REVISTA ESPAÑOLA DE FISIOLOGIA, 43, (2), 157-162, 1987

Radioinmunoanálisis homólogo de L-tiroxina y triiodo-L-tironina séricas de rata en estados de hipo e hipertiroidismo

V. J. Fernández-Pastor* y M. Morell**

Departamento de Fisiología
Facultad de Medicina
29071 Málaga (España)

(Recibido el 5 de mayo de 1986)

V. J. FERNANDEZ-PASTOR and M. MORELL. *Total L-Thyroxine and Triiodo-L-Thyronine Concentrations in Rat Sera with Altered Thyroid Function Experimental.* Rev. esp. Fisiol., 43 (2), 157-162, 1987.

Total L-thyroxine and triiodo-L-thyronine serum concentrations have been measured in 70-day-old male rats under normal conditions (controls) and in rats subjected to several experimental alterations of the thyroid function: hyperthyroidism, hypothyroidism and substitutive treatments. Since some problems appear when standard curves are performed with hormone serum, as consequence of differences in the affinity and inhibitory effects between heterologous proteins at the antigen-antibody reaction, RIA in this work has been carried out with standard curves performed with rat serum maintaining similar protein concentrations in standard and problems. This modification avoids errors by the use of extraction methods and shows a high degree of similarity between standard and problems.

Key words: L-thyroxine, Triiodo-L-thyronine, Serum, Rat.

Existe gran discordancia entre los datos de concentraciones de hormonas tiroideas en suero de rata (10, 13, 15), que puede deberse tanto a los procedimientos realizados en las técnicas experimentales que alteran la función tiroidea, como a los métodos analíticos empleados (24, 25). Aunque algunos investigadores han ido desarrollando sus propios métodos específicos para la valoración de hormonas tiroideas (14, 15), existe aún la tendencia, impuesta por la economía y la simplicidad, a emplear procedimientos comercializados para estudios en humanos, en la determinación de hormonas tiroideas de animales de experimentación (10, 13), sin tener en cuenta el error incurrido (12, 27), posiblemente debido a la diferente afinidad de las proteínas de distinta especie y a su desigual poder inhibidor de la reacción antígeno-anticuerpo (8, 27, 31).

La validez del radioinmunoanálisis depende en gran medida del grado de similitud en el comportamiento del patrón y

* A quien debe dirigirse la correspondencia.
** Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Málaga (España).

del problema (1). Siendo además conocidos los cambios de los niveles proteicos que produce la alteración de la función tiroidea (20), se insiste en la necesidad de evitar la hetereogeneidad de especies y de mantener la concentración de proteínas entre muestras y patrones (7, 12, 30).

Por tanto, la valoración de hormonas tiroideas ha sido efectuada mediante medidas directas por radioinmunoanálisis homólogo (12, 27). Además, habiendo efectuado un estudio comparativo (12) entre sueros patrones heterólogos (humano y de rata), y entre homólogos de rata con diferentes concentraciones de proteínas, se ha tenido en cuenta la realización de un análisis por cada grupo experimental manteniendo igualadas las concentraciones proteicas entre el patrón y el problema.

Por otra parte, y con objeto de esclarecer las repercusiones hormonales séricas ante dosificaciones altas y medias de L-tiroxina y triiodo-L-tironina, se han establecido dos pautas de tratamiento para la obtención de grupos experimentales de hipertiroidismo, por la diversidad de criterios acerca de las dosis empleadas (3, 5, 25) y subsiguientes hipótesis existentes (17, 18). Asimismo, se han realizado dos grupos experimentales de controles de hipotiroidismo: uno quirúrgico, donde se ha buscado un alto estado de tiroprivación, y otro farmacológico, junto a dos grupos hipotiroideos con tratamiento sustitutivo (IK y L-T3), con objeto de contrastar en qué caso el hipotiroidismo es más intenso, y establecer la posibilidad de recuperación.

