

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA Y BIOLOGIA MOLECULAR II

INTERACCION ENTRE HORMONAS TIROIDEAS
Y EL SISTEMA IGFs/IGFBPs:
MECANISMOS MOLECULARES

TESIS DOCTORAL

SONIA RAMOS RIVERO

Madrid, 1999

DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA Y BIOLOGIA MOLECULAR II
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA

**INTERACCION ENTRE HORMONAS TIROIDEAS
Y EL SISTEMA IGFs/IGFBPs:
MECANISMOS MOLECULARES**

Memoria que presenta **SONIA RAMOS RIVERO** para
optar al grado de Doctor en Farmacia por la
Universidad Complutense de Madrid

Madrid, 1999

Este trabajo se ha llevado a cabo en el Grupo de Endocrinología y Metabolismo Perinatal, en el Instituto de Bioquímica (Centro Mixto: F. Farmacia - C.S.I.C.), ubicado en la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid.

Ha sido realizado por Sonia Ramos Rivero y dirigido por la Dra. Ana M^a Pascual-Leone Pascual.

Deseo expresar mi agradecimiento al Profesor D. Manuel Ruiz Amil, Director del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Farmacia, así como a la Dra. Evangelina Palacios Alaiz, actual Directora del Instituto de Bioquímica, por su acogida en el mismo.

A la Dra. Ana M^a Pascual-Leone Pascual, Directora de esta Tesis, mi mayor y más profunda gratitud por su orientación y apoyo científico constantes, así como por el esfuerzo y entusiasmo puestos en la realización de este trabajo de investigación.

Expreso también mi agradecimiento a la Dra. Gabriela Morreale de Escobar por haber facilitado en su laboratorio la dosificación de las hormonas tiroideas.

A mis compañeras del Grupo de Endocrinología y Metabolismo Perinatal: M^a Angeles Martín, María Agote y Ana de la Puente por su continuo apoyo, ayuda y su más sincera amistad.

Agradezco igualmente a mis compañeros Fernando Escrivá, Carmen Alvarez y, en especial a Luis Goya, su colaboración en el aprendizaje de las técnicas de "Western immunoblot", dosificación de GH y la metodología de biología molecular, así como su constante ayuda y amistad.

De la misma forma, agradezco la inestimable labor de Angel García en el animalario del Centro, y la de Adoración Urrea y Carmen Carrizosa en la Biblioteca del Centro.

Por último, quiero hacer constar mi más sincero agradecimiento a mi familia y a mis amigos por su apoyo incondicional y muestras constantes de ánimo.

INDICE

| | |
|---|----|
| ABREVIATURAS | 17 |
| 1. INTRODUCCION | 20 |
| 1.1. HORMONAS TIROIDEAS. | 21 |
| 1.1.1. Síntesis y secreción. | 21 |
| 1.1.2. Regulación del axis tiroideo. | 21 |
| 1.1.2.1. Tirotropina | 22 |
| 1.1.2.2. Control neuroendocrino. | 22 |
| 1.1.2.2.1. Hormona de liberación de tirotropina | 22 |
| 1.1.2.2.2. Otros factores hipotalámicos. | 23 |
| 1.1.2.2.3. Hormonas tiroideas. | 24 |
| 1.1.3. Metabolismo y acciones de las hormonas tiroideas. | 24 |
| 1.1.3.1. Metabolismo. | 24 |
| 1.1.3.2. Acciones biológicas de las hormonas tiroideas. | 25 |
| 1.1.4. Interacción entre hormonas tiroideas e insulina. | 25 |
| 1.2. FACTORES DE CRECIMIENTO SIMILARES A LA INSULINA (IGFs). | 27 |
| 1.2.1. Estructura, síntesis y transporte. | 27 |
| 1.2.1.1. Estructura. | 27 |
| 1.2.1.2. Síntesis y transporte. | 28 |
| 1.2.2. Acciones biológicas de los IGFs. | 29 |
| 1.2.2.1. <i>In vitro</i> | 29 |
| 1.2.2.2. <i>In vivo</i> | 30 |
| 1.2.2.3. Acciones autocrinas, paracrinas y endocrinas. | 31 |
| 1.3. PROTEINAS TRANSPORTADORAS DE IGFs (IGFBPs). | 32 |
| 1.3.1. Estructura, síntesis y regulación. | 32 |
| 1.3.1.1. Estructura. | 32 |
| 1.3.1.2. Síntesis. | 32 |
| 1.3.1.3. Regulación. | 33 |
| 1.3.1.3.1. Variaciones diurnas. | 33 |
| 1.3.1.3.2. Nutrición. | 33 |

