

Influencia del estado tiroideo en la regulación del axis IGFs/IGFBPs

Influence of the thyroid status on the regulation of the IGFs/IGFBPs axis

RAMOS, S. y PASCUAL-LEONE, A. M.

Instituto de Bioquímica (Centro Mixto CSIC-UCM). Facultad de Farmacia. Ciudad Universitaria. 28040 Madrid. Spain. Phone/Fax: 34 1 5438649, E-mail address: apascual@eucmvx.sim.ucm.es

RESUMEN

Se realizan una serie de experimentos en tres poblaciones de ratas: neonatales (10, 15 y 20 días de vida), destetadas (27, 32 y 37 días de vida) y adultas. Estos animales se tiroidectomizan y se tratan con metimazol y se les sacrifica a 5, 10 y 15 días después de la tiroidectomía. En una segunda parte se rehabilitan con 1,5 µg de tiroxina/100g de peso corporal las neonatales y con 1,75 µg de tiroxina/100g de peso corporal las adultas. La rehabilitación se hace también con implantación de pellets. Se miden IGFs e IGFBPs circulantes y expresión de ARNm hepático. Se concluye una diferente acción de las hormonas tiroideas sobre el axis IGFs/IGFBPs según la edad del animal y una posible interacción mediadora de la insulina en dicha acción.

Palabras clave: IGFs. Tiroides.

ABSTRACT

A series of experiments have been performed in three populations of rats: neonates (10, 15 and 20-day-old rats), weaning (27, 32 and 37-day-old rats) and adult rats. These animals were thyrectomized, treated with metimazol and sacrificed after 5, 10 and 15 days of thyrectomy. Rats were subsequently recovered with 1,5 µg of tiroxin per 100 g of body weight in the case of neonates and 1,75 µg in the case of adults. The recovery was also made by pellet implantation. Circulating IGFs and IGFBPs were determined as well as the expression of hepatic mRNA. It is concluded that the action of the thyroid hormones on the IGF/IGFBP axis is age related. In addition, it is concluded that insulin may mediate the effect of thyroid hormones.

Key words: IGFs, Thyroid.

Recibido: 28-11-96.

Aceptado: 10-12-96.

BIBLID [0004-2927(1996) 37:4; 761-770]

INTRODUCCIÓN

Los factores de crecimiento similares a la insulina (IGFs o IGF-I y -II) son factores asimilados actualmente a las antiguas somatomedinas, y por tanto en periodo adulto su secreción está regida por la hormona de crecimiento (GH). Estructuralmente son polipéptidos parecidos a la proinsulina y circulan en plasma unidos a proteínas ligadoras (IGFBPs) de las cuales se conocen seis (1). Aunque se desconoce actualmente su papel se cree que regulan la actividad biológica de los IGFs.

En trabajos previos se estableció que los niveles de factores de crecimiento similares a la insulina (IGFs) son bajos en el hipotiroidismo y la administración de tiroxina los eleva (2,3,4). En otros trabajos más recientes se ha visto que las hormonas tiroideas parecen implicadas en el desarrollo ontogénico de dichos factores y sus proteínas ligadoras (4). Dicho desarrollo ontogénico consiste en la abundancia en periodos inmaduros del IGF-II circulante junto a niveles elevados de proteínas ligadoras de bajo peso molecular IGFBP-1 y 2. Sin embargo, en periodo adulto disminuye el IGF-II a niveles muy bajos y el factor circulante en abundancia es el IGF-I junto a la proteína ligadora de alto peso molecular IGFBP-3 (5).