Material y Métodos

Diseño de los grupos experimentales. — Se han empleado ratas Wistar macho, bajo controles de temperatura a 20°C, horas luz/oscuridad (14/10), dieta estándar de laboratorio y peso semanal hasta el sacrificio (70 días de edad). Se destetan a los 21 días (4) y se distribuyen en 9 grupos experimentales: grupo control (C) y grupos de hipertiroidismo con tratamiento s.c. de L-tiroxina a dosis baja (10 μg/100 g/día) durante 15 días (TT4) y dosis alta (40 μg/100 g/día) durante una semana (T'T4); triiodo-L-tironina a dosis baja (0,5 μg/100 g/día) durante 15 días (TT3) y dosis alta (2,2 μg/100 g/día) durante una semana (T'T3) antes del sacrificio; grupos controles de hipotiroidismo: quirúrgico (Tx), también denominado «grupo de tiroprivación experimental» (21), establecido siguiendo los criterios de EVANS (2) adaptados por FERNÁNDEZ-PASTOR (4), y modificados en el sentido de dieta estándar de laboratorio con una concentración de yodo $\leq$ 25 μg/kg desde los 21 días; tiroidectomía a los 28 días; y, administración i.p. de 100 μCi de I^{131} a los 30 días de edad, realizándose quincenalmente, desde la cuarta semana de vida, un control de depleción sérica hormonal ($L\text{-}T_3$ y $L\text{-}T_4$); y farmacológico por administración s.c. de propiltiouracilo (PTU), de 0,3 ml/día durante 10 días de una solución de PTU en suero fisiológico (10/3, mg/ml); grupos de hipotiroidismo quirúrgico y tratamiento sustitutivo previo al sacrificio de: ioduro potásico (TxIK), en dosis i.p. de 3 mg/día en 0,3 ml de solución salina durante 7 días; y triiodo-L-tironina (TxT3) en dosis s.c. de 5 μg/0,3 ml/día, durante 7 días.

La extracción de sangre se efectuó de aorta abdominal, realizándola a la misma hora (10), para evitar las oscilaciones por el ritmo circardiano de las hormonas tiroideas (6). Las concentraciones de proteínas totales del muestreo se determinaron por el método de LOWRY (11).

Radioinmunoanálisis de L-tiroxina y triiodo-L-tironina. — La determinación por radioinmunoanálisis de las concentraciones hormonales se efectuó siguiendo el método de STRINGER (27), específico para este tipo de animal. Y modificado por MORELL (12), en el sentido de igualar

las concentraciones proteicas totales entre el problema y el patrón, realizando un análisis por cada grupo experimental en suero del animal de experimentación.

Resultados y Discusión

Pesos y proteínas totales — (Figs. 1 y 2). No han sido encontradas diferencias estadísticamente significativas, tanto del crecimiento ponderal, entre los grupos de hipertiroidismo en relación al control, al igual que en otros trabajos (4, 22), como de la concentración proteica, a excepción del grupo experimental (T'T3) (26). Y es de destacar, el marcado descenso de la concentración de proteínas ($p \leq 0{,}001$), y del crecimiento ponderal desde la cuarta semana de vida, de los grupos sometidos a hipotiroidismo quirúrgico (Tx, TxIk, TxT3) en relación al control (C) (20).

Concentraciones de L-tiroxina y de triiodo-L-tironina — (tabla I). El radioinmunoanálisis se ha realizado en cada grupo experimental ante curvas patrones elaboradas en el suero del mismo animal de experimentación, para conservar el mayor grado de similitud en el comportamiento del patrón y del problema (1), y evitar así las medidas de muestras con distintos niveles proteicos producidos por la alteración de la función tiroidea (20), al existir un efecto inhibidor proteico sobre la reacción antígeno-anticuerpo (12, 27, 30), de tal forma que el patrón elaborado con menor concentración proteica posee un efecto inhibidor proteico de la reacción y una mayor cantidad de complejo antígeno marcado unido a anticuerpo (12).

Las concentraciones de L-tiroxina total en suero de rata control de 23,4 ± 0,4 ng/mlñ y triiodo-L-tironina de 0,40 ng/ml, han sido semejantes a las obtenidas por otros autores (14, 15) que emplearon métodos modificados para la valoración de este tipo de animal, y más bajas que los sueros de rata medidos ante patrones humanos (13). Lo cual está de acuerdo con otros trabajos publicados

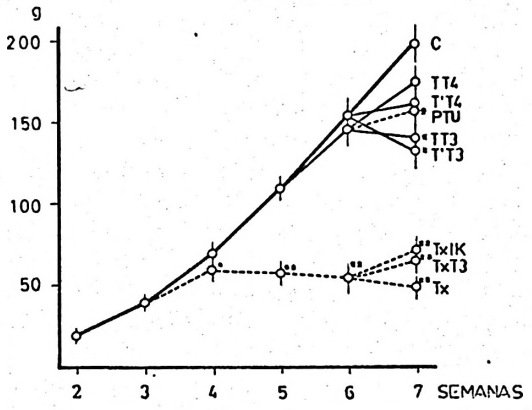

Fig. 1. *Pesos semanales de los grupos experimentales.*
——— : control (C). ——— : hipertiroideos (T'T4: 40 μg/100 g; TT4: 10 μg/100 g; T'T3: 2,2 μg/100 g; TT3: 0,5 μg/100 g). — — — : hipotiroideos (PTU: Propiltiouracilo; Tx: quirúrgico; TxIK: quirúrgico + ioduro potásico; TxT3: quirúrgico + triiodo-L-tironina). Cada punto corresponde a la media de 10 animales con el error estándar de la media. *: $p \leq 0{,}01$. **: $p \leq 0{,}001$.

