

Efecto del hipotiroidismo congénito sobre el desarrollo postnatal de la mitocondria de hígado de rata

Effect of congenital hypothyroidism on postnatal development of rat liver mitochondria

ALMEIDA, A. y MEDINA, J. M.

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Facultad de Farmacia. Universidad de Salamanca. Edificio Departamental. Avda. Campo Charro, s/n. 37007 Salamanca. España.

RESUMEN

Se ha estudiado el efecto del hipotiroidismo congénito sobre los cambios postnatales en las poblaciones mitocondriales y en la actividad respiratoria y osmótica de la mitocondria hepática. El hipotiroidismo inhibió el aumento postnatal de la proporción de la población mitocondrial de baja fluorescencia (LFP, población madura), así como el aumento de la actividad respiratoria y osmótica mitocondriales que se observa en los neonatos eutiroides inmediatamente después del nacimiento. La administración de hormonas tiroideas a los neonatos hipotiroides al nacer revirtió los efectos causados por el hipotiroidismo, alcanzándose niveles propios del estado eutiroides. El efecto de las hormonas tiroideas sobre las poblaciones mitocondriales y el desarrollo funcional (RCR) y estructural (comportamiento osmótico) de la mitocondria hepática se anuló con la administración de cicloheximida. Nuestros resultados sugieren que las hormonas tiroideas regulan el desarrollo de la mitocondria hepática mediante la síntesis de alguna(s) proteína(s) envuelta(s) en el ensamblaje del complejo F₀F₁-ATPase.

Palabras clave: Hipotiroidismo. Hormonas Tiroideas. Mitocondria. Neonato, Rhodamina 123.

ABSTRACT

The effects of congenital hypothyroidism on postnatal changes of rhodamine 123-stained mitochondrial populations, respiratory function and osmotic activity of rat liver mitochondria have been studied. Hypothyroidism prevented the postnatal increase in the percentage of mitochondrial low fluorescence population (LFP, mature form) that occurs immediately after birth. This effect coincides with the prevention of postnatal onset of respiratory function and osmotic activity of liver mitochondria from hypothyroid newborns. The administration of thyroid hormones to hypothyroid newborns at birth reversed all these effects, reaching levels of maturation similar to those of euthyroid newborns. The effect of thyroid hormones on the percentage of mitochondrial populations and on the functional (RCR) and structural (osmotic activity) maturation were prevented by cycloheximide supplement. Our results suggest that thyroid hormones regulate

postnatal development of liver mitochondria through the synthesis of some(s) protein(s) involved in the F₀F₁-ATPase assembly.

Key words: Hypothyroidism. Thyroid Hormones. Mitochondria. Newborn. Rhodamine 123.

Recibido: 28-11-96.

Aceptado: 9-12-96.

BIBLID [0004-2927(1996) 37:4; 807-816]

INTRODUCCIÓN

El desarrollo de la mitocondria hepática tiene lugar cuando las disponibilidades de oxígeno aumentan drásticamente, es decir, inmediatamente después del nacimiento. Durante la primera hora de vida extrauterina se produce un fuerte aumento en el índice de control respiratorio (RCR) (1-3) así como en la actividad de la cadena respiratoria mitocondrial (4), alcanzándose la plena funcionalidad respiratoria mitocondrial. Paralelamente a este proceso, la membrana interna mitocondrial sufre una serie de cambios estructurales que conducen a la transformación de una membrana relativamente permeable en el feto a una membrana osmóticamente activa en el neonato (1, 5).

Resultados realizados en nuestro laboratorio han puesto de manifiesto la existencia de dos poblaciones mitocondriales mediante el análisis por citometría de flujo de mitocondrias de hígado teñidas con rh-123, cuyas proporciones varían durante el período perinatal (3, 6, 7). Así, la población de baja fluorescencia (LFP) aumenta al aumentar la capacidad funcional de la mitocondria hepática (3, 6).