Las hormonas tiroideas son hormonas muy importantes en el desarrollo, y estos factores IGFs parecen también muy implicados en la regulación de éste; el IGF-II ha sido considerado la hormona de crecimiento en el feto. Por ello el estudio de las posibles implicaciones de las hormonas tiroideas en la regulación de la secreción de IGFs es un problema importante en Perinatología. Por otra parte, ha sido sugerido que la regulación de los IGFs por hormonas tiroideas no se explica totalmente por una acción indirecta a través de la GH (6). Se ha encontrado que la rehabilitación de los IGF/IGFBPs en ratas neonatales subnutridas se produce sin una previa recuperación de GH; el balance insulina/nutrientes parece estar desempeñando un papel decisivo en dicha recuperación (7).

La recuperación de los IGFs en animales hipotiroideos por tratamiento con tiroxina parece depender de la edad del animal (8). Indudablemente existe una relación compleja entre el tiroides y el eje hipofisario GH/IGFs en cuya relación la posible mediación de la insulina ha sido poco considerada. Además la mayor parte de los estudios realizados en ratas hipotiroideas y adultas se han realizado por separado.

En este trabajo se efectúa primero un estudio comparativo en una población de ratas hipotiroideas neonatales y adultas sometidas al mismo lapso de privación de hormonas tiroideas, y segundo a ambas poblaciones se les somete al mismo periodo de recuperación con T4 por inyección o pellet. Se determinan por radioinmunoensayo (RIA) o radioreceptor los niveles plasmáticos de IGF-I y -II, y por análisis de protección de la RNasa la expresión del ARN

hepático de los IGFs. También se dosifica en todos los casos la insulina plasmática, y los niveles de GH. Además se comienza un estudio de las proteínas ligadoras de IGFs en estos animales. Se trata de poder comparar la rehabilitación del axis IGFs/IGFBPs en ratas hipotiroideas adultas y neonatales estudiadas conjuntamente.

MATERIAL Y MÉTODOS

Materiales

Los patrones empleados fueron los IGFs-I y II recombinantes humanos (Boehringer Mannheim, Leverkusen, Alemania) y también fueron utilizados para la yodación. Las RNAsas A y T₁ y las enzimas de restricción fueron igual, suministradas por Boehringer Mannheim. El Na¹²⁵I y las películas para autorradiografías Hyperfilm MP las proporcionó Amersham (Amersham Ibérica, S.A., Madrid, España). El antisuero policlonal contra IGF-I humano y el fragmento (residuos 57-70) C-terminal se obtuvo de KabiGen AB (Estocolmo, Suecia). El metimazol (MMI) y la tiroxina (T₄) eran de Sigma Chemical CO (St. Louis, Mo, USA). Para la rehabilitación de los animales hipotiroideos se emplearon pellets (Innovative Research of America, Sarasota, FL, USA). El Sephadex G-50 era de Pharmacia (Upsala, Suecia) y las membranas de nitrocelulosa (0.2 µm) y los patrones, de Bio-Rad (Richmond, CA). El ³²P-UTP fue suministrado por ICN (Nuclear Ibérica A, Madrid, España) y el sistema de ribosonda Gemini II Care, empleado para generar las sondas de ARN, por Promega Corporation (Madison, WI, USA).