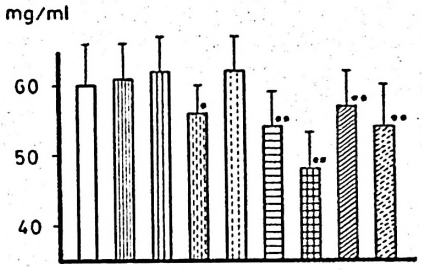

Fig. 2. *Proteínas séricas totales de los grupos experimentales.*
□: control. ▥ ▥ ▥ ▥: hipertiroideos (T'T4: 40 μg/100 g; TT4: 10 μg/100 g; T'T3: 2,2 μg/100 g; TT3: 0,5 μg/100 g). ▤ ▦ ▨ ▩ : hipotiroideos (PTU: propiltioutacilo; Tx : quirúrgico; TxIK: quirúrgico + ioduro potásico; TxT3: quirúrgico + triiodo-L-tironina). Cada punto corresponde a la media de 10 determinaciones con el error estándar de la media.
*: $p \leq 0{,}01$. **: $p \leq 0{,}001$.

Tabla I. *Concentraciones de L-tiroxina y triiodo-L-tironina totales (ng/ml) en suero de los grupos experimentales.*

Se representa la media de 10 animales con el error estándar de la media. *p ≤ 0,01. **p ≤ 0,001. Se determinan las diferencias estadísticamente significativas de los grupos hipertiroideos (T'T4, TT4, T'T3 y TT3) e hipotiroideos (PTU y Tx) en relación al control (C), así como de los hipotiroideos con tratamientos sustitutivo (TxIK y TxT3) respecto de su control (Tx).

Grupo	L-tiroxina	Triiodo-L-tironina
C	23,45 ± 0,40	0,40 ± 0,04
TT4	38, 26 ± 0,36**	0,39 ± 0,02
T'T4	82,62 ± 4,47**	1,07 ± 0,09**
TT3	20,18 ± 0,87*	0,94 ± 0,05**
T'T3	74,80 ± 4,08**	1,21 ± 0,12**
Tx	0,90 ± 0,24**	0,03 ± 0,01**
PTU	2,84 ± 0,62**	0,14 ± 0,04**
TxIK	2,06 ± 0,20*	0,09 ± 0,02*
TxT3	1,04 ± 0,26*	1,15 ± 0,05*

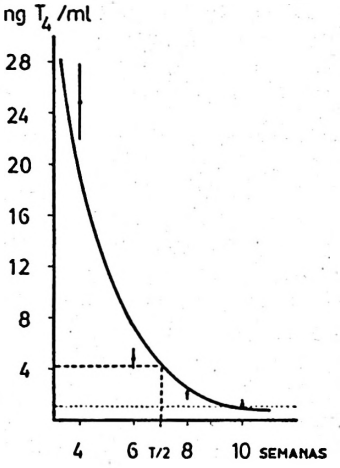

Fig. 3. *Curva de depleción sérica de L-tiroxina del grupo de hipotiroidismo quirúrgico (Tx) desde la 4ª hasta la 10ª semana de edad.*

Se representa como función exponencial: $Y = 137{,}53\ e^{-0{,}49x}$, con $r = -0{,}9734$. Cada punto corresponde a la media de 6 animales con el error estándar de la media. T/2: tiempo medio. — — — : límite de sensibilidad.

(12, 27), en los que se muestra la existencia de una mayor cantidad de antígeno marcado unido a anticuerpo en el patrón humano en relación al de rata.

Tanto la L-tiroxina como la triiodo-L-tironina se han encontrado aumentadas, en relación al control (C), en los grupos hipertiroideos, proporcionalmente a las dosis de la hormona administrada en cada caso, mientras que la hormona no administrada se ha observado con una concentración diferente según se haya establecido la dosis. A dosis bajas, la concentración ha permanecido semejante al control (C) (9), y a dosis altas se ha producido una elevación estadísticamente significativa. Estos resultados inducen a establecer que las dosis altas administradas alteran el equilibrio y la regulación de la conversión periférica de la L-tiroxina, de tal forma que la administración de L-tiroxina aumentaría la conversión y, por tanto, elevaría los niveles de triiodo-L-tironina (17, 19, 28), mientras que el tratamiento con triiodo-L-tironina, actuaría inhibiendo la conversión periférica de L-tiroxina y elevando por consiguiente su concentración sérica (18).

