

Laboratorio de Biología  
Facultad de Ciencias  
Universidad de Valladolid  
(Prof. J. Planas)

## Influencia de las hormonas sexuales sobre la capacidad de transporte de la tiroxina- $I^{131}$ por el suero en conejos \*

por

José M.<sup>a</sup> Ruiz-Arbulo, Sisinio de Castro y José Planas

(Recibido para publicar el 8 de julio de 1966)

Efectuando electroforesis con sueros humanos, a los que se había añadido *in vitro* tiroxina- $I^{131}$ , GORDON y col. (10) observaron en 1952 que la hormona se desplaza con dos fracciones proteicas: una situada entre las globulinas  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$  (TBP = thyroxin-binding protein o fracción interalfaglobulina) y la albúmina. Más tarde, en 1958, INGBAR (11), cambiando el tampón corriente de veronal por otro de tris-maleato, identificó una tercera fracción proteica, capaz también de fijar y transportar tiroxina, que por su movilidad electroforética fue designada prealbúmina. La prealbúmina no aparece cuando la electroforesis se lleva a cabo con veronal porque este compuesto inhibe la reacción entre la misma y la tiroxina (14). Parece ser que de estas tres fracciones la interalfaglobulina es la principal.

Pronto se multiplicaron los trabajos sobre problemas relacionados con este mecanismo de transporte. Algunos de estos trabajos se ocupan del estudio cuan-

titativo de la capacidad del suero para transportar la tiroxina en circunstancias diversas. Entre ellos figuran los de DOWLING, FREINKEL e INGBAR (5), FEDERMAN, ROBBINS y RALL (8) y ENGBRING y ENGERSTON (7) que han demostrado que en la especie humana la administración de estrógenos eleva considerablemente la capacidad de la interalfaglobulina para fijar tiroxina; aunque su efecto es menos evidente, los andrógenos, según las observaciones de los mismos autores, deprimen esta capacidad. Precisamente la elevación de la fracción interalfaglobulina durante el embarazo, comprobada por diversos autores (4, 12, 13) es atribuida al hiperestrogenismo propio de este estado.

Que sepamos estos estudios no han sido comprobados en experimentación con animales. Sólo ANNISON y LEWIS (2), que han estudiado el comportamiento

\* Trabajo realizado con ayuda al «Fomento de la Investigación en la Universidad».

del transporte sérico de la tiroxina en ovejas, no han observado diferencias del mismo en condiciones normales y durante la gestación.

En el presente trabajo se estudia la influencia de la administración de hormonas sexuales (estrógenos y andrógenos) sobre la capacidad para transportar tiroxina del suero de conejos.

### Material y métodos

Para este estudio se han utilizado cuatro conejos, tres machos y una hembra de 2,5 kg de peso, aproximadamente. En ellos hemos estudiado la capacidad del suero para fijar tiroxina en cuatro momentos: antes de comenzar el tratamiento hormonal y después de la primera, segunda y tercera semana del mismo.

El tratamiento con hormonas sexuales ha sido el siguiente: a dos conejos se les ha administrado por vía intramuscular 25 mg de testosterona (Testovirón «Scherring»)\* a días alternos, durante los veintiún días que duró la experiencia; los otros dos conejos recibieron, por la misma vía y con la misma pauta, 1 mg de benzoato de estradiol (Progynon «Scherring»). El estudio de la capacidad de las proteínas plasmáticas para fijar tiroxina se ha llevado a cabo con una técnica inspirada en las de ALBRIGHT y colaboradores (1), BERGER (3), VANNOTTI (12) y otros autores, cuyos detalles especificamos a continuación:

1. *Adición de radiotiroxina:* Mezcla de 0,45 cc de suero con 0,05 cc de una solución de tiroxina- $I^{131}$  conteniendo 3,3 microgramos de tiroxina por cc y con una actividad de 200 microcuries por cc. La radiotiroxina procede del «The Radiochemical Center» de Amers-

han, Inglaterra, y nos ha sido proporcionada por la Junta de Energía Nuclear. La mezcla se agita y se mantiene doce horas en la nevera a cuatro grados, a fin de asegurar la fijación de la tiroxina sobre las proteínas.

2. *Electroforesis del suero enriquecido con radiotiroxina:* La electroforesis se ha llevado a cabo con una muestra de 0,02 cc de suero en papel de Whatman número 1 (tamaño 3 × 28 cm). El tampón empleado ha sido el de trismaleato pH 8,6. El voltaje de 110 V y una duración de doce horas permiten obtener un desplazamiento de la fracción albúmina de 12 cm.