La mitocondria se considera un orgánulo diana de la acción de la T₄ y la T₃. Ambas hormonas regulan la morfología (8, 9), estructura (10, 11) y función (12) del orgánulo. Recientemente se ha puesto de manifiesto que las hormonas tiroideas juegan un importante papel en los procesos de diferenciación (13, 14) y proliferación (13, 15) mitocondriales durante el período perinatal. En este sentido, nos propusimos investigar el efecto del hipotiroidismo congénito sobre el desarrollo de la función respiratoria así como sobre el comportamiento osmótico de la mitocondria de hígado de rata durante la primera hora de vida extrauterina.

MATERIAL Y MÉTODOS

El hipotiroidismo se indujo mediante la administración de metimazol (0,02%) en el agua de bebida a ratas preñadas (Wistar) durante la última semana de gestación (14, 16). Para el estudio del tratamiento con hormonas

tiroideas, a fetos hipotiroideos a término (0 h) se les administró intraperitonealmente 3,6 μg de T3 y 14,4 μg de T4/100 g de peso corporal en solución salina. En algunos experimentos, la solución de T4 T3 se suplementó con 1 mg de cicloheximida o con 10 mg de estreptomicina/100 g de peso corporal. A los animales control se les administró el mismo volumen (50 μL) del vehículo (14).

Inmediatamente después del sacrificio de los animales (0 h y 1 h postpartum), las mitocondrias de hígado se aislaron mediante un gradiente discontinuo de Percoll (17). La determinación de proteínas se realizó mediante el método de Lowry et al. (18).

Previo al análisis por citometría de flujo, las mitocondrias aisladas se tiñeron mediante incubación en una solución de rodamina-123 (10 μg Rh-123/mL), como hemos descrito anteriormente (3, 14, 17). La medida de la fluorescencia mitocondrial (debida a la Rh-123) se realizó en un citómetro de flujo FACStar, utilizando el programa Consort 30 (Becton-Dickinson).

La velocidad de consumo de oxígeno en estado 3 (en presencia de 200 nmoles de ADP), en estado 4 y en estado 4oi (en presencia de 10 μg de oligomicina) se determinó con un electrodo de oxígeno tipo Clark (3, 14).

La medida del comportamiento osmótico mitocondrial se realizó espectrofotométricamente (1, 19, 20). Para ello, las mitocondrias se preincubaron en soluciones de sacarosa de concentraciones crecientes (40-250 mOsm) durante 5 minutos y se midió la absorbancia de la suspensión mitocondrial a 540 nm. Los cambios en la absorbancia se tomaron como índice de los cambios en el diámetro mitocondrial (19, 20).

RESULTADOS

Efecto del hipotiroidismo experimental sobre los cambios postnatales de las poblaciones mitocondriales de fluorescencia

Como ya hemos descrito anteriormente (3, 6, 7), el análisis por citometría de flujo de mitocondrias hepáticas puso de manifiesto la existencia de dos poblaciones mitocondriales con distinta intensidad de fluorescencia de la rh-123 (Fig. 1). Ambas poblaciones, LFP (población de baja fluorescencia) y HFP (población de alta fluorescencia), estaban presentes en todas las condiciones experimentales estudiadas; sin embargo, sus proporciones variaron con el estado tiroideo de los neonatos. Así, el hipotiroidismo inhibió el aumento de la proporción de la LFP que se produce en los neonatos eutiroideos durante la 1ª hora de vida extrauterina (Fig. 1). La administración de T4 y T3 a los neonatos hipotiroideos al nacer aumentó la proporción de la LFP, siendo la relación LFP/HFP muy similar a la observada en los neonatos eutiroideos de 1 h