A las diez semanas de edad, edad a la que se realizó el sacrificio, las concentraciones de L-tiroxina y triiodo-L-tironina del grupo hipotiroideo por tratamiento quirúrgico (Tx) se estabiliza el descenso de ($p \leq 0{,}001$) respecto al control (C), con resultados semejantes a los otros autores (16), e inferiores a los obtenidos en el hipotiroidismo farmacológico (PTU) (figuras 3 y 4). Esta presencia de hormonas tiroideas en animales tiroidectomizados, ha sido encontrada incluso 4 meses después de la tiroidectomía (16), siendo atribuida por algunos autores (30), a la formación extratiroidea de hormonas y derivados, por lo que este grupo (Tx) presenta una mayor relevancia no sólo en cuanto a descenso ponderal, sino a concentraciones proteica y hormonal en suero, que el hipotiroidismo farmacológico (PTU), posibilitando que sea pro-

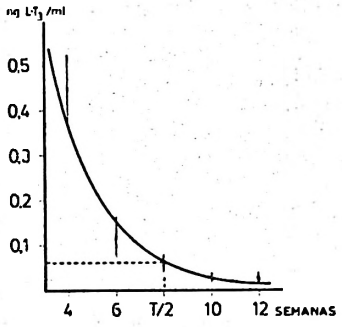

Fig. 4. *Curva de depleción sérica de triiodo-L-tironina del grupo de hipotiroidismo quirúrgico (Tx) desde la 4.ª hasta la 12.ª semana de edad.*
Se representa como función exponencial: $Y = 2{,}17e^{-0{,}44X}$, con $r = -0{,}9850$. Cada punto corresponde a la media de 6 animales con el error estándar de la media. T/2: tiempo medio. — — — — : límite de sensibilidad.

puesto como «grupo de tiroprivación experimental», como ya han sugerido otros autores (4, 21).

Asimismo, los grupos experimentales hipotiroideos tratados (TxIK, TxT3) han presentado concentraciones de L-T_4 y L-T_3 superiores al grupo control de hipotiroidismo quirúrgico (Tx) ($p \leq 0{,}01$), repercutiendo tanto en aumento del peso como de los niveles proteicos y hormonales, pero con valores inferiores al grupo control (C), existiendo por tanto una recuperación sólo relativa en estos casos.

Por tanto, para que en este tipo de radioinmunoanálisis homólogo de medida directa de las muestras, se conserve un alto grado de similitud en el comportamiento entre el patrón y el problema, se aconseja mantener igualadas las concentraciones proteicas entre ambos. En los grupos hipertiroideos, la hormona tiroidea (L-tiroxina o triiodo-L-tironina) con la que se ha establecido el tratamiento, aumenta en suero proporcionalmente a la dosis empleada, mientras que la hormona no administrada se ha comportado de forma diferente según el tipo de dosificación; y en el grupo sometido a hipotiroidismo quirúrgico con las pautas que han sido señaladas, ha presentado un alto estado de tiroprivación.

Resumen

Se determinan mediante una técnica de radioinmunoensayo homólogo las concentraciones totales de L-tiroxina y triiodo-L-tironina en suero de ratas Wistar de 70 días de edad, en condiciones normales y sometidas a diferentes estados de hipertiroidismo experimental con dos tipos de tratamiento, así como en distintos estados experimentales de hipofunción tiroidea. El radioinmunoanálisis se realiza ante curva patrón diluida en suero del animal, manteniendo igualadas las concentraciones de proteínas totales entre muestras y patrones. Con este procedimiento, se conserva la medida directa de los problemas, evitando los errores del tratamiento del muestreo con métodos de extracción hormonal.

Palabras clave: L-tiroxina, Triiodo-L-tironina, Suero, Rata.