Animales

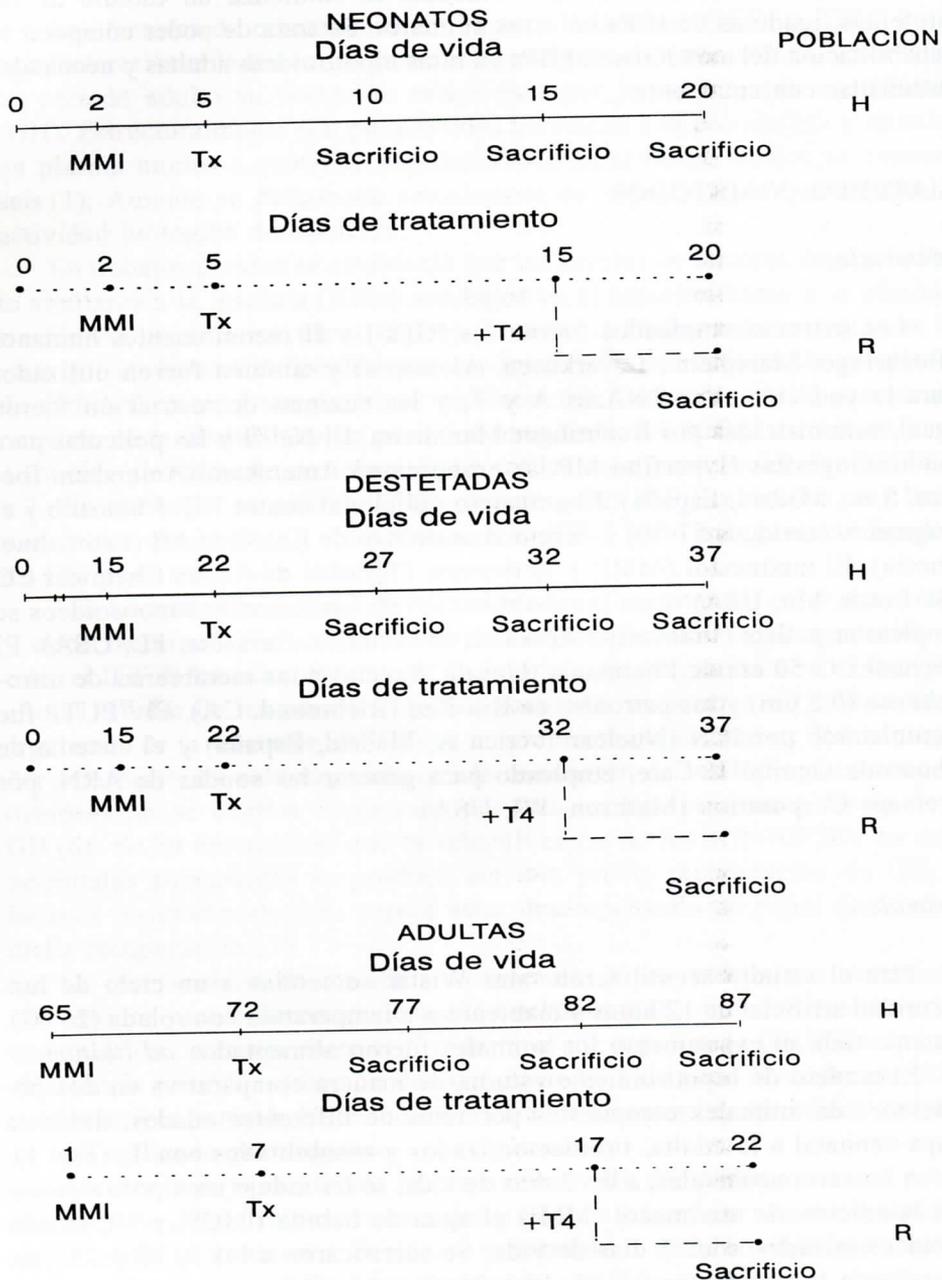
Para el estudio se utilizaron ratas Wistar sometidas a un ciclo de luz/oscuridad artificial de 12 horas y mantenidas a temperatura controlada (25 °C). Durante todo el experimento los animales fueron alimentados *ad libitum*.

El modelo de hipotiroidismo estudia de manera comparativa en dos poblaciones de animales compuestas por ratas de diferentes edades, desde la etapa neonatal a la adulta, tiroidectomizados y rehabilitados con T₄ (Fig. 1).

A las ratas neonatales, a los 2 días de vida, se les indujo un hipotiroidismo por la adición de metimazol (MMI) al agua de bebida (0.02% p/V), siendo tiroidectomizadas a los 5 días de vida. Se sacrificaron a los 5, 10 y 15 días después de la tiroidectomía (10, 15 y 20 días de vida).