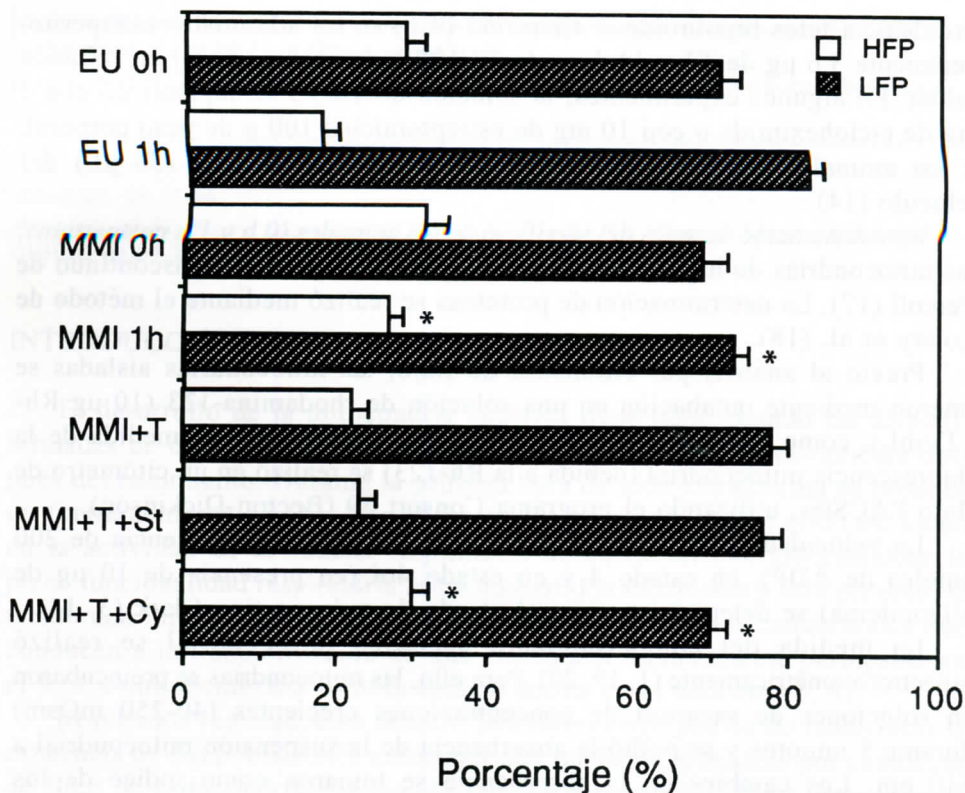


Fig. 1.—Efecto del hipotiroidismo sobre el porcentaje de las poblaciones mitocondriales de fluorescencia en hígado de neonato de rata. Se aislaron mitocondrias de hígado de fetos a término (0 h) y neonatos (1 h) eutiroides (EU), hipotiroides (MMI), hipotiroides tratados con T4 y T3 (MMI+T), hipotiroides tratados con T4 y T3 más estreptomicina (MMI+T+St) e hipotiroides tratados con T4 y T3 más cicloheximida (MMI+T+Cy). Las mitocondrias aisladas se tiñeron con Rh-123 y la fluorescencia se midió en un citómetro de flujo utilizando el programa Consort 30. Los resultados son Medias±SEM de 4 preparaciones mitocondriales diferentes para cada condición experimental. * $p < 0,05$, comparado con el grupo EU de la misma edad.

(Fig. 1). Con objeto de determinar si el efecto de las hormonas tiroideas estaba mediado por la síntesis de proteínas a nivel citoplasmático o a nivel mitocondrial, se administró cicloheximida o estreptomicina, respectivamente, junto con la solución de T4 y T3 a los neonatos hipotiroides al nacer. Así, el tratamiento con cicloheximida, pero no con estreptomicina, anuló el efecto de las hormonas tiroideas sobre los porcentajes de las poblaciones mitocondriales en los neonatos hipotiroides (Fig. 1).

