



16 - OPTIMIZACIÓN DE UN ENSAYO NO RADIOACTIVO DE CAPTACIÓN DE YODURO EN LA LÍNEA CELULAR HEK293 Y EN EPITELIO FOLICULAR DE TIROIDES HUMANO

J. Tubío Viturro¹, M.C. Suárez Fariña², M.Á. Chenlo Miranda², S. Pérez Romero², M.N. Blanco Freire³, C. Spitzweg⁴, J. Köhrle⁵, L. Fugazzola⁶, J.M. Cameselle Teijeiro⁷ y M.C. Álvarez Villamarín²

¹CIMUS P0L5 Neoplasia y Diferenciación Endocrina. ²Neoplasia y Diferenciación Endocrina, Centro de Investigación en Medicina Molecular, Universidad de Santiago de Compostela. ³Departamento de Cirugía, Servicio de Cirugía General, Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela, Universidad de Santiago de Compostela. ⁴Department of Internal Medicine IV, University Hospital, LMU Munich, Munich, Alemania. ⁵Charité-Universitätsmedizin Berlin, Corporate Member of Freie Universität Berlin and Humboldt-Universität zu Berlin and Berlin Institute of Health, Institut für Experimentelle Endokrinologie, Berlin, Alemania. ⁶Department of Endocrine and Metabolic Diseases, Istituto Auxologico Italiano IRCCS, Milán, Italia. ⁷Departamento de Patología, Servicio Gallego de Salud-SERGAS, Hospital Clínico Universitario, Universidad de Santiago de Compostela.

Resumen

Introducción: El epitelio folicular de tiroides concentra el yoduro de la sangre gracias a dos transportadores: uno de polo basal NIS (SLC5A5) y otro de polo apical Pendrin (PDS, SLC26A4). Hasta ahora, los estudios funcionales de variantes genéticas de NIS y PDS se hacían mediante transporte celular de yoduro radioactivo I131, lo que genera dificultades técnicas y desechos.

Objetivos: Estandarizar un nuevo método no radiactivo basándonos en la reacción Sandell-Kolthoff (Waltz 2010). Utilizamos células no tiroideas HEK293 a las que transfectamos NIS, PDS o ambos; y células de tiroides humano de la colección TIROCHUS, T-NT2, y las mismas células con la expresión de PDS eliminada mediante Crispr-Cas9, clon 10 y clon 17.

Métodos: El protocolo de captación de yoduro no radioactivo fue cuidadosamente estandarizado en tiempo, concentraciones de iones, tiempo y los dos tipos de ensayo: Contenido (Uptake) y Salida (Efflux). Se han validado anticuerpos para NIS y PDS.

Resultados: Primero estandarizamos la expresión de NIS y PDS en HEK293 tras su transfección. Puntos clave fueron la extracción de membrana, condiciones del *western blot* y solo se pudo validar un anticuerpo por proteína. A continuación, estandarizamos la curva estándar de concentraciones de yoduro en el ensayo no radioactivo, y su ajuste lineal entre 5-60 pmol yoduro. Siguiendo paso fue el ajuste iónico en HEK293 para el ensayo Uptake para NIS y su inhibición con perclorato; y el Uptake para PDS y su inhibición con NFA. El Uptake en NIS+PDS fue significativamente menor que en NIS. El Efflux fue ajustado a la Vmax. Los ensayos se aplicaron entonces a células tiroideas. Los clones sin PDS Clon10, y Clon17 tuvieron un Uptake significativamente mayor, y menor Efflux. Variantes genéticas de PDS fueron comparadas en estos ensayos.

Conclusiones: Tenemos un ensayo robusto para estudiar la función, y las mutaciones de NIS y PDS encontradas en pacientes.

Financiación: Agencia Estatal de Investigación AEI-PID2022-140149OB-I00.