3. *Medida de la radiactividad:* Después del secado de las tiras de papel en esufa a 90° se controla la radiactividad presente en las mismas con equipo Philips (contador PW-4.038, sonda GM-13536 y dispositivo para lectura de cromatogramas PW-4129). La medida se hace de medio en medio centímetro, registrando las partículas emitidas durante un minuto. Con los datos obtenidos se construyen gráficas trasladando a un sistema de coordenadas los valores de radiactividad, cuentas por minuto) en las abscisas y los desplazamientos desde la zona en que se colocó la muestra de suero (en centímetros) en las ordenadas. La media planimétrica de la superficie limitada por esta gráfica permite una valoración cuantitativa de la capacidad de las correspondientes fracciones proteicas para fijar la hormona.

4. *Autorradiografía:* Posteriormente la tira de papel es puesta en contacto con otra de película «Ilfo» y mantenida de esta forma en la oscuridad durante unos veinte días, al cabo de los cuales es revelada la película. Esta aparecerá impresionada en las zonas que estuvieron en contacto con las proteínas cargadas de radiotiroxina y confrontando el autorradiograma con la tira de papel, ya teñida con «negro amido» podrán ser identificadas estas proteínas.

\* Los preparados hormonales nos han sido suministrados, amablemente, por la firma «Scherring».

### Resultados

En los cuatro ejemplares estudiados la tiroxina se fijó a una sola fracción proteica que electroforéticamente se corresponde con la albúmina y en parte también con las alfa globulinas.

Para que sean comparables los resultados obtenidos midiendo planimétricamente la superficie limitada por la curva correspondiente a esta única fracción portadora de radiotiroxina (cuentas/cm/minuto) hemos de tener en cuenta la pérdida de radiactividad con el tiempo. Puesto que la vida media del  $I^{131}$  es de 8,1 días, haciendo la corrección correspondiente los resultados serán comparables. En la tabla I exponemos los cálculos para hacer esta corrección y en la tabla II pueden ser observados los resultados obtenidos, es decir, la radiactividad que es capaz de acoger el suero de los cuatro conejos estudiados en cada mo-

mento de la experiencia. Esta radiactividad es índice de la capacidad de las proteínas séricas para fijar y transportar tiroxina.

### Discusión

Como se desprende del examen de los datos consignados en la tabla II, tanto los estrógenos como los andrógenos elevan la capacidad del suero para fijar tiroxina en los conejos. Ello supone que elevan la única fracción proteica del suero de esta especie animal que es capaz de fijar tiroxina. El efecto es rápido, pues ya a la primera semana después de comenzado el tratamiento hormonal se observan valores muy altos; estos valores se incrementan ligeramente en el curso de las semanas próximas.

Estos resultados concuerdan con las observaciones hechas en hombres por DOWLING y col. (5), que han comprobado

TABLA I

*Datos numéricos correspondientes a la valoración cuantitativa de la radiotiroxina fijada por el suero, indicando la corrección realizada para el cálculo de la radiactividad de las diferentes muestras a un mismo tiempo de desintegración ( $N_0$ ), así como los valores absolutos, expresados en cuentas/minuto de la radiotiroxina fijada en la fracción proteica.*

| Tira n.º | Fecha del contaje | Días transcurridos de la fecha dosis inicial | Área de la fracción que capta Tiroxina- $I^{131}$<br>Cuentas $\times$ cm/<br>minuto | Radiactividad de la muestra:<br>valor de $N_0$ | Radiactividad total del área correspondiente a la fracción fijadora de tiroxina |
|----------|-------------------|--|---|--|---|
| 1        | 28-XI-65          | 6  | 58,30   | 0,6  | $36,10 \times 10^2$   |
| 2        | 29-XI-65          | 7  | 16,63   | 0,55   | $40,12 \times 10^2$   |
| 3        | 29-XI-65          | 7  | 30,84   | 0,55   | $40,26 \times 10^2$   |
| 4        | 3-XII-65          | 11   | 29,23   | 0,48   | $46,47 \times 10^2$   |
| 5        | 10-XII-65         | 18   | 18,70   | 0,22   | $69,03 \times 10^2$   |
| 6        | 11-XII-65         | 19   | 8,35  | 0,20   | $71,13 \times 10^2$   |
| 7        | 11-XII-65         | 19   | 13,61   | 0,20   | $71,10 \times 10^2$   |
| 8        | 12-XII-65         | 20   | 16,30   | 0,18   | $73,00 \times 10^2$   |
| 9        | 12-XII-65         | 20   | 19,28   | 0,18   | $74,80 \times 10^2$   |
| 10       | 13-XII-65         | 21   | 6,33  | 0,16   | $72,90 \times 10^2$   |
| 11       | 13-XII-65         | 21   | 27,25   | 0,16   | $74,97 \times 10^2$   |
| 12       | 13-XII-65         | 21   | 38,75   | 0,16   | $74,98 \times 10^2$   |
| 13       | 18-XII-65         | 26   | 20,68   | 0,01   | $88,11 \times 10^2$   |
| 14       | 18-XII-65         | 26   | 9,33  | 0,01   | $88,00 \times 10^2$   |
| 15       | 18-XII-65         | 26   | 9,85  | 0,01   | $88,00 \times 10^2$   |
| 16       | 18-XII-65         | 26   | 9,53  | 0,01   | $88,00 \times 10^2$   |