Efecto del hipotiroidismo experimental sobre los parámetros respiratorios de mitocondria de hígado durante el período perinatal

El hipotiroidismo experimental disminuyó en un 25% el valor del RCR de mitocondria de hígado, en relación a los valores observados en los neonatos eutiroides (Fig. 2). Dicha disminución se debe, principalmente, a un aumento en la velocidad de consumo de oxígeno en estado 4 y, particularmente, a un aumento en la velocidad de consumo de oxígeno en estado 4oi (en presencia de oligomicina), es decir, en la permeabilidad pasiva a protones a través de la membrana interna mitocondrial (14). La administración de T4 y T3 a los neonatos hipotiroideos al nacer aumentó el RCR hasta valores propios del estado eutiroides. Dicho aumento coincide con el aumento de la permeabilidad pasiva a protones de la membrana interna mitocondrial (estado 4oi) en los neonatos hipotiroideos sometidos al tratamiento hormonal (Fig. 2). Por tanto, la administración de T4 y T3 a los neonatos hipotiroideos al nacer revierte los efectos del hipotiroidismo sobre los parámetros respiratorios; dichos efectos hormonales se bloquearon con cicloheximida, pero no con estreptomycinina (Fig. 2).

Efecto del hipotiroidismo experimental sobre el comportamiento osmótico de mitocondria de hígado durante el período perinatal

De acuerdo con Pollak y colaboradores (1, 5), hay una marcada relación entre el comportamiento osmótico mitocondrial y el aumento de la edad en los neonatos eutiroides (Fig. 3). Así, durante la 1ª hora de vida extrauterina se produce el paso de una mitocondria osmóticamente inactiva a una osmóticamente activa en los animales eutiroides. Sin embargo, el hipotiroidismo impidió el aumento postnatal de la actividad osmótica mitocondrial, siendo muy similar en el feto a término (0 h) y en el neonato (1 h) hipotiroideos (Fig. 3). La administración de T4 y T3 a los neonatos hipotiroideos al nacer promovió el aumento de la actividad osmótica mitocondrial, mostrando un perfil muy similar al de los neonatos eutiroides. El tratamiento con cicloheximida, pero no con estreptomycinina, bloqueó el efecto de las hormonas tiroideas sobre el comportamiento osmótico mitocondrial, mostrando una actividad osmótica muy similar a la de los neonatos hipotiroideos que no recibieron tratamiento hormonal (Fig. 3).

DISCUSIÓN

Inmediatamente después del nacimiento se produce en el hígado la transformación de la población mitocondrial de alta fluorescencia (HFP) o pobla-