| | |
|---|-----------|
| 1.3.1.3.3. Ejercicio. | 34 |
| 1.3.1.3.4. Ontogenia. | 34 |
| 1.3.1.3.5. Hormonas. | 34 |
| 1.3.2. Tipos de IGFbPs y acciones biológicas. | 34 |
| 1.3.2.1. Tipos de IGFbPs. | 35 |
| 1.3.2.2. Acciones biológicas. | 37 |
| 1.4. FACTORES ENDOCRINOS QUE REGULAN EL DESARROLLO: HORMONAS TIROIDEAS E IGFs, SU INTERACCION. | 38 |
| 1.4.1. Interacción entre las hormonas tiroideas y el eje IGFs/IGFbPs. | 39 |
| 1.5. TRANSPORTADORES DE GLUCOSA (GLUTs). | 41 |
| 1.5.1. Estructura, función y expresión tisular. | 41 |
| 1.5.2. Efecto del estado tiroideo sobre los transportadores de glucosa. | 42 |
| 1.6. PLANTEAMIENTO DEL TEMA. | 44 |
| | |
| 2. MATERIAL Y METODOS | 48 |
| 2.1. ANIMALES. | 49 |
| 2.2. COMPOSICION DE LA DIETA GENERAL | 49 |
| 2.3. HIPOTIROIDISMO. | 51 |
| 2.4. MODELOS DE HIPOTIROIDISMO. | 51 |
| 2.4.1. Animales hipotiroideos neonatales. | 51 |
| 2.4.1.1. Ratas neonatales tiroidectomizadas. | 51 |
| 2.4.1.2. Ratas neonatales tratadas con MMI. | 53 |
| 2.4.1.3. Ratas neonatales tiroidectomizadas tratadas con STZ. | 53 |
| 2.4.2. Animales hipotiroideos destetados. | 53 |
| 2.4.2.1. Ratas destetadas tiroidectomizadas. | 53 |
| 2.4.2.2. Ratas destetadas tiroidectomizadas tratadas con insulina. | 54 |
| 2.4.3. Animales hipotiroideos adultos. | 54 |
| 2.4.3.1. Ratas adultas tiroidectomizadas. | 54 |
| 2.4.3.2. Ratas adultas tiroidectomizadas tratadas con insulina. | 54 |
| 2.5. MODELOS DE HIPOTIROIDISMO CON REHABILITACION. | 55 |
| 2.5.1. Animales hipotiroideos tratados con tiroxina. | 55 |
| 2.5.1.1. Rehabilitación mediante inyección de T ₄ | 55 |
| 2.5.1.2. Rehabilitación mediante implantación de pellets. | 55 |

| | |
|--|----|
| 2.6. MODELO DE DIABETES POR ESTREPTOZOTOCINA. | 55 |
| 2.6.1. Tratamiento de animales diabéticos con T ₄ | 58 |
| 2.7. ESTUDIO DE LOS TRANSPORTADORES DE GLUCOSA (GLUTs) EN RATAS NEONATALES HIPOTIROIDEAS. | 58 |
| 2.8. RECOGIDA DE MUESTRAS. | 59 |
| 2.9. DETERMINACION RADIOINMUNOLOGICA DE IGF-I. | 59 |
| 2.9.1. Fundamento del radioinmunoanálisis. | 59 |
| 2.9.2. Filtración en gel. | 60 |
| 2.9.2.1. Fundamento. | 60 |
| 2.9.2.2. Material y reactivos. | 61 |
| 2.9.2.3. Calibración de la columna. | 61 |
| 2.9.2.4. Filtración de los sueros. | 62 |
| 2.9.3. Marcaje radiactivo de IGF-I y II. | 62 |
| 2.9.3.1. Fundamento. | 62 |
| 2.9.3.2. Material y reactivos. | 63 |
| 2.9.3.3. Procedimiento. | 63 |
| 2.9.3.4. Cálculo del rendimiento y la actividad específica. | 63 |
| 2.9.3.5. Perfil de elución de radiactividad. | 64 |
| 2.9.3.6. Repurificación del IGF marcado. | 64 |
| 2.9.4. Desarrollo del RIA de IGF-I. | 64 |
| 2.9.4.1. Material y reactivos. | 64 |
| 2.9.4.2. Preparación de las muestras. | 66 |
| 2.9.4.3. Procedimiento. | 66 |
| 2.9.4.4. Cálculos. | 66 |
| 2.10. DETERMINACION RADIOINMUNOLOGICA DE T ₃ Y T ₄ | 67 |
| 2.10.1. Marcaje radiactivo de T ₃ y T ₄ | 67 |
| 2.10.1.1. Material y reactivos. | 67 |
| 2.10.1.2. Procedimiento. | 67 |
| 2.10.1.3. Perfil de elución de radiactividad. | 68 |
| 2.10.2. Desarrollo del RIA de T ₃ | 68 |
| 2.10.2.1. Material y reactivos. | 68 |
| 2.10.2.2. Procedimiento. | 69 |
| 2.10.2.3. Cálculos. | 69 |