En las ratas destetadas, la administración de MMI se inició una semana antes del destete (15 días de vida). A los 22 días de vida, se tiroidectomizaron,

PROTOCOLO EXPERIMENTACION



y se sacrificaron a los 5, 10 y 15 días después de la operación (27, 32 y 37 días de vida).

En las ratas adultas se sigue el mismo protocolo que en las destetadas, pero se toma como día primero del experimento aquel en el que los animales alcanzan los 120 g de peso (65 días de vida), iniciándose entonces la administración de MMI. Se sacrificaron a los 5, 10 y 15 días de la tiroidectomía (77, 82 y 87 días de vida).

Por otro lado, 10 días después de la tiroidectomía, y durante 5 días, se inició una pauta de recuperación que consistía en administrar una dosis diaria, vía i.p., de T_4 de 1.5 $\mu\text{g}/100$ g de peso para las ratas neonatales y de 1.75 $\mu\text{g}/100$ g de peso para los animales destetados y adultos. De manera paralela, un grupo diferente de ratas neonatales y adultas fue sometido a un proceso de rehabilitación de carácter más fisiológico, los pellets. Este dispositivo se implantó subcutáneamente realizando una pequeña incisión en el lomo del animal. La dosis administrada en este experimento es la misma que en el caso anterior (1.5 y 1.75 $\mu\text{g}/100$ g de peso para neonatos y adultos, respectivamente).

Las muestras de sangre se recogieron del tronco, se dejaron coagular en hielo durante 30 min. Posteriormente, se separaron el suero y el plasma, conservándose a -80 °C hasta su análisis. Las muestras de hígado fueron congeladas con N_2 líquido y se mantuvieron a -80 °C hasta su tratamiento analítico.

Determinación de T_3 , T_4 , insulina y GH séricas

La determinación de las concentraciones séricas totales de las hormonas tiroideas se realizó por duplicado utilizando un kit comercial de radioinmunoensayo (bioMérieux, Francia). El límite de detección de este ensayo era de 0.2 nmol/l (0.13 ng/ml) para T_3 y 3 nmol/l (0.2 ng/ml) para T_4 .

La concentración de insulina en el suero se evaluó por duplicado mediante RIA (NOVO Nordisk, Madrid, España) con un límite de detección de 3 $\mu\text{U}/\text{ml}$ (0.12 ng/ml).

Los niveles de GH en suero se determinaron usando los reactivos que distribuye el NIH (National Hormone and Pituitary Program of the National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases). La dosis mínima detectada fue de 0.03 ng/ml.

Yodación y purificación de IGF-I y II

El método seguido para el marcaje de los IGFs-I y II recombinantes humanos fue el de la cloramina T modificado (5,9). La actividad específica

alcanzada con esta metodología se situaba en el intervalo 90-175 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ para ambos péptidos.

Determinación de los IGFs I y II séricos

Antes de llevar a cabo la determinación de IGFs en suero, es preciso eliminar las IGFbps mediante filtración ácida en gel (9).

El RIA de IGF-I se desarrolló siguiendo las metodologías previamente descritas (2) y por duplicado. Los coeficientes de variación intra e interensayo en estos análisis fueron del 8.0% y 12.4%, respectivamente, siendo la interferencia del IGF-II en el RIA de IGF-I del 11.7%.

Los datos de IGF-I fueron corregidos por la interferencia del IGF-II.

El ensayo del radioreceptor para IGF-II se realizó con membranas de hígado de rata purificadas de acuerdo con el método descrito por Rivero y col. (5,9). Los coeficientes de variación intra e interensayo fueron del 8.4% y 9.9%, respectivamente, siendo la interferencia del IGF-I inferior al 0.1%.

