencias consenso del DNA, regulando la expresión de

los genes adyacentes. Se conocen numerosos genes regulados por AP-1 fundamentales para la proliferación, la diferenciación celular y la apoptosis mediante su capacidad de regular la expresión y función de reguladores del ciclo celular.

Para analizar si el IHDA además de inhibir la proliferación celular, induce la muerte celular por apoptosis se analizó la actividad de la caspasa-3 y la expresión de Bax y Bcl-2 por *Western blot*. En el presente estudio se muestran evidencias del efecto proapoptótico del IHDA. El IHDA provocó un incremento en la actividad de la caspasa-3 y en la expresión de Bax luego de 6 h de tratamiento con la dosis más alta. El proceso de apoptosis es regulado por la familia de proteínas Bcl-2 que son reguladores centrales de las caspasas 3 y 9. En la muerte por apoptosis están involucradas diferentes vías de señalización, y la vía de AP-1 también es un posible candidato¹⁷. AP-1 es un factor de transcripción sensible a los cambios redox, y se ha descrito un incremento en la expresión de c-jun y c-fos por H_2O_2 . El IHDA inhibe a la NADPH oxidasa¹³ y disminuye los niveles de H_2O_2 ¹⁴. En este caso como consecuencia del tratamiento con IHDA observamos que c-jun responde rápidamente y disminuye su expresión. Esta disminución podría estar correlacionada con la inhibición de las DUOX.

Estos estudios mostrando que el IHDA inhibe la proliferación celular, induce la muerte por apoptosis y además *in vivo* inhibe la generación del bocio e induce la involución del bocio previamente generado por MMI¹⁶, abren nuevos interrogantes y posibles aplicaciones terapéuticas.

Bibliografía

1. Boeynaems JM, Pelster D, Oates JA, Hubbard WC. Novel transformation of arachidonic acid by the rat thyroid in vitro. *Biochim Biophys Acta* 1981; 665: 623-7.
2. Dugrillon A, Bechtner G, Uedelhoven WM. Evidence that an iodolactone mediates the inhibitory effect of iodine on thyroid cell proliferation but not on adenosine 3',5'-monophosphate formation. *Endocrinology* 1990; 127: 337-43.
4. Panneels V, Macours P, Van der Bengen H. Biosynthesis and metabolism of 2-iodohexadecanal in cultured dog thyroid cells. *JBC* 1996; 271: 23006-14.
5. Pisarev MA, Bocanera LV, Chester HA. Effect of io-

- doarachidonates on thyroid FRTL-5 cells growth. *Horm Metab Res* 1992; 24: 558.
6. Chazenbalk GD, Valsecchi RM, et al. Thyroid autoregulation inhibitory effects of iodinated derivatives of arachidonic acid in iodine metabolism. *Prostaglandins* 1988; 36: 163-72.
 7. Chazenbalk GD, Pisarev MA, Krawiec L, Juvenal GJ, Burton G, Valsecchi RM. In vitro inhibitory effects of an iodinated derivative of arachidonic acid on calf thyroid. *Acta Physiol Pharmacol Latinoam* 1984; 34: 367-73.
 8. Krawiec L, Chazenbalk GD, Puntarulo SA. The inhibition of PB125I formation on calf thyroid caused by 14-iodo-15 hydroxy-eicosatrienoic acid is due to effect to decreased H₂O₂ availability. *Horm Metab Res* 1988; 20: 86.
 9. Krawiec L, Chester HA, Bocanera LV, Pregliasco LB, Juvenal GJ, Pisarev MA. Thyroid autoregulation: evidence for an action of iodoarachidonates and iodide at the cell membrane level. *Horm Metab Res* 1991; 23: 321-5.
 10. Pisarev MA, Chazenbalk GD, Valsecchi RM. Thyroid autoregulation. Inhibition of goiter growth and of cAMP formation in rat thyroid by iodinated derivatives of arachidonic acid. *J Endocrinol Invest* 1988; 1: 669-74.
 11. Thomasz L, Oglio R, Rivandeira DT, et al. Inhibition of goiter growth and of cyclic AMP formation in rat thyroid by 2-iodohexadecanal. *Mol Cell Endocrinol* 2010; 317: 141-7.
 12. Pereira A, Braekman JC, Dumont JE. Identification of a major iodolipid from the horse thyroid gland as 2-iodohexadecanal. *JBC* 1990; 265: 17018-25.
 13. Ohayon R, Boeynaems JM, Braekman JC, Van den Bergen H, Gorin Y, Virion A. Inhibition of thyroid NADPH oxidase by 2-iodohexadecanal in a cell-free system. *Mol Cell Endocrinol* 1994; 99: 133-41.
 14. Panneels V, Van den Bergen H, Jacoby C, et al. Inhibition of H₂O₂ production by iodoaldehydes in cultured dog thyroid cells. *Mol Cell Endocrinol* 1994; 102: 167-76.
 15. Panneels V, Van Sande J, Van den Bergen H, et al. Inhibition of human thyroid adenylyl cyclase by 2-iodoaldehydes. *Mol Cell Endocrinol* 1994; 106: 41-50.
 16. Thomasz L, Oglio R, Dagrosa A, Krawiec L, Pisarev M, Juvenal G. 6-iodo- δ -lactone reproduces many but not all the effects of iodide. *Mol Cell Endocrinol* 2010; 323: 161-6.
 17. Hung-Yun L, Heng-Yuan T, Ai S, et al. Thyroid hormone is a MAPK-dependent growth factor for thyroid cancer cells and is anti-apoptotic. *Steroids* 2007; 72: 180-7.