| | |
|--|----|
| 2.10.3. Desarrollo del RIA de T ₄ | 69 |
| 2.10.3.1. Material y reactivos. | 69 |
| 2.10.3.2. Procedimiento. | 70 |
| 2.10.3.3. Cálculos. | 70 |
| 2.11. DETERMINACION RADIOINMUNOLOGICA DE INSULINA. | 70 |
| 2.11.1. Material y reactivos. | 70 |
| 2.11.2. Procedimiento. | 71 |
| 2.11.3. Cálculos. | 71 |
| 2.12. DETERMINACION RADIOINMUNOLOGICA DE HORMONA DE CRECIMIENTO (GH). | 71 |
| 2.12.1. Preparacion de las hipófisis para el RIA. | 71 |
| 2.12.2. Marcaje radiactivo de GH. | 71 |
| 2.12.2.1. Material y reactivos | 72 |
| 2.12.2.2. Procedimiento | 72 |
| 2.12.2.3. Cálculo del rendimiento y la actividad específica | 72 |
| 2.12.2.4. Perfil de elución de radiactividad tras el marcaje radiactivo de GH. | 72 |
| 2.12.2.5. Repurificación de la GH marcada. | 73 |
| 2.12.3. Desarrollo del RIA de GH. | 73 |
| 2.12.3.1. Material y reactivos. | 73 |
| 2.12.3.2. Procedimiento. | 73 |
| 2.12.3.3. Cálculos. | 74 |
| 2.13. DETERMINACION DE LA CONCENTRACION SERICA DE IGF-II POR ANALISIS DE RADIORECEPTOR (RRA). | 74 |
| 2.13.1. Fundamento. | 74 |
| 2.13.2. Preparación de membrana plasmática particulada de hígado de rata. | 74 |
| 2.13.3. Desarrollo del RRA de IGF-II. | 75 |
| 2.13.3.1. Material y reactivos. | 75 |
| 2.13.3.2. Procedimiento. | 75 |
| 2.13.3.3. Cálculos. | 76 |
| TECNICAS ELECTROFORETICAS. | 76 |
| 2.14. ANALISIS DE LAS PROTEINAS LIGADORAS DE IGF: WESTERN BLOT. | 76 |

| | |
|--|----|
| 2.14.1. Fundamento. | 76 |
| 2.14.2. Electroforesis. | 76 |
| 2.14.2.1. Preparación del gel. | 77 |
| 2.14.2.2. Preparación de las muestras. | 77 |
| 2.14.2.3. Condiciones de electroforesis. | 77 |
| 2.14.3. Electrotransferencia. | 77 |
| 2.14.4. Western ligand blot. | 79 |
| 2.14.4.1. Reactivos. | 79 |
| 2.14.4.2. Preparación de la membrana. | 79 |
| 2.14.4.3. Incubación con el radioligando. | 79 |
| 2.14.4.4. Lavado y detección de las IGFbps. | 79 |
| 2.14.5. Western inmunoblot. | 80 |
| 2.14.5.1. Reactivos. | 80 |
| 2.14.5.2. Preparación de la membrana. | 80 |
| 2.14.5.3. Incubación con el primer anticuerpo. | 81 |
| 2.14.5.4. Incubación con el anticuerpo secundario. | 81 |
| 2.14.5.5. Detección de las IGFbps. | 81 |
| 2.14.6. Western inmunoblot. | 81 |
| 2.14.6.1. Reactivos. | 81 |
| 2.14.6.2. Preparación de la membrana. | 82 |
| 2.14.6.3. Incubación con el anticuerpo primario. | 82 |
| 2.14.6.4. Incubación con el anticuerpo secundario. | 82 |
| 2.14.6.5. Detección de las IGFbps. | 82 |
| 2.15. ANALISIS DE LOS TRANSPORTADORES DE GLUCOSA (GLUTs): | |
| WESTERN INMUNOBLOT. | 83 |
| 2.15.1. Preparación de las muestras. | 83 |
| 2.15.1.1. Reactivos. | 83 |
| 2.15.1.2. Extracción de las membranas de tejidos musculares y corazón. | 84 |
| 2.15.1.3. Extracción de las membranas hepáticas. | 84 |
| 2.15.2. Western inmunoblot. | 84 |
| 2.15.2.1. Reactivos. | 84 |
| 2.15.2.2. Preparación de la membrana. | 86 |
| 2.15.2.3. Incubación con el anticuerpo primario. | 86 |