TABLA II

*Efecto de la administración de hormonas sexuales por vía intramuscular sobre la capacidad de fijación de la tiroxina-<sup>131</sup>I por el suero. Los valores vienen expresados en cuentas/minuto, y representan la radiactividad total en el área correspondiente a la fracción proteica fijadora de radiotiroxina.*

| Hormona      | Conejo n.º | Determinaciones de la radiotiroxina fijada |                         |                         |                         |
|--------------|------------|--|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
|              |            | Antes del tratamiento                      | A la 1.ª semana         | A la 2.ª semana         | A la 3.ª semana         |
| Testosterona | 1          | 36,10 × 10 <sup>2</sup>                    | 71,13 × 10 <sup>2</sup> | 74,80 × 10 <sup>2</sup> | 88,11 × 10 <sup>2</sup> |
|              | 2          | 40,12 × 10 <sup>2</sup>                    | 71,10 × 10 <sup>2</sup> | 72,90 × 10 <sup>2</sup> | 88,88 × 10 <sup>2</sup> |
| Estradiol    | 3          | 40,26 × 10 <sup>2</sup>                    | 69,30 × 10 <sup>2</sup> | 74,87 × 10 <sup>2</sup> | 88,10 × 10 <sup>2</sup> |
|              | 4          | 46,47 × 10 <sup>2</sup>                    | 73,00 × 10 <sup>2</sup> | 74,98 × 10 <sup>2</sup> | 88,88 × 10 <sup>2</sup> |

que los estrógenos elevan la tasa de interalfaglobulina. No concuerdan, por el contrario, con las observaciones de FEDERMAN y col. (8) y de ENGBRING y ENGSTRON (7), según los cuales la testosterona disminuye la tasa de interalfaglobulina.

Aunque los estrógenos disminuyen el consumo de tiroxina por los tejidos parece ser (5, 6) que el aumento de la fracción interalfaglobulina no deriva de este hecho. Más bien el incremento de esta fracción es el efecto primario de los estrógenos y la depresión del ritmo de utilización de hormona es un fenómeno temporal y secundario a la elevación de la interalfaglobulina. En efecto, es sabido que sólo es capaz de llegar a los tejidos la tiroxina circulante en estado libre y que ésta, en el supuesto de que el funcionamiento tiroideo se mantenga a un ritmo constante, es inversamente proporcional a la tasa de interalfaglobulina. Pues bien, en el caso que estamos comentando el aumento de la fracción interalfaglobulina disminuye temporalmente, hasta tanto que el tiroides reaccione, la cantidad de tiroxina libre accesible a los tejidos. Posteriormente reac-

ciona el tiroides aumentando su secreción hormonal y restaurando el equilibrio, momentáneamente perturbado. La secuencia de fenómenos consecutivos a la administración de estrógenos es, según ENGBRING y ENGSTRON (7), la siguiente: 1.º aumento de la interalfaglobulina y, con ella, de la tiroxina combinada; 2.º disminución de la tiroxina libre; 3.º aumento de la secreción de hormona tirotrópica; 4.º aumento de la actividad tiroidea, por lo que se restablece la concentración habitual de tiroxina libre. La intervención de la hipófisis es cuestionable, pues las observaciones en ratas de FELDMAN (9) parecen indicar que los estrógenos estimulan directamente al tiroides, por lo que también es posible que la hiperactividad tiroidea reactiva dependa, lo mismo que la elevación de la interalfaglobulina, directamente de los estrógenos mismos.

Respecto a la diferencia observada entre el efecto de la testosterona en la especie humana y en los conejos, no podemos afirmar nada definitivo. En todo caso hemos de advertir que, si bien la dosis de hormona administrada por los citados investigadores (5, 7, 8) y por

nosotros es semejante en el caso de los estrógenos (0,4 mg de diestilbestrol/día/kg y 0,5 mg de estradiol/kg a días alternos, respectivamente), no ocurre lo mismo con la testosterona, pues mientras ellos han administrado 0,7 mg/kg diariamente, nosotros hemos dado 12 mg por kg a días alternos.