Western ligand blotting

La determinación de las IGFbps séricas se efectuó de acuerdo con el método propuesto por Hosenlopp (10) en un gel de poliacrilamida al 10%. El equivalente de 2.5 μl de suero se sometió a la electroforesis en condiciones no reductoras para prevenir la desnaturalización de las IGFbps. En calles adyacentes, bajo condiciones reductoras, se hicieron correr los marcadores preteñidos de pesos moleculares. Después de la electrotransferencia a nitrocelulosa, las membranas se bloquearon con BSA (albúmina bovina) y se incubaron con IGF-II marcado con ^{125}I (10⁶ cpm) durante 20 h a 4 °C.

La visualización de las IGFbps se realizó por autorradiografía poniendo una película Hyperfilm MP entre pantallas intensificadoras a -80 °C. Posteriormente, las bandas correspondientes a las proteínas ligadoras fueron cuantificadas con un densitómetro (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA).

Preparación del ARN

El ARN total se preparó por homogeneización de los hígados en tiocianato de guanidina (11), se reprecipitó para su purificación, y su concentración fue determinada por la medida de la absorbancia a 260 nm. Las muestras se sometieron a una electroforesis en gel de agarosa (1.1%) y se tñieron con bromuro de etidio para visualizar las bandas del ARN

ribosomal 18 y 28s, confirmar su integridad y normalizar su cantidad en las distintas calles.

Ribosondas

Los ADNc de rata de IGF-I y II, IGFBP-1 y 2 fueron cedidos por los Drs. E. Hernández (Instituto de Bioquímica, Madrid, España), C.T. Roberts y D. LeRoith (NIH). El ADNc de IGF-I de rata unido al plásmido pGEM-3 se linearizó con Hind III y la ribosonda antisentido fue producida por la polimerasa ARN T7 que generó dos fragmentos protegidos de 224 bases (Ia) y 386 bases (Ib). El ADNc de IGF-II de rata ligado al plásmido pGEM-3 se linearizó con Hind III y se incubó con la polimerasa ARN T7 para obtener una ribosonda que reconoce un fragmento protegido de 500 bases. El ADNc de IGFBP-1 de rata insertado en el plásmido pGEM-3 se linearizó con Hind III y una vez incubado con la polimerasa ARN SP6 se generó una ribosonda antisentido capaz de reconocer dos fragmentos de 300 y 700 bases. El ADNc de IGFBP-2 de rata unido al plásmido pGEM-4Z se linearizó con Hind III y se incubó con la polimerasa SP6 para producir una ribosonda antisentido de 550 bases. El ADNc de IGFBP-3 de rata incluido en el plásmido pGEM 4Z se linearizó con AccI y se incubó con la polimerasa ARN T7, dando lugar a una ribosonda antisentido de 343 bases. Todas las ribosondas generadas se marcaron con 32 P-UTP.

Hibridación en solución/ensayo de protección de la RNasa

Los ensayos se llevaron a cabo según el método previamente descrito por Lowe y col. (12). Brevemente, consiste en hibridar 20 μ g de ARN total hepático con 500000 cpm de ribosonda marcada durante 18 h a 45 °C en una solución con un 75% (p/V) de formamida y 400 nM de NaCl. A continuación, se digieren los fragmentos de ARN no hibridados durante 1 hora a 37 °C con un tampón que contiene 40 μ g/ml de ARNasa A y 2 μ g/ml de ARNasa T₁. Los híbridos protegidos (ARN-ARN) son resueltos en geles de poli(acrilamida (8%)/urea (8M)).

La autorradiografía se realizó a -80 °C usando Hyperfilm MP. Las bandas, que representan los fragmentos protegidos, se cuantificaron con un densitómetro (Molecular Dynamics).

Estadística

Los datos presentados corresponden a los valores medios de cada experimento \pm desviación estándar. La comparación estadística entre dichas me-

días se llevó a cabo aplicando el análisis de la varianza (ANOVA) por una o dos vías, seguido de un test de diferencia significativa (13).