| | |
|---|-----------|
| 2.15.2.4. Incubación con el anticuerpo secundario. | 86 |
| 2.15.2.5. Detección de los GLUTs. | 86 |
| 2.16. ANALISIS DE EXPRESION DE IGFs E IGFBPs: ENSAYO DE PROTECCION DE RIBONUCLEASAS. | 87 |
| 2.16.1. Extracción del ARN total. | 87 |
| 2.16.1.1. Preparación de las muestras. | 87 |
| 2.16.2. Ensayo de protección de ribonucleasas. | 88 |
| 2.16.2.1. Fundamento. | 88 |
| 2.16.2.2. Preparación de las muestras. | 88 |
| 2.16.2.3. Síntesis de la ribosonda. | 88 |
| 2.16.2.3.1. Reactivos. | 88 |
| 2.16.2.3.2. Obtención del plásmido. | 89 |
| 2.16.2.3.3. Linearización del plásmido. | 90 |
| 2.16.2.3.4. Marcaje de la ribosonda. | 91 |
| 2.16.2.3.5. Hibridación en solución. | 92 |
| 2.16.2.3.5.1. Reactivos. | 92 |
| 2.16.2.3.5.2. Hibridación de la ribosonda. | 92 |
| 2.16.2.3.5.3. Digestión de la ARNasa. | 92 |
| 2.16.2.3.5.4. Electroforesis. | 93 |
| 2.16.2.3.5.5. Cuantificación densitométrica. | 93 |
| 2.17. OTRAS DETERMINACIONES ANALITICAS. | 93 |
| 2.17.1. Análisis de la glucemia. | 93 |
| 2.17.1.1. Glucosa en sangre. | 93 |
| 2.17.1.2. Glucosa en sangre desproteinizada. | 94 |
| 2.17.2. Determinación de las proteínas. | 94 |
| 2.18. CALCULOS ESTADISTICOS. | 95 |
| 2.18.1. Análisis de la varianza. | 95 |
| 2.18.2. Regresión lineal y correlación. | 96 |
| 3. RESULTADOS | 97 |
| 3.1. TIROIDECTOMIA (T) Y TRATAMIENTO CON METIMAZOL (MMI) EN PERIODO NEONATAL. | 98 |
| 3.1.1. Evolución del peso corporal. | 98 |

| | |
|---|-----|
| 3.1.2. Niveles séricos de T ₃ y T ₄ y plasmáticos e hipofisarios de GH. | 98 |
| 3.1.3. Glucemia e insulinemia. | 101 |
| 3.1.4. Factores de crecimiento similares a la insulina (IGFs): niveles séricos y expresión del ARNm hepático. | 101 |
| 3.1.4.1. Niveles séricos. | 101 |
| 3.1.4.2. Expresión del ARNm hepático. | 103 |
| 3.1.5. Estudio de regresión lineal y correlación. | 105 |
| 3.1.6. Proteínas ligadoras de IGFs (IGFBPs): niveles séricos y expresión del ARNm hepático. | 105 |
| 3.1.6.1. Niveles séricos. | 105 |
| 3.1.6.1.1. Western ligand blot. | 105 |
| 3.1.6.1.2. Western inmunoblot. | 108 |
| 3.1.6.2. Expresión del ARNm hepático. | 108 |
| 3.2. TRATAMIENTO CON ESTREPTOZOTOCINA (STZ) DE RATAS NEONATALES TIROIDECTOMIZADAS. | 111 |
| 3.2.1. Evolución del peso corporal. | 111 |
| 3.2.2. Niveles séricos de T ₃ y T ₄ y plasmáticos e hipofisarios de GH. | 111 |
| 3.2.3. Glucemia e insulinemia. | 113 |
| 3.2.4. IGFs: niveles séricos y expresión del ARNm hepático. | 113 |
| 3.2.4.1. Niveles séricos. | 113 |
| 3.2.4.2. Expresión del ARNm hepático. | 113 |
| 3.2.5. Estudio de regresión lineal y correlación. | 115 |
| 3.2.6. IGFBPs: niveles séricos y expresión del ARNm hepático. | 115 |
| 3.2.6.1. Niveles séricos. | 115 |
| 3.2.6.1.1. Western ligand blot. | 115 |
| 3.2.6.1.2. Western inmunoblot. | 115 |
| 3.2.6.2. Expresión del ARNm hepático. | 115 |
| 3.2.7. Resumen de los resultados del estudio de la tiroidectomía y la administración de MMI en ratas neonatales y de las ratas neonatales tiroidectomizadas tratadas con STZ. | 119 |
| 3.3. TIROIDECTOMIA EN PERIODO DE DESTETE Y ADULTO. | 121 |
| 3.3.1. Evolución del peso corporal. | 121 |
| 3.3.2. Niveles séricos de T ₃ y T ₄ y plasmáticos e hipofisarios de GH. | 121 |