### Resumen

Se ha estudiado con una técnica de electroforesis en papel y tiroxina marcada con I<sup>131</sup> la capacidad del suero de conejos para fijar y transportar hormona tiroidea bajo la influencia de la administración de hormonas sexuales.

La inyección intramuscular de dosis altas de estradiol (3 mg semanales) o de testosterona (75 mg por semana) determina un notable incremento de la capacidad de transporte de tiroxina por la única fracción proteica que en el suero del conejo ejerce esta función. Este comportamiento concuerda con lo observado en la especie humana en cuanto a los estrógenos y discrepa en cuanto a los andrógenos.

### Summary

Influence of the sex-hormone on the capacity of thyroxin-I<sup>131</sup> by the serum in rabbits

Various authors (5, 7, 8) have shown how, in humans, the estrogens increase the capacity of the interalphaglobulin fraction in the seric transport of thyroxin, while the androgens show a contrary effect, though a less evident one.

In the present work an experimental study has been carried out on rabbits, by intramuscular administration to 2 animals of 25 mg of testosterone every second day for 21 days, while 2 other animals have been given injections of 1 mg of stradiol benzoate, at the same rate and for the same period.

The capacity of transport of thyroxin-I<sup>131</sup> has been measured in blood samples taken before the beginning of the exper-

iment and after the 1st, 2nd and 3rd weeks of the treatment.

The serums charged *in vitro* with thyroxin-I<sup>131</sup> (Radiochemical Center, Amersham), have been separated by electrophoresis on paper with a tampion of tris-maleate pH 8.6, and the radioactivity of the strips has been measured with a Philips unit. On the radioactivity curves there only appears one thyroxin-transporting fraction, which is situated between the albumin and the alpha-globulin. The planimetric measurement of the surface of this fraction has been used to analyse the variations in transport capacity, after making the necessary corrections (table I).

Table II shows how in rabbits, and in the doses employed, the sex-hormones elevate the fixing capacity of the serum for the thyroxin. This behaviour is in accord with that of humans as far as estrogens are concerned, but differs from it with regard to androgens. It may be possible to explain this difference by the doses injected, in our case 12 mg of testosterone per kilo of body weight, on alternate days, whereas the dose indicated by other authors (5, 7, 8) is 0,7 mg of testosterone per kilo of body weight daily.

### Bibliografía

- (1) ALBRIGHT, E. C., LARSON, F. C., y DEISS, W. P.: *J. Clin. Invest.*, **34**, 44, 1955.
- (2) ANNISON, E. F., y LEWIS, D.: *Biochem. J.*, **68**, 29, 1958.
- (3) BERGER, S., GOLDSTEIN, M. S., y METZGER, B. E.: *New Engl. J. of Med.*, **267**, 801, 1962.
- (4) DOWLING, J. T., FREINKEL, N., y INGBAR, S. H.: *J. Clin. Invest.*, **35**, 1263, 1956.
- (5) DOWLING, J. T., FREINKEL, N., y INGBAR, S. H.: *J. Clin. Endocrinol.*, **16**, 1491, 1956.
- (6) DOWLING, J. T., FREINKEL, N., y INGBAR, S. H.: *J. Clin. Invest.*, **39**, 1119, 1960.

- (7) ENGBRING, E. H., y ENGSTROM, W. W.: *J. Clin. Endocrinol.*, **19**, 783, 1959.
- (8) FEDERMAN, D. D., ROBBINS, J., y RALL, J. R.: *J. Clin. Invest.*, **37**, 1024, 1959.
- (9) FELDMAN, J. D.: *Endocrinology*, **58**, 327, 1956.
- (10) GORDON, A. H., GROSS, J., O'CONNOR, D., y PITT-RIVERS, R.: *Nature*, **169**, 19, 1952.
- (11) INGBAR, F. H.: *Endocrinology*, **63**, 256, 1958.
- (12) LEMARCHAND-BÉRAUD, Th., VANNOTTI, A., y JEANNERET, M. R.: *Schweiz. Med. Wchr.*, **93**, 7, 1963.
- (13) ROBBINS, J.: *Fed. Proc.*, **15**, 153, 1956.
- (14) TATA, J. R., WIDNELL, C. C., y GRATZER, W. C.: *Clin. Chim. Acta*, **6**, 597, 1961.