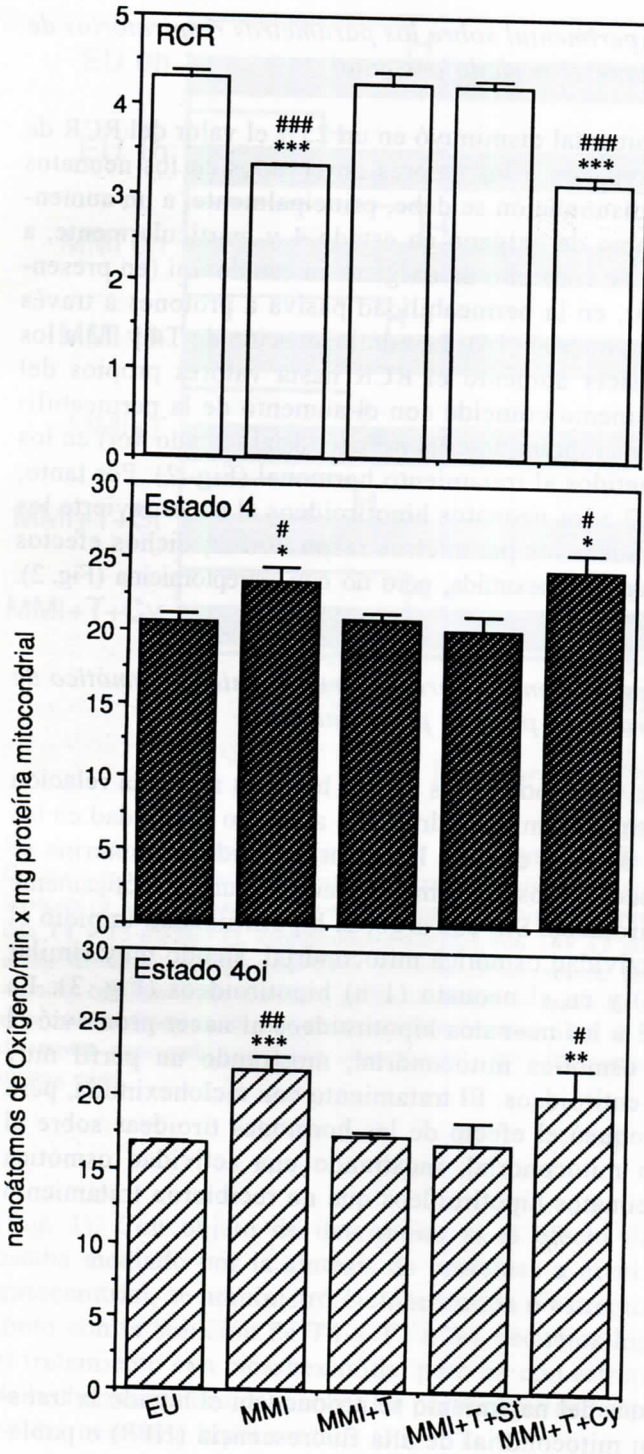


Fig. 2.—Efecto del hipotiroidismo sobre los parámetros respiratorios mitocondriales en hígado de neonato de rata. Se aislaron mitocondrias de hígado de neonatos (1 h) eutiroideos (EU), hipotiroides (MMI), hipotiroides tratados con T4 y T3 (MMI+T), hipotiroides tratados con T4 y T3 más estreptomina (MMI+T+St) e hipotiroides tratados con T4 y T3 más cicloheximida (MMI+T+Cy). La velocidad de consumo de oxígeno en estado 4oi se realizó en presencia de 10 μ g de oligomocina en el medio de respiración. Los resultados son Medias \pm SEM de 4 preparaciones mitocondriales diferentes para cada condición experimental. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$, comparado con el grupo MMI+T. # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$, comparado con el grupo EU; # $p < 0,05$,