| | |
|---|-----|
| 3.3.3. Glucemia e insulinemia. | 125 |
| 3.3.4. IGFs: niveles séricos y expresión del ARNm hepático. | 125 |
| 3.3.4.1. Niveles séricos. | 125 |
| 3.3.4.2. Expresión del ARNm hepático. | 125 |
| 3.3.5. Estudio de regresión lineal y correlación. | 125 |
| 3.3.6. IGFBPs: niveles séricos y expresión del ARNm hepático. | 128 |
| 3.3.6.1. Niveles séricos. | 128 |
| 3.3.6.1.1. Western ligand blot. | 128 |
| 3.3.6.1.2. Western inmunoblot. | 128 |
| 3.3.6.2. Expresión del ARNm hepático. | 131 |
| 3.4. TRATAMIENTO CON INSULINA DE RATAS TIROIDECTOMIZADAS DESTETADAS Y ADULTAS. | 131 |
| 3.4.1. Evolución del peso corporal. | 131 |
| 3.4.2. Niveles séricos de T ₃ y T ₄ y plasmáticos e hipofisarios de GH. | 134 |
| 3.4.3. Glucemia e insulinemia. | 134 |
| 3.4.4. IGFs: niveles séricos y expresión del ARNm hepático. | 134 |
| 3.4.4.1. Niveles séricos. | 134 |
| 3.4.4.2. Expresión del ARNm hepático. | 137 |
| 3.4.5. Estudio de regresión lineal y correlación. | 137 |
| 3.4.6. IGFBPs: niveles séricos y expresión del ARNm hepático. | 137 |
| 3.4.6.1. Niveles séricos. | 137 |
| 3.4.6.1.1. Western ligand blot. | 137 |
| 3.4.6.2. Expresión del ARNm hepático. | 140 |
| 3.4.7. Resumen de los resultados del estudio de la tiroidectomía en ratas destetadas y adultas y de animales destetados y adultos operados tratados con insulina. | 140 |
| 3.5. TRATAMIENTO CON T ₄ DE RATAS TIROIDECTOMIZADAS NEONATALES, DESTETADAS Y ADULTAS. | 142 |
| 3.5.1. Tratamiento con T ₄ de las ratas neonatales tiroidectomizadas. Comparación entre dosis inyectadas y pellets. | 143 |
| 3.5.1.1. Evolución del peso corporal. | 143 |
| 3.5.1.2. Niveles séricos de T ₃ y T ₄ y plasmáticos e hipofisarios de GH. | 143 |
| 3.5.1.3. Glucemia e insulinemia. | 145 |

| | |
|--|-----|
| 3.5.1.4. IGFs: niveles séricos y expresión del ARNm hepático. | 145 |
| 3.5.1.4.1. Niveles séricos. | 145 |
| 3.5.1.4.2. Expresión del ARNm hepático. | 147 |
| 3.5.1.5. Estudio de regresión lineal y correlación. | 147 |
| 3.5.1.6. IGFbps: niveles séricos y expresión del ARNm hepático. | 147 |
| 3.5.1.6.1. Niveles séricos. | 147 |
| 3.5.1.6.1.1. Western ligand blot. | 147 |
| 3.5.1.6.1.2. Western inmunoblot. | 150 |
| 3.5.1.6.2. Expresión del ARNm hepático. | 150 |
| 3.5.1.7. Resumen de los resultados del estudio del tratamiento con T ₄ en ratas neonatales tiroidectomizadas. | 152 |
| 3.5.2. Tratamiento con T ₄ de las ratas destetadas y adultas tiroidectomizadas. Comparación de dosis inyectadas y pellets. | 153 |
| 3.5.2.1. Evolución del peso corporal. | 153 |
| 3.5.2.2. Niveles séricos de T ₃ y T ₄ y plasmáticos e hipofisarios de GH. | 155 |
| 3.5.2.3. Glucemia e insulinemia. | 157 |
| 3.5.2.4. IGFs: niveles séricos y expresión del ARNm hepático. | 157 |
| 3.5.2.5. Estudio de regresión lineal y correlación. | 159 |
| 3.5.2.6. IGFbps: niveles séricos y expresión del ARNm hepático. | 159 |
| 3.5.2.6.1. Niveles séricos. | 159 |
| 3.5.2.6.1.1. Western ligand blot. | 159 |
| 3.5.2.6.1.2. Western inmunoblot. | 163 |
| 3.5.2.6.2. Expresión del ARNm hepático. | 163 |
| 3.5.2.7. Resumen de los resultados del estudio del tratamiento con T ₄ en ratas destetadas y adultas tiroidectomizadas. | 165 |
| 3.6. DIABETES EN PERIODO NEONATAL Y ADULTO Y REHABILITACION CON T ₄ | 166 |
| 3.6.1. Evolución del peso corporal. | 166 |
| 3.6.2. Niveles séricos de T ₃ y T ₄ y plasmáticos e hipofisarios de GH. | 168 |
| 3.6.3. Glucemia e insulinemia. | 169 |
| 3.6.4. IGFs: niveles séricos y expresión del ARNm hepático. | 169 |
| 3.6.4.1. Niveles séricos. | 169 |
| 3.6.4.2. Expresión del ARNm hepático. | 169 |