RESULTADOS

Animales hipotiroideos: pesos, valores circulantes y expresión hepática de ARNm

Las curvas de peso, así como los niveles plasmáticos de las hormonas tiroideas se encuentran muy disminuidos en los animales hipotiroideos de todas las etapas. Los niveles de IGF-I se encontraron aumentados en los animales neonatales hipotiroideos y disminuidos en los animales destetados y adultos. Contrariamente, los valores circulantes de IGF-II se encontraron disminuidos en todas las etapas estudiadas en los animales hipotiroideos. Sin embargo, a los 20 días de vida se halló en los animales neonatales hipotiroideos niveles circulantes aumentados con respecto a controles. El análisis de protección de la RNasa mostró que el perfil encontrado en el suero muestra un paralelismo total, en todos los casos estudiados, con la expresión del ARNm hepático de IGF-I. Ello parece indicar la existencia de una regulación a nivel de expresión génica de transcritos de ARNm. Lo mismo ocurre en la expresión del ARNm hepático de IGF-II en los animales neonatales pero en animales destetados y adultos no se encontró expresión a nivel hepático de IGF-II en animales tanto hipotiroideos como controles. Ello muestra que los valores circulantes encontrados de IGF-II parecen ser fruto de resultados de cruce con los valores de IGF-I, y no son verdaderamente IGF-II.

Expresión hepática de las IGFbps

La expresión hepática de IGFBP-1 se encontró aumentada en animales neonatales y disminuída en los animales destetados y adultos.

Todas las variaciones descritas guardan un paralelismo muy marcado con los niveles plasmáticos de insulina que se encuentran aumentados en los animales neonatales hipotiroideos y disminuídos en las otras poblaciones. Ello parece conferir a la insulina, al menos en etapas neonatales, un papel mediador en las acciones de las hormonas tiroideas sobre el axis IGFs/IGFBPs.

La expresión del ARNm hepático del IGFBP-2 paulatinamente va aumentando con la edad del animal, en los animales hipotiroideos con respecto a los controles, manifestándose claramente dicho aumento en los animales adultos. La IGFBP-3 por el contrario disminuye con el hipotiroidismo. Los valores circulantes de IGFbps parecen seguir pautas parecidas.

Animales hipotiroideos rehabilitados con tiroxina

Los valores circulantes de IGF-I y -II así como la insulina mostraron una recuperación alcanzando tasas parecidas a las controles, siendo la recuperación más evidente en los animales neonatales que en las otras dos poblaciones. Paralelamente se obtuvo una recuperación en la expresión hepática del ARNm. La recuperación con tiroxina se mostró más efectiva cuando se suministró con pellets que con inyección.

De cualquier forma los cinco días de recuperación son más eficaces en la población neonatal. Los valores de hormona de crecimiento circulante parecen guardar un paralelismo bastante estrecho con los de insulina.

DISCUSIÓN

La regulación del axis IGFs/IGFBPs, así como los valores circulantes de dichos polipéptidos presentan diferencias fundamentales según se consideran etapas adultas o neonatales (5,9). El IGF-II es abundante en periodo fetal y desciende después del nacimiento, mientras que el IGF-I es el abundante en periodo adulto. Esta secuencia se pone también de relieve en este trabajo ya que la expresión hepática del ARNm de IGF-II no aparece en animales destetados y adultos y sí en neonatos. La proteína transportadora principal en etapas inmaduras es el complejo de 30 KDa constituido por IGFBP-1 y 2. Ha sido descrito que IGFBP-1 parece estar regida por la insulina (5), dicha dependencia ha sido ratificada en estos resultados, sobre todo para la población neonatal.

También parece establecido que en etapas neonatales la secreción de IGFs parece independiente de la hormona de crecimiento (5), y en estas etapas neonatales es cuando la acción de las hormonas tiroideas sobre la secreción de IGFs parece mediada por la insulina en este trabajo.