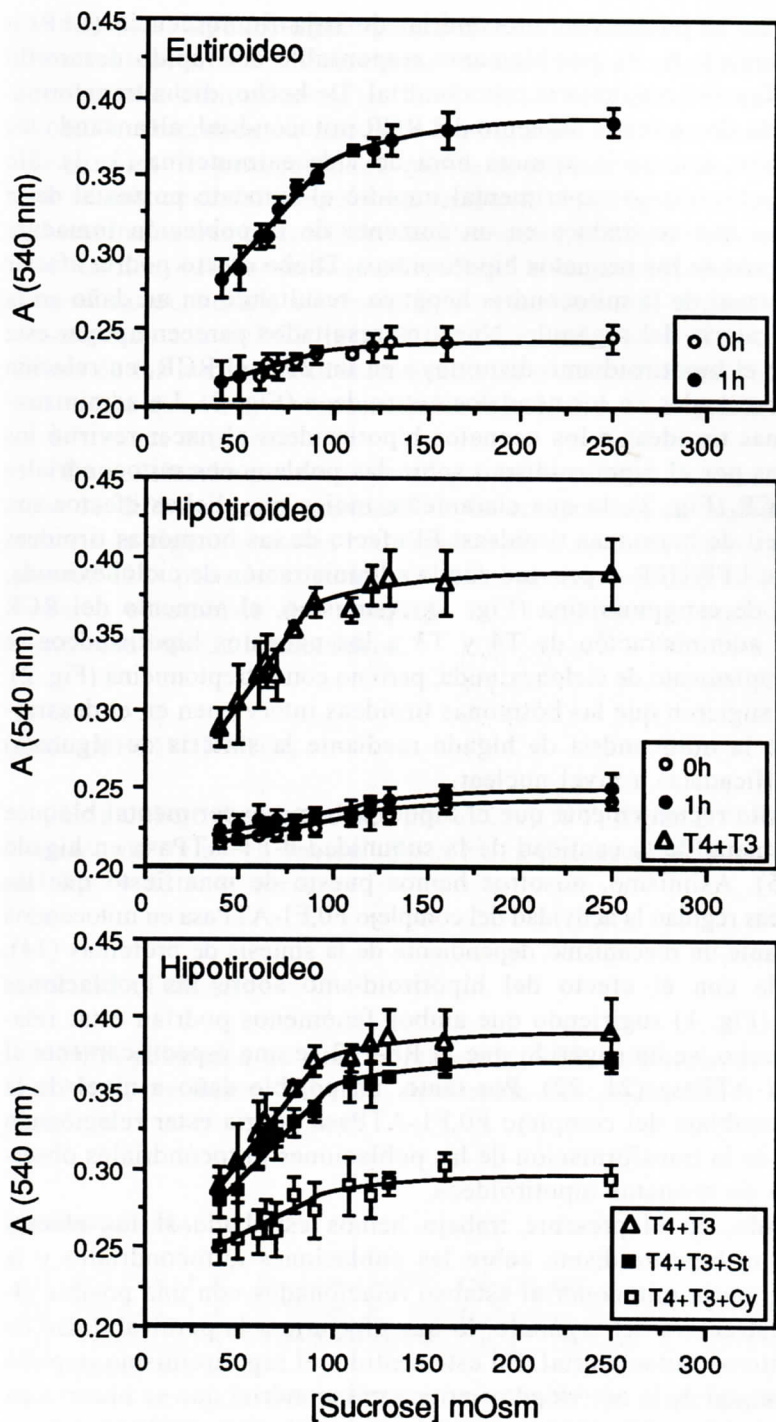


Fig. 3.—Efecto del hipotiroidismo sobre el comportamiento osmótico mitocondrial en hígado de neonato de ratón. Se aislaron mitocondrias de hígado de fetos a término (0 h) y neonatos (1 h) eutiroideos, hipotiroideos, hipotiroideos tratados con T4 y T3 (T4+T3), hipotiroideos tratados con T4 y T3 más estreptomina (T4+T3+St) e hipotiroideos tratados con T4 y T3 más cicloheximida (T4+T3+Cy). Las mitocondrias aisladas se incubaron en soluciones de sacarosa de osmolaridad creciente y se midieron los cambios en la absorbancia de las suspensiones mitocondriales a 540 nm. Los resultados son Medias±SEM de 3 preparaciones mitocondriales diferentes para cada condición experimental.

ción inmadura en la población mitocondrial de baja fluorescencia (LFP) o población madura (3, 6, 7), posiblemente responsable del rápido desarrollo postnatal de la función respiratoria mitocondrial. De hecho, dicha transformación se acompaña de un fuerte aumento del RCR mitocondrial, alcanzando los valores del adulto durante la primera hora de vida extrauterina (1, 3). Sin embargo, el hipotiroidismo experimental impidió el aumento postnatal de la LFP (Fig. 1), lo que se traduce en un aumento de la población inmadura (HFP) en el hígado de los neonatos hipotiroideos. Dicho efecto podría afectar al desarrollo normal de la mitocondria hepática, resultando en un daño en la capacidad respiratoria del orgánulo. Nuestros resultados parecen apoyar esta idea puesto que el hipotiroidismo disminuyó en un 25% el RCR, en relación a los valores observados en los neonatos eutiroideos (Fig. 2). La administración de hormonas tiroideas a los neonatos hipotiroideos al nacer revirtió los efectos causados por el hipotiroidismo sobre las poblaciones mitocondriales (Fig. 1) y el RCR (Fig. 2), lo que claramente indica que dichos efectos son debidos al déficit de hormonas tiroideas. El efecto de las hormonas tiroideas sobre la relación LFP/HFP se previno con la administración de cicloheximida, pero no con la de estreptomycin (Fig. 1). Asimismo, el aumento del RCR causado por la administración de T4 y T3 a los neonatos hipotiroideos se impidió con el suplemento de cicloheximida, pero no con estreptomycin (Fig. 2). Ambos efectos sugieren que las hormonas tiroideas intervienen en el desarrollo postnatal de la mitocondria de hígado mediante la síntesis de alguna(s) proteína(s) codificada(s) a nivel nuclear.