| | |
|---|------------|
| 3.6.5. IGFbPs: niveles séricos y expresión del ARNm hepático. | 171 |
| 3.6.5.1. Niveles séricos. | 171 |
| 3.6.5.1.1. Western ligand blot. | 171 |
| 3.6.5.1.2. Western inmunoblot. | 171 |
| 3.6.5.2. Expresión del ARNm hepático. | 171 |
| 3.6.6. Resumen de los resultados del estudio de la diabetes y el tratamiento con T ₄ en ratas neonatales y adultas. | 174 |
| 3.7. HIPOTIROIDISMO, IGFs, IGFbPs Y TRANSPORTADORES DE GLUCOSA (GLUTs) EN PERIODO NEONATAL. | 175 |
| 3.7.1. Evolución del peso corporal. | 176 |
| 3.7.2. Niveles séricos de T ₃ y T ₄ y plasmáticos e hipofisarios de GH. | 176 |
| 3.7.3. Glucemia e insulinemia. | 176 |
| 3.7.4. IGFs: niveles séricos y expresión del ARNm hepático. | 178 |
| 3.7.4.1. Niveles séricos. | 178 |
| 3.7.4.2. Expresión del ARNm hepático. | 178 |
| 3.7.5. Estudio de regresión lineal y correlación. | 180 |
| 3.7.6. IGFbPs: niveles séricos y expresión del ARNm hepático. | 180 |
| 3.7.6.1. Niveles séricos. | 180 |
| 3.7.6.1.1. Western ligand blot. | 180 |
| 3.7.6.1.2. Western inmunoblot. | 183 |
| 3.7.6.2. Expresión hepática. | 183 |
| 3.7.7. Niveles de GLUTs en membrana cruda. | 185 |
| 3.7.7.1. Corazón. | 185 |
| 3.7.7.2. Hígado. | 185 |
| 3.7.7.3. Músculos esqueléticos: cuádriceps y gastrocnemius. | 187 |
| 3.7.8. Resumen de los resultados del estudio del hipotiroidismo en ratas neonatales. | 187 |
| 3.7.9. Resumen de los resultados de las variaciones de los transportadores de glucosa (GLUTs) en ratas hipotiroideas neonatales. | 189 |
| 4. DISCUSION | 190 |
| 4.1. ESTUDIO DE LAS ALTERACIONES DEL AXIS IGFs/IGFbPs EN SITUACIONES DE HIPOTIROIDISMO DESDE LA ETAPA | |

| | |
|--|-----|
| NEONATAL A LA ADULTA. | 191 |
| 4.1.1. Niveles de IGFs en suero y expresión de su ARNm en hígado en animales neonatales hipotiroideos. | 191 |
| 4.1.2. IGFs en animales destetados y adultos tiroidectomizados. | 195 |
| 4.1.3. IGFs en animales tiroidectomizados neonatales tratados con estreptozotocina (STZ) y en destetados y adultos tratados con insulina. | 195 |
| 4.1.4. Consideraciones finales del estudio de las variaciones de los IGFs. . . | 196 |
| 4.1.5. IGFBPs: niveles séricos y expresión del ARNm hepático en animales hipotiroideos neonatales. | 197 |
| 4.1.5.1. IGFBPs en los animales neonatales hipotiroideos y tratados con STZ. | 198 |
| 4.1.5.2. Consideraciones finales del estudio de las variaciones de las IGFBPs. | 200 |
| 4.1.6. IGFBPs en animales destetados y adultos tiroidectomizados y tratados con insulina. | 201 |
| 4.1.6.1. Consideraciones finales del estudio de las variaciones de las IGFBPs en animales hipotiroideos. | 202 |
| 4.2. ESTUDIO DE LAS ALTERACIONES DEL AXIS IGFs/IGFBPs EN SITUACIONES DE HIPOTIROIDISMO (TIROIDECTOMIA) DESDE LA ETAPA NEONATAL A LA ADULTA DESPUES DE LA REHABILITACION CON T ₄ | 202 |
| 4.2.1. IGFs e IGFBPs en neonatos. | 204 |
| 4.2.2. IGFs e IGFBPs en destetados y adultos. | 206 |
| 4.3. ESTUDIO DE LA REHABILITACION CON T ₄ EN SITUACIONES DE DIABETES EN PERIODO NEONATAL Y ADULTO. | 208 |
| 4.3.1. IGFs e IGFBPs: niveles séricos y expresión del ARNm hepático. . . . | 209 |
| 4.4. ESTUDIO DE LAS VARIACIONES DE LOS TRANSPORTADORES DE GLUCOSA (GLUTs) EN ANIMALES NEONATALES HIPOTIROIDEOS. POSIBLE CORRELACION ENTRE LAS ACCIONES DE LAS HORMONAS TIROIDEAS, GLUTs Y EL AXIS IGFs/IGFBPs. | 213 |
| 4.4.1. IGFs e IGFBPs: niveles séricos y expresión del ARNm hepático. . . . | 214 |

| | |
|---|------------|
| 4.4.2. GLUTs: niveles en membrana cruda de corazón, hígado, cuádriceps y gastrocnemius. | 216 |
| CONCLUSIONES | 219 |
| BIBLIOGRAFIA | 224 |

ABREVIATURAS

| | |
|-------------------------|--|
| ACTH | Hormona corticotrópica |
| ADN | Acido desoxirribonucleico. Sufijos: c, complementario |
| ADNasa | Desoxirribonucleasa |
| ALS | Subunidad ácido lábil ("Acid labile-subunit") |
| ANOVA | Análisis de la varianza |
| APS | Persulfato amónico |
| ARN | Acido ribonucleico. Sufijos: m, mensajero; t, transportador |
| ARNasa | Ribonucleasa |
| B | Concentración de ligando unido a su receptor |
| B ₀ | Ligamiento inespecífico |
| BCIP | Fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indolilo |
| BSA | Albúmina sérica bovina |
| DA | Dopamina |
| DEPC (H ₂ O) | Dietilpirocarbamato |
| DIT | Diyodotirosina |
| DS | Desviación estándar |
| DTT | Ditiotreitol |
| ECL | Técnica de quimioluminiscencia ("Enhanced chemiluminiscence") |
| EDTA | Acido etilenaminotetracético |
| FG | Filtración en gel |
| FGF | Factor de crecimiento de los fibroblastos ("Fibroblast growth factor") |
| FSH | Hormona estimulante del folículo ("Folicle stimulating hormone") |
| GH | Hormona de crecimiento ("Growth hormone"). Prefijo: r, rata |
| GLUT | Tansportador de glucosa ("Glucose transporter") |
| HEPES | ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfónico |

| | |
|------------------|--|
| IGF | Factor de crecimiento similar a la insulina ("Insulin-like growth factor"). Prefijos: r, rata; h, humano; hr, humano-recombinante; tr, des(1-3) IGF-I (IGF-I truncado) |
| IGFBP | Proteína ligadora de IGF ("Insulin-like growth factor binding protein"). Prefijos: r, rata; h, humano; b, bovino; rh, humano-recombinante |
| ip | Administración intraperitoneal |
| iv | Administración intravenosa |
| K_{av} | Coefficiente de disponibilidad |
| LBB | Tampón de "ligand blotting" |
| MIT | Monoyodotirosina |
| MMI | 2-mercapto-1-metilimidazol (metimazol) |
| MOPS | Acido 3-(N-morfonilol)propinosulfónico |
| N | Ligamiento inespecífico |
| NBT | Nitroazul de tetrazoilo |
| Nonidet-P40 | Oxido de octilfenol-etileno |
| NT | Neurotensina |
| PAGE | Electroforesis en gel de poliacrilamida ("polyacrylamide gel electrophoresis") |
| PBS | Tampón fosfato ("Phosphate buffer saline") |
| PDGF | Factor de crecimiento de derivado de plaquetas ("Platelet-derived growth factor") |
| PEG | Polietilenglicol |
| PMSF | Fluoruro de fenil-metil-sulfonio |
| PTU | Propiltiouracilo |
| PVDF | Difluoruro de polivinilideno |
| RIA | Radioinmunoanálisis ("Radioimmunoassay") |
| rpm | Revoluciones por minuto |
| RRA | Radioanálisis de receptor ("Radioreceptor assay") |
| sc | Administración subcutánea |
| SCN ⁻ | Isotiocianato |

| | |
|----------------|--|
| SDS | Dodecilsulfato de sodio |
| SRIH | Somatostatina |
| STZ | Estreptozotocina |
| T | Concentración de ligando total |
| T ₂ | Diyodotironina |
| T ₃ | Triyodotironina. Prefijos: r, rata; r: rT ₃ (T ₃ inversa, "reverse-T ₃ ") |
| T ₄ | Tetrayodotironina o tiroxina. Prefijo: r, rata |
| TBA | Albúmina fijadora de tiroxina ("Thyroxine-binding albumin") |
| TBG | Globulina fijadora de tiroxina ("Thyroxine-binding globulin") |
| TBPA | Proalbúmina fijadora de tiroxina ("Thyroxine-binding pre-albumin") |
| TBS | Solución salina tamponada con Tris ("Tris-buffered saline") |
| TE | Tris base y EDTA |
| TEMED | N, N, N', N'-tetrametiletilendiamina |
| Tg | Tiroglobulina |
| TPO | Tiroperoxidasa |
| TRH | Hormona de liberación de tirotropina ("Thyrotropin-release hormone") |
| Tris | Tris(hidroximetil)aminometano |
| TSH | Tirotropina ("Thyroid-stimulating hormone") |
| Tween-20 | Monolaurato de polioxoetilenosorbitano |
| UI | Unidades internacionales |
| V | Volumen de elución de una sustancia determinado por filtración en gel |

INTRODUCCION

1. INTRODUCCION.

1.1. HORMONAS TIROIDEAS.

1.1.1. Síntesis y secreción.

Las células productoras de las hormonas tiroideas 3, 5, 3'-L-triyodotironina (T_3) y 3, 5, 3', 5'-L-tetrayodotironina (T_4) se organizan en folículos en el interior de la glándula tiroidea; dichos folículos rodean una cavidad que contiene una sustancia viscosa denominada coloide y que constituye el almacén para la glicoproteína tiroglobulina (Tg). Así pues, la síntesis de las hormonas tiroideas se inicia mediante la captación de yoduro por parte del tiroides mediante un mecanismo de transporte activo, a continuación, se produce la yodación en los grupos de tirosina de la Tg y, mediante un acoplamiento intramolecular en una reacción catalizada por la enzima tiroperoxidasa (TPO), se forman unos yodoaminoácidos precursores de las hormonas tiroideas: monoyodo- y diyodotirosina (MIT y DIT, respectivamente). La Tg yodada se almacena en el coloide, y sirve de reserva de T_3 , T_4 y de yodo, pero no pasa como tal a la sangre circulante, sino que la secreción de las hormonas tiroideas conlleva una degradación de la Tg por parte de la yodotirosina desyodasa (hidrolasa ácida), que libera T_3 , T_4 , MIT y DIT y yodo, que se recicla en el folículo (Guyton, 1986). El producto mayoritario de la secreción tiroidea es la tiroxina, aunque la forma activa es la triyodada (T_3), y esta se genera tanto en la glándula (en baja proporción en condiciones normales) como en tejidos extracelulares por pérdida de un átomo de yodo de la T_4 (desyodación). La T_3 tiene una afinidad 10 veces mayor por el receptor que la T_4 (St Germain, 1994).

Las hormonas tiroideas, debido a su baja solubilidad en soluciones acuosas, circulan por la sangre en una pequeña fracción (menos del 1%) en forma libre, y la mayor parte de ellas lo hacen unidas a unas proteínas transportadoras que se sintetizan en el hígado: globulina fijadora de tiroxina (TBG), albúmina (TBA) y proalbúmina (TBPA).

1.1.2. Regulación del axis tiroideo.

La síntesis y secreción de las hormonas tiroideas, expuestas de un modo simplista, están reguladas por un sistema complejo en el cual se pueden considerar tres niveles diferentes. La hipófisis sintetiza y segrega la hormona tirotrópica (TSH), principal estímulo de la función tiroidea. Dicha secreción está sujeta a dos influencias, dado que el hipotálamo produce dos hormonas, la hormona liberadora de

tirotropina (TRH), que estimula la síntesis y secreción de TSH en la hipófisis, y la somatostatina (SRIH), que la inhibe. Sin embargo, el sistema de contrarregulación positivo más importante se establece a un tercer nivel, mediante la acción supresora que las hormonas tiroideas ejercen sobre la síntesis y secreción de TSH.

Este esquema elemental se ve complicado por las diferentes acciones, inhibitorias o estimuladoras, que a los distintos niveles ejercen otras hormonas y neurotransmisores.

1.1.2.1. Tirotropina. (TSH, "thyroid-stimulating hormone").

La TSH es una glucoproteína y su regulación por las hormonas tiroideas es un sistema de retroalimentación negativa a nivel de la hipófisis; numerosos estudios han demostrado que un aumento en los niveles de las hormonas tiroideas disminuye la secreción de TSH y que el déficit de hormonas tiroideas aumenta su secreción (Belchetz, 1978). Así pues, se ha visto que en situaciones de hipotiroidismo a corto plazo, la administración de T_3 puede inhibir la síntesis y liberación de TSH de manera dosis-dependiente, vía retroalimentación. Por otro lado, en situaciones de hipotiroidismo prolongado, cuando la síntesis proteica está considerablemente disminuida, la administración