De acuerdo con la aseveración de que la privación de hormonas tiroideas altera el desarrollo ontogénico de los IGFs anteriormente expuesto; disminución de IGF-II circulante y aumento de IGF-I (4) después del nacimiento, en este trabajo encontramos distintas alteraciones de IGF-I circulante en animales neonatales aumentadas por el hipotiroidismo y disminuidas en adultas hipotiroideas.

En los animales recuperados con tiroxina la recuperación de todos los parámetros estudiados fue mas evidente en animales hipotiroideos neonatales que en los adultos de acuerdo con los autores que han sugerido que las acciones de las hormonas tiroideas sobre la secreción de IGFs es distinta según la edad del animal que se considere (8).

Generalmente la modulación por hormonas tiroideas del axis IGFs/IGFBPs

ha sido objeto de diversos estudios (14) pero generalmente se han realizado de forma separada bien en periodo neonatal o bien en periodo adulto. Además, en casi todos los trabajos se ha intentado aclarar si las acciones de las hormonas tiroideas son directas o a través de acciones que tienen estas hormonas sobre la secreción de GH (15). Sin embargo, la influencia de la insulina y los nutrientes sobre la secreción de IGFs ha sido mostrada (16) y este trabajo aporta pruebas iniciales de que la acción de las hormonas tiroideas podría estar modulada por la insulina, sobre todo en etapas inmaduras. Sin embargo el hecho de que, en periodos inmaduros, las variaciones de la hormona de crecimiento en estos animales sean bastante paralelos a los encontrados en la insulina plasmática hacen pensar si el medidor último de las variaciones de las hormonas tiroideas podría ser la GH a través de su acción sobre la insulina circulante. Pero estos resultados no descartan la posible acción directa de la hormona de crecimiento. A dilucidar dicha cuestión vamos a encaminar nuestras investigaciones en el futuro.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) DAUGHADAY, W. H, ROTWEIN, P.: *Endocrin Rev* (1989), **10**:68-91.
- (2) BAXTER, R., SHANE, C., BROWN, A., TURTLE, J. R.: *Clin Chem* (1982), **283**:488.
- (3) CHERNAUSEK, S. D., UNDERWOOD, L. E., UTIGER, R. D., VAN WYK J. J.: *J Clin Endocr* (1983), **19**:334.
- (4) GALLO, G., DE MARCHIS, M., VOCI, A., FUGASSA, E.: *J Endocrin* (1991), **131**:367.
- (5) RIVERO, F., GOYA, L., ALAEZ, C., PASCUAL-LEONE, A. M.: *J Endocrinol* (1995), **145**:427-440.
- (6) NANTO-SALONEN, K. *et al*: *J of Endocrin* (1993), **145**:427.
- (7) GOYA, L. *et al*: *Am J of Physiol (Endocrin and Metabol)*. (1996), **34**.
- (8) NANTO-SALONEN, K., ROSENFELD, R. G: *Endocrinology* (1992), **131**:1489.
- (9) RIVERO, F., GOYA L., PASCUAL-LEONE, A. M.: *J Endocrinol* (1994), **140**:257-263.
- (10) HOSSENLOPP, P., SEURIN, D., SEGOVIA-QUINSON, B., HARDOUIN S., BINOUX, M.: *Anal Biochem* (1986), **154**:138-143.
- (11) CHOMCZYNSKI, P., SACCHI, N.: *Anal Biochem* (1987), **162**:156-159.
- (12) LOWE, W. L, ROBERTS, C. T, LASKY, S. R, LEROITH, D.: *Acad Sci USA* (1987), **84**: 8946-8950.
- (13) SNEDECOR, G. W., COCHRAN, G.: *Statistical Methods (5th ed)*. (1956). Ames: Iowa State Univ. Press.
- (14) RODRÍGUEZ-ARNAO, J., MIELL J. P., ROSS R. J. M.: *Trends Endocrinol Metab* (1993), **4**:169.
- (15) HERVÁS, F., MORREALE DE ESCOBAR G., ESCOBAR DEL REY, F.: *Endocrinology* (1975), **97**:91.