Se ha descrito recientemente que el hipotiroidismo experimental bloquea el aumento postnatal de la cantidad de la subunidad β -F1-ATPasa en hígado de rata (13, 15). Asimismo, nosotros hemos puesto de manifiesto que las hormonas tiroideas regulan la actividad del complejo F0,F1-ATPasa en mitocondria de hígado mediante un mecanismo dependiente de la síntesis de proteínas (14), lo que coincide con el efecto del hipotiroidismo sobre las poblaciones mitocondriales (Fig. 1) sugiriendo que ambos fenómenos podrían estar relacionados. De hecho, se ha sugerido que la Rh-123 se une específicamente al complejo F0,F1-ATPasa (21, 22). Por tanto, un posible daño a nivel de la síntesis y/o ensamblaje del complejo F0,F1-ATPasa podría estar relacionado con el bloqueo de la transformación de las poblaciones mitocondriales observado en hígado de neonatos hipotiroideos.

Por otro lado, en el presente trabajo hemos estudiado si los efectos producidos por el hipotiroidismo sobre las poblaciones mitocondriales y la capacidad respiratoria mitocondrial estaban relacionados con una posible alteración de la estructura del orgánulo, lo que afectaría a la permeabilidad de la membrana interna mitocondrial. En este sentido, el hipotiroidismo impidió el aumento postnatal de la actividad osmótica mitocondrial que se observa en los neonatos eutiroideos durante la primera hora de vida (Fig. 3). Dicho efecto

fue debido al hipotiroidismo puesto que al administrar T4 y T3 a los neonatos hipotiroideos al nacer observamos un comportamiento osmótico similar al de los neonatos eutiroideos (Fig. 3). Es importante resaltar que la disminución del RCR observada en neonatos hipotiroideos se debe principalmente a un aumento en la permeabilidad pasiva a protones a través de la membrana interna mitocondrial (respiración en estado 4oi, Fig. 2), lo que concuerda con los resultados osmóticos (Fig. 3). Por tanto, el hipotiroidismo afecta no sólo a la función mitocondrial si no también a la permeabilidad de la membrana interna mitocondrial, es decir, a la estructura del orgánulo. Al igual que observamos con el RCR (Fig. 2), el suplemento de cicloheximida impidió el efecto de las hormonas tiroideas sobre la actividad osmótica mitocondrial, lo que indica que ambos procesos están relacionados y regulados por los niveles de hormonas tiroideas.

En conclusión podemos decir que las hormonas tiroideas regulan el proceso de diferenciación postnatal de la mitocondria de hígado a través de la síntesis de alguna proteína codificada a nivel nuclear. Estos resultados y otros previos (14) parecen sugerir que dicha proteína podría estar envuelta en el correcto ensamblaje del complejo F0,F1-ATPasa y, por tanto de toda la membrana interna mitocondrial.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por el CAICYT, España. A.A. disfruta de una "Acción de Reincorporación" del MEC. Agradecemos la ayuda técnica de T. del Rey y de J. Villoria.

ABREVIATURAS

HFP, población de alta fluorescencia; LFP, población de baja fluorescencia; MMI, metimazol; Rh-123, rodamina-123; RCR, índice de control respiratorio.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) POLLAK, J. K.: *Biochem J* (1975), **150**:477-488.
- (2) POLLAK, J. K., SUTTON, R.: *Trends Biochem Sci* (1980), **5**:23-27.
- (3) ALMEIDA, A., LÓPEZ-MEDIAVILLA, C., ORFAO, A., MEDINA, J.: *FEBS Lett* (1994), **344**:50-54.
- (4) VALCARCE, C., NAVARRETE, R. M., ENCABO, P., LOECHES, E., SATRÚSTEGUI, J., CUEZVA, J. M.: *J Biol Chem* (1988), **263**:7767-7775.