Bibliografía

1. Ekins, R. P.: *Br. Med. Bull.*, 30, 3-9, 1974.
2. Evans, E. S., Schooley, R. A., Evans, B., Jenkins, S. A., y Taurog, A.: *Endocrinology*, 78, 983-989, 1966.
3. Feely, J., Forrest, A., Gunn, A., Hamilton, W., Stevenson, I. y Crooks, J.: *Endocrinol. Metab.*, 51, 658-661, 1980.
4. Fernández-Pastor, J. M., Morell, M., Menéndez-Patterson, A. y Escobar-Bueno, M. C.: *Rev. esp. Fisiol.*, 39, 311-316, 1983.
5. García, M. D., Escobar del Rey, F. y Morreale de Escobar, G.: *Endocrinology*, 98, 203-213, 1976.
6. Hugues, J. N., Reimberg, A., Jordan, D., Sebaoun, J., Modigliani, F., y Burger, A. G.: *Acta Endocrinol.*, 101, 403-407, 1982.
7. Hunter, W. M.: *Br. Med. Bull.*, 30, 18-24, 1974.
8. Hurn, B. A. L. y Landon, J.: En «Antisera for radioimmunoassay» (Kirkham, K. A. y Hunter, W. M., eds.), European work-shop, Londres, 1970, pp. 63-84.
9. Jiménez, E., Montiel, M., Narvaez, J. A., Miranda, M. T., Parras, L. y Morell, M.: *Horm. Metabol. Res.*, 16, 315-318, 1984.

10. Jordan, D., Rousset, B., Perrin, F., Fournier, M. y Orgiazzi, J.: *Endocrinology*, 107, 1245-1248, 1980.
11. Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farren, A. L. y Randall, R.: *J. Biol. Chem.*, 193, 265-272, 1951.
12. Morell, M. y Fernández-Pastor, V. J.: *Rev. esp. Fisiol.*, 42, 383-386, 1986.
13. Nataf, B. M., Fragu, P. y Othman, S. D.: *Acta Endocrinol.*, 88, 499-505, 1978.
14. Nejad, I., Bollinger, J., Mitnick, M. A., Sullivan, P. y Reichlin, S.: *Endocrinology*, 96, 773-780, 1975.
15. Obregón, M. J., Morreale de Escobar, G. y Escobar del Rey, F.: *Endocrinology*, 103, 2145-2153, 1978.
16. Obregón, M. J., Mallol, J., Escobar del Rey, F., Morreale de Escobar, G.: *Endocrinology*, 109, 908-913, 1981.
17. Ortiz-Caro, J., Obregón, M. J., Pascual, A. y Jolin, T.: *Acta Endocrinol.*, 106, 86-91, 1984.
18. Pangaro, L., Burman, K. D., Wartofsky, L., Cahnmann, H. J., Smallridge, R. C., O'Brian, J. T., Wright, F. D. y Lathman, K.: *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 50, 1075-1081, 1980.
19. Pascual, A., Obregón, M. J., Morreale de Escobar, G.: *Endocrinology*, 104, 1574-1579, 1979.
20. Peavy, D. E., Taylor, J. M. y Jefferson, L. S.: *Biochem. J.*, 198, 289-299, 1981.
21. Rodríguez, E., Morell, M. y Osorio, C.: *Rev. esp. Fisiol.*, 27, 99-102, 1971.
22. Rookh, V. H., Azukinawa, M., Distefano, J. J., Ogihara, Y. T. y Hershman, J. M.: *Endocrinology*, 104, 852-856, 1979.
23. Sabell, I., Morata, P., Fernández-Pastor, V. J. y Morell, M.: *Rev. esp. Fisiol.*, 41, 61-68, 1985.
24. Sabell, I., Morata, P., Quesada, J. y Morell, M.: *Enzyme*, 34, 27-32, 1985.
25. Salmon, A., Marc Rendell, M. D., Williams, J., Ross, D. A., Waud, J. M. y Eager, P. J.: *Arch. Intern. Med.*, 142, 571-573, 1982.
26. Sokoloff, L. y Kennedy, C.: *An. Rev. Med.*, 24, 271-279, 1973.
27. Stringer, B. M. J. y Wynford-Thomas, D.: *Hormon Res.*, 16, 392-397, 1982.
28. Suzuki, Y., Kita, K., Uchigata, Y., Yakata, I. y Sato, T.: *Acta. Endocrinol.*, 99, 540-545, 1982.
29. Taurog, A. y Evans, E. S.: *Endocrinology*, 80, 915-925, 1967.
30. Tede, J. D.: En «Scientific foundations of clinical biochemistry», (Nunn. W., ed.). Heinemann. Londres, 1978. Vol. 1, pp. 299-322.
31. Yalow, R. S. y Berson, S. A.: En «Problems of validation of radioimmunoassay» (Odell, W. D. y Daughaday, W. H., eds.), J. P. Lippincott Company. Filadelfia, 1971, pp. 542-549.