

L-tiroxina y triiodo-L-tironina en líquido cefalorraquídeo y eje hipotálamo hipofisario de ratas, hiper- e hipotiroideas

V. J. Fernández-Pastor, J. M. Fernández-Pastor y M. Morell*

Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina
Universidad de Málaga
29071 Málaga (España)

(Recibido el 7 de octubre de 1986)

V. J. FERNANDEZ-PASTOR, J. M. FERNANDEZ-PASTOR and M. MORELL. *L-Thyroxine and Triiodo-L-Thyronine in Cerebrospinal Fluid and Axis Hypothalamus-Adenohypophysis of Rat, in Hypo-hyperthyroidism*. Rev. esp. Fisiol., 43 (4), 521-528, 1987.

L-thyroxine and triiodo-L-thyronine concentrations in cerebrospinal fluid (CSF), hypothalamus and pituitary gland are measured in male albino-Wistar rats under several experimental thyroid disfunctions: including hyperthyroidism induced by L-T₃ and L-T₄ treatments and surgical hypothyroidism. Radioimmunoassay is carried out by Nejad's method modified in this work. The pattern of thyroid hormone concentrations in CSF is similar to that in serum, but the values obtained are lower. Thyroid hormone concentrations in adenohypophysis as opposed to hypothalamus or cerebral cortex, show an inverse change to functional thyroid status.

Key words: Thyroid, Hormones, Cerebrospinal fluid.

Existe una acción directa de las hormonas tiroideas en el Sistema Nervioso Central (11, 15) por lo que se han establecido diversas hipótesis sobre la ruta que siguen desde la sangre al tejido nervioso: atravesando la barrera hemoencefálica (10) y difundiendo desde las zonas periventriculares, incluyendo los plexos coroideos, a través del epéndimo, hacia el líquido cefalorraquídeo, (LCR) (15) distribuidor, a su vez, de sustancias con actividad biológica (10). Son escasos los estudios sobre

hormonas tiroideas en LCR y hay serias dudas acerca de los resultados existentes que, a veces, se aproximan a los límites de sensibilidad de los métodos empleados (22), por lo que se plantea la necesidad de revisar, tanto el método de medida como la posible función de estas hormonas en el LCR. La validez del radioinmunoanálisis depende en gran medida del grado de similitud en el comportamiento del patrón y del problema (4), siendo, además, conocidos los cambios que en los niveles proteicos produce la alteración de la función tiroidea (29), se hace necesario evitar la heterogeneidad de especies, mantener la concentración de proteínas (19) entre

Correspondencia a V. J. Fernández-Pastor.

* Dpto. de Bioquímica. Facultad de Medicina. Universidad de Málaga. 29071 Málaga (España).

muestras y estándares (12, 38), y tener en cuenta los niveles lipídicos que no son eliminados por algunos métodos de extracción (8, 25) que pueden ocasionar alteraciones en las medidas (25).

En este trabajo se han determinado, por radioinmunoanálisis, las concentraciones de hormonas tiroideas totales (L-T₃ y L-T₄) en suero y LCR de rata Wistar macho, sus variaciones con las alteraciones experimentales de la función tiroidea y las repercusiones en el eje hipotálamo adenohipofisario.

Material y Métodos

Diseño de los grupos experimentales. — Se han empleado ratas Wistar, machos, de 70 días de edad, bajo controles de temperatura, horas luz, dieta y crecimiento ponderal ya descritos (6), distribuidas en 4 grupos experimentales: a) controles (C); b) y c) hipertiroidismo experimental por tratamiento con L-tiroxina (40 µg/100 g/día) y triiodo-L-tironina (2,2 µg/100 g/día) respectivamente, durante una semana previa al sacrificio (TT4) y (TT3); y d) hipotiroidismo quirúrgico (Tx), también denominado por otros autores (30) «grupo de tiroprivación experimental», establecido siguiendo los criterios de EVANS (5) adaptados por FERNÁNDEZ-PASTOR (6) y modificados por dieta estándar de laboratorio con una concentración de yodo < 25 µg/kg, desde los 21 días de edad; tiroidectomía a los 28 días y administración i.p. de 100 µCi de I¹³¹ a los 30 días, realizándose quincenalmente, desde la cuarta semana, un control de la depleción hormonal (7).

Recogida de muestras. — La muestra de LCR se recoge por punción en cisterna magna y se adiciona a una alícuota, hasta conseguir un total de 10 conjuntos por grupo experimental de 1,5 ml de LCR cada uno. La extracción de sangre de aorta abdominal, se efectúa en los diver-

sos grupos experimentales, siempre a la misma hora (13), para evitar las oscilaciones del ritmo circadiano de las hormonas tiroideas. Las proteínas totales se determinan por el método de LOWRY (16). Los niveles lipídicos del método de extracción (9) y la comparación con otros métodos, han sido publicados (8). La disección de las regiones neuroendocrinas se realiza tras decapitación, procediendo, tras levantar la calota y desinsertar las cintillas ópticas, al desalojamiento craneal del cerebro que se conserva a 4° C. La adenohipófisis (AHPF) visualizada sobre la silla turca del esfenoides, se separa de la neurohipófisis (18) y la corteza anterior (CT) (corte a 4 mm del polo frontal perpendicular al eje anteroposterior) y el hipotálamo (HPT), son extraídos tras la resección de los bulbos olfatorios (1) y se realizan controles histológicos (fig. 1) (14, 17). Los tejidos se pesan y un conjunto de 4 muestras es homogeneizado de forma manual y por ultrasonido (6) en 1,5 ml de solución salina con tampón fosfato 0,01 M a pH 7,4. Cada 1,5 ml de LCR, suero u homogeneizado de tejido es tratado con el método de FLOCK y BOLLMAN (9), modificado por TAKAISHI (35) y NEJAD (21), con un cociente muestra/butanol de 1,5/4,5 realizando paralelamente un estudio de recuperación (21) del método empleado (9) y de cada muestra y controles lipoiproteicos (16, 32). Los extractos de LCR son reconstituidos con 150 µl de tampón fosfato 0,01 M, a pH 7,5 ajustado con NaOH 0,1 N; las muestras séricas con 1,5 ml y los tejidos con 200 µl.

Radioinmunoanálisis de L-tiroxina y triiodo-L-tironina. — La determinación por radioinmunoanálisis de las concentraciones hormonales se efectuó mediante un análisis por tipo de muestra y grupo experimental. La elaboración de los estándares se realizó en la misma matriz que las muestras a medir. Es decir, en un conjunto de la misma muestra, libre de

hormonas tiroideas siguiendo el método de STRINGER (33), con estudio paralelo de recuperación de la resina (Dow, 2 × 8) y siendo procesado de igual forma que los problemas mediante la aplicación del método de FLOCK (9) modificado (21, 35). La concentración de proteínas de los extractos finales se determinó por el método de LOWRY (16). Se reconstituyó cada punto de los patrones de LCR con 150 µl de solución de L-T₃ ó L-T₄, con 1,5 ml de solución los de suero y con 200 µl los homogeneizados. Las disoluciones empleadas de L-T₃ y de L-T₄ (L-T₃ y L-T₄ sódicas, Sigma) se establecieron en tampón fosfato 0,01 M, con control de termoagitación a 20° C, ajustándose el pH con NaOH 0,1 N a 7,5. Las disoluciones presentaron un rango que varió entre 0,02 y 6 ng de L-T₃/ml, y 0,1 y 12 µg/100 ml de L-T₄. Los análisis se realizaron con 25 µl de cada solución estándar o muestra, 500 µl de trazador (I-¹²⁵L-T₃ o I-¹²⁵L-T₄) y otros 500 µl de anticuerpo (Amersham). El tiempo de incubación fue de 60 min a 37° C para el ensayo de L-T₃ y de 45 min a 20° C para el L-T₄. Se centrifugó a 2.100 g a 4° C. Los resultados obtenidos se trataron esta-

dísticamente mediante el análisis de la varianza.

Resultados

Proteínas totales. — Las concentraciones proteicas en el LCR y en las regiones neuroendocrinas estudiadas, muestran un paralelismo a los valores séricos: un descenso significativo de los niveles proteicos en los grupos de hipertiroidismo (TT3) e hipotiroidismo quirúrgico (Tx) ($p < 0,001$), en relación al control (tabla I). Es de destacar el marcado descenso (0,3-0,5%) de las concentraciones proteicas en LCR, respecto de los niveles séricos y la existencia, aunque mínima, de niveles proteicos, tras aplicar el método de FLOCK (9), tanto en suero como en LCR y tejidos, que representan entre un 5 y 7% en relación a los datos iniciales.

Concentraciones de L-tiroxina y de triiodo-L-tironina (tabla II). — Los resultados obtenidos en LCR son paralelos a los séricos con concentraciones entre el 3 y 7% de éstos. En las regiones neuroendocrinas se observa un incremento signi-

Tabla I. *Proteínas totales (mg/ml) en suero (S), líquido cefalorraquídeo (LCR) y adenohipófisis (AHPF), hipotálamo (HPT) y corteza anterior (CT) (mg de proteína/mg de tejido), antes y después de la aplicación del método de Flock y BOLLMAN modificado (FB).*

Se representa la media $\pm$ el error estándar de la media de 10 determinaciones en suero y regiones neuroendocrinas, y 7 en LCR. S/L $\times 10^2$: Cociente suero/LCR; S (%) y LCR (%): Tanto por ciento de proteínas en (S) y en (LCR) tras aplicar el método de Flock; * $p < 0,01$; ** $p < 0,001$.

GRUPO	S	LCR	S/L $\times 10^2$	S(FB)	S (%)	LCR (FB)	LCR (%)
C	59,8 $\pm$ 3,2	0,22 $\pm$ 0,03	2,71	3,13 $\pm$ 0,3	5,2	0,015 $\pm$ 0,004	6,8
TT4	60,9 $\pm$ 2,9	0,24 $\pm$ 0,04	2,53	3,23 $\pm$ 0,3	5,3	0,016 $\pm$ 0,004	6,6
TT3	56,4 $\pm$ 4,6*	0,20 $\pm$ 0,03*	2,82	2,81 $\pm$ 0,2*	4,9	0,013 $\pm$ 0,004	6,5
Tx	48,2 $\pm$ 3,1**	0,16 $\pm$ 0,02**	3,01	2,66 $\pm$ 0,3*	5,5	0,011 $\pm$ 0,002	6,8
	AHPF	HPT	CT	AHPF(FB)	HPT(FB)	CT(FB)	
C	0,140 $\pm$ 0,024	0,075 $\pm$ 0,017	0,078 $\pm$ 0,016	0,012 $\pm$ 0,004	0,006 $\pm$ 0,002	0,006 $\pm$ 0,002	
TT4	0,170 $\pm$ 0,032*	0,079 $\pm$ 0,019	0,076 $\pm$ 0,014	0,013 $\pm$ 0,003	0,006 $\pm$ 0,002	0,006 $\pm$ 0,001	
TT3	0,103 $\pm$ 0,021*	0,062 $\pm$ 0,014*	0,068 $\pm$ 0,012*	0,007 $\pm$ 0,002*	0,005 $\pm$ 0,001	0,005 $\pm$ 0,002	
Tx	0,093 $\pm$ 0,018**	0,054 $\pm$ 0,012*	0,062 $\pm$ 0,013*	0,007 $\pm$ 0,002*	0,005 $\pm$ 0,002	0,005 $\pm$ 0,001	

Tabla II. Concentraciones de L-tiroxina y triiodo-L-tironina (ng/ml) en suero (S) y líquido cefalorraquídeo (LCR), y en (ng/g) para adenohipófisis (AHPF), hipotálamo (HPT) y corteza anterior (CT)

Se representa la media $\pm$ el error estándar de la media de 10 determinaciones. S/L $\times$ 10: Cociente suero/LCR; * $p < 0.001$.

GRUPO	S	LCR	S/L $\times$ 10	AHPF	HPT	CT
L-TIROXINA						
C	23,4 $\pm$ 0,42	1,20 $\pm$ 0,15	1,95	400,70 $\pm$ 4,4	61,81 $\pm$ 2,1	5,90 $\pm$ 0,2
TT4	82,6 $\pm$ 4,47*	5,60 $\pm$ 0,25*	1,47	75,18 $\pm$ 3,2*	101,18 $\pm$ 6,3*	43,82 $\pm$ 1,6*
TT3	74,8 $\pm$ 4,08*	4,82 $\pm$ 0,24*	1,55	73,41 $\pm$ 3,8*	92,40 $\pm$ 1,9*	42,73 $\pm$ 8,9*
Tx	0,9 $\pm$ 0,11*	0,21 $\pm$ 0,02*	0,42	35,10 $\pm$ 1,6*	11,87 $\pm$ 0,8*	1,80 $\pm$ 0,2*
TRIIODO-L-TIRONINA						
C	0,40 $\pm$ 0,03	0,013 $\pm$ 0,002	3,07	3,08 $\pm$ 0,6	0,28 $\pm$ 0,04	0,46 $\pm$ 0,03
TT4	1,07 $\pm$ 0,09*	0,050 $\pm$ 0,003*	2,14	0,52 $\pm$ 0,1*	0,94 $\pm$ 0,05*	4,20 $\pm$ 0,32*
TT3	1,21 $\pm$ 0,12*	0,060 $\pm$ 0,003*	2,01	0,56 $\pm$ 0,4*	1,24 $\pm$ 0,10*	4,41 $\pm$ 0,34*
Tx	0,03 $\pm$ 0,01*	0,002 $\pm$ 0,001*	1,50	0,32 $\pm$ 0,2*	0,06 $\pm$ 0,01*	0,03 $\pm$ 0,01*

ficativo en los tratamientos establecidos en relación al control y descensos significativos del grupo de tiroprivación experimental a excepción de la adenohipófisis, cuyos niveles hormonales descienden con el tratamiento.

La recuperación de la resina fue del 99,82 $\pm$ 0,32% en los ensayos de L-tiroxina y del 99,85 $\pm$ 0,24% para la triiodo-L-tironina, la del método de extracción (9) fue del 99,92% y del 99,70% y la sensibilidad obtenida, de 0,1 μ g/100 ml y de 0,02 ng/ml respectivamente.

Discusión

Proteínas. — Las concentraciones de proteínas en los LCR, muestran un paralelismo con las séricas y están entre los valores descritos (2). Tras la aplicación del método de FLOCK y BOLLMAN (9), los niveles de proteínas totales descienden, hasta valores del 4 al 5% de los iniciales, habiéndose encontrado valores proteicos y lipídicos también en otros métodos (35), por lo que su detección en el extracto final, no sólo puede inducir alteraciones en las medidas hormonales (25), sino que, además, al no ser tenidas en cuenta (37), y adicionar albúmina de

distinta especie animal (21), deja entrever que los patrones podrían no reproducir las características del muestreo (19, 33). Siendo, por esta razón, aplicado el mismo procesamiento de las muestras a los estándares y realizada la determinación hormonal de cada tipo de muestra y grupo experimental en un análisis diferente ante patrones elaborados en las mismas condiciones que los problemas a medir.

L-tiroxina y triiodo-L-tironina. — Los resultados obtenidos en LCR son semejantes a los séricos, en los diversos grupos experimentales. No se dispone de datos comparativos en rata, no obstante, es de señalar que los niveles en el grupo control son semejantes a los del LCR humano (22). La concentración obtenida en los sueros controles, son semejantes a las de otros autores (21, 23, 24), empleando métodos modificados para la valoración en este tipo de animal, y más bajos que las medidas ante estándares diluidos en suero humano (20), lo cual está de acuerdo con otros trabajos (19, 31). Las concentraciones de L-tiroxina en LCR y en suero de los grupos sometidos a hipertiroidismo experimental por tratamiento con L-T₄, han resultado elevadas significativamente en relación al control, posiblemente por

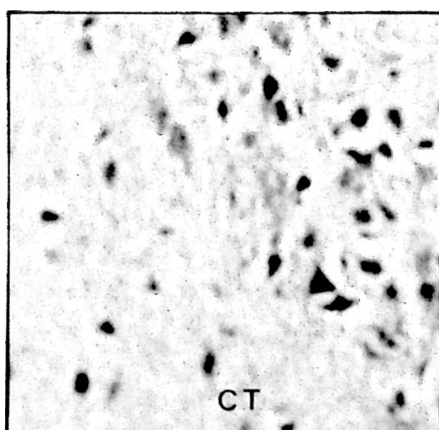
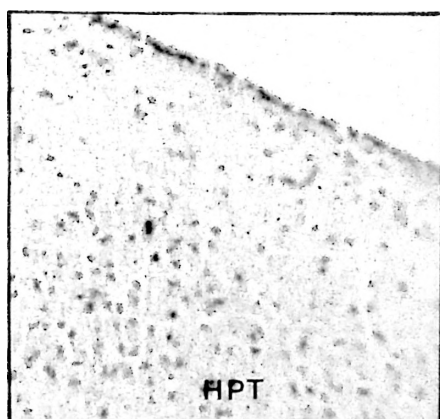
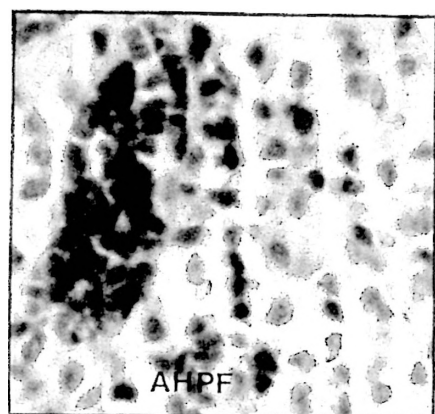


Fig. 1. *Controles histológicos de la adenohipófisis (AHPF), hipotálamo (HPT) y corteza anterior (CT).*

efecto acumulativo de la L-tiroxina, tanto a nivel sérico como en diversos tejidos. También la L-T₃ asciende de forma significativa, por posible incremento de la conversión periférica de la L-T₄ (26, 28). En los grupos experimentales de hipertiroidismo por tratamiento con L-T₃, tanto éste como la L-T₄, aumentan significativamente, quizá por inhibición de la conversión periférica de la L-T₄ y subsiguiente efecto acumulativo (27). Esta elevación respecto al control, de los niveles de hormonas con las que no se ha establecido el tratamiento, parece ser debido a la alta dosificación empleada que podría alterar el equilibrio de la conversión periférica de la L-tiroxina (7). Los niveles de L-T₄ y L-T₃ en suero y en LCR del grupo experimental Tx descienden significativamente respecto al control, siendo los valores séricos semejantes a los de otros autores (23). Esta presencia de hormonas tiroideas en animales tiroidectomizados ha sido encontrada en suero, incluso 4 meses después de la tiroidectomía, siendo atribuida, por algunos autores (36), a la formación extratiroidea de hormonas y derivados.

La existencia de hormonas tiroideas en las regiones neuroendocrinas estudiadas se encuentra de acuerdo con la distribución hormonal publicada por STUMPF (34). El descenso de concentraciones hormonales en la adenohipófisis, con ambos tratamientos, sucede con disminución de síntesis y liberación de la TSH y con descensos de actividades enzimáticas adenohipofisarias (6), por lo que la sugerencia de algunos autores (3) sobre la inducción de la L-T₃ en la síntesis intraadenohipofisaria, de una proteína con propiedades supresoras de TSH, se presenta insuficiente en la actualidad, y hace que, los mecanismos de regulación, aún se presenten inciertos y sujetos a futuras revisiones. La existencia de niveles hormonales en las regiones neuroendocrinas de los animales sometidos a tiroprivación experimental, está de acuerdo con otros auto-

res (24). Estos resultados apoyan la hipótesis de la ruta ventricular de KOZLOWSKI (15), en la que el LCR se encuentra netamente implicado.

Por tanto: a) se ha realizado un radioinmunoanálisis que presenta un alto grado de similitud en el comportamiento del patrón y del problema, con un método de extracción hormonal que permite alcanzar la sensibilidad necesaria para detectar las bajas concentraciones existentes en los LCR; b) se ha observado un comportamiento hormonal adenohipofisario, inverso al estado funcional de la glándula tiroidea; c) se ha elaborado un grupo de hipotiroidismo quirúrgico, con un evidente estado de tiroprivación, y d) existen niveles hormonales en el LCR inferiores a los séricos, que varían con la alteración de la función del tiroides.

Resumen

Se determinan las concentraciones de las hormonas tiroideas totales, L-tiroxina y triiodo-L-tiroxina, en el líquido cefalorraquídeo (LCR) y eje hipotálamo hipofisario de ratas Wistar de 70 días de edad, en condiciones normales y sometidas a hipertiroidismo experimental con tratamiento de L-T₃ o L-T₄, así como, a hipotiroidismo quirúrgico. El radioinmunoanálisis se realiza mediante una modificación del método de Nejad. Los resultados muestran niveles hormonales inferiores en LCR y un paralelismo a las concentraciones séricas ante las variaciones de la función tiroidea. La adenohipofisis, al contrario que el hipotálamo o la corteza cerebral, muestra niveles inversos al estado funcional de la glándula tiroidea.

Palabras clave: Tiroides, Hormonas, Líquido cefalorraquídeo.

Bibliografía

- Albe, D.: «Atlas stercotaxique du diencephale du rat blanche». CNRS, París, 1966.
- Bech, P., Kirkegaard, C., Johannesen, M. y Rafaelsen, O. J.: *Neuropsychobiology*, 4, 99-112, 1978.
- Berne, R. M. y Levy, M. N.: «Fisiología». Panamericana, Buenos Aires, 1986.
- Ekins, R. P.: «Hormone assays and their clinical application» (Loraine, J. A. y Bell, E. T., eds.). Application, Edimburgo, 1976, pp. 314-327.
- Evans, E. S., Schooley, R. A., Evans, B., Jenkins, S. A. y Taurog, A.: *Endocrinology*, 78, 983-989, 1966.
- Fernández-Pastor, J. M., Morell, M., Menéndez-Patterson, A. y Escobar-Bueno, M. C.: *Rev. esp. Fisiol.*, 39, 71-76, 1983.
- Fernández-Pastor, V. J. y Morell, M.: *Rev. esp. Fisiol.*, 43, 157-162, 1987.
- Fernández-Pastor, V. J., Fernández-Pastor, J. M., Fernández, F. J. y Morell, M.: *Laboratorio*, 82, 187-192, 1986.
- Flock, E. V. y Bollman, J. L.: *J. Biol. Chem.*, 214, 709-721, 1955.
- Gandarias, J. M.: «Fisiología Especial Aplicada». Científico-Médica, Madrid, 1975.
- Hagen, G. A. y Solberg, L. A.: *Endocrinology*, 95, 1398-1410, 1974.
- Hunter, W. M.: *Br. Med. Bull.*, 30, 18-24, 1974.
- Jordan, D., Rousset, B., Perrin, F., Fournier, M. y Orgiazzi, J.: *Endocrinology*, 107, 1245-1248, 1980.
- Kluver, H. y Barrera, E.: *J. Neuropath. and Exp. Neurol.*, 12, 400-403, 1953.
- Kozlowski, P. G. y Wright, E. M.: *Brain Res.*, 76, 354-358, 1974.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. y Randall, R.: *J. Biol. Chem.*, 193, 265-272, 1951.
- Martoja, R. y Martoja, M.: «Técnicas de histología animal». Toray-Masson, Barcelona, 1970.
- Moguilevsky, J. A.: *Neuroendocrinology*, 3, 193-199, 1968.
- Morell, M. y Fernández-Pastor, V. J.: *Rev. esp. Fisiol.*, 42, 383-386, 1986.
- Nataf, B. M., Fragu, P. y Othman, S. D.: *Acta Endocr. Copenh.*, 88, 499-505, 1978.
- Nejad, I., Bollinger, J., Mitnick, M. A., Sullivan, P. y Reichlin, S.: *Endocrinology*, 96, 773-780, 1975.
- Nishikawa, M., Inada, M., Naito, K., Ishii, H., Tanaka, K., Nashio, Y., Nakao, K., Nakai, Y., Uda, F. e Imura, H.: *J. Clin. Endocr. Met.*, 53, 1030-1035, 1981.
- Obregón, M. J., Pascual, A., Morreale de Escobar, G. y Escobar del Rey, F.: *Endocrinology*, 104, 1467-1473, 1979.

24. Obregón, M. J., Mallol, J., Escobar del Rey, F. y Morreale de Escobar, G.: *Endocrinology*, 109, 908-913, 1981.
25. O'Connell, M., Robbins, D. C., Bogardus, C., Burger, A. G. y Danforth, E.: *J. Clin. Endocr. Met.*, 55, 577-581, 1982.
26. Ortiz-Caro, J., Obregón, M. J., Pascual, A. y Jolin, T.: *Acta Endocr.*, 106, 86-91, 1984.
27. Pangaro, L., Burman, K. D., Wartofsky, L., Cahanmann, H. J., Smallridge, R. C., O'Brian, J. T., Wright, F. D. y Lathman, K.: *J. Clin. Endocr. Metab.*, 50, 1075-1081, 1980.
28. Pascual, A., Obregón, M. J. y Morreale de Escobar, G.: *Endocrinology*, 104, 1574-1579, 1979.
29. Peavy, D. E., Taylor, J. M. y Jefferson, L. S.: *Biochem. J.*, 198, 289-299, 1981.
30. Rodríguez, E., Morell, M. y Osorio, C.: *Rev. esp. Fisiol.*, 27, 99-102, 1971.
31. Sabell, I., Morata, P., Fernández-Pastor, V. J. y Morell, M.: *Rev. esp. Fisiol.*, 41, 61-68, 1985.
32. Sperry, W. M.: «Methods of biochemical analysis». Interscience Publishers, Nueva York, 1955.
33. Stringer, B. M. J. y Wynford-Thomas, D.: *Hormon Res.*, 16, 392-397, 1982.
34. Stumpf, W. E. y Sar, M.: *Endocrinology*, 36, 136-156, 1975.
35. Takaishi, M., Miyashi, Y., Aoki, M. y Shishiba, Y.: *Acta Endocr.*, 87, 125-132, 1978.
36. Taurog, A. y Evans, E. S.: *Endocrinology*, 80, 915-925, 1967.
37. Van Der Heide, D. y Ende-Visser, M. P.: *Endocrinology*, 93, 448-454, 1980.
38. Yalow, R. S. y Berson, S. A.: «Problems of validation of radioimmunoassay» (Odell, W. D. y Daughaday, W. H., eds.). J. P. Lippincott Company, Filadelfia, 1971, pp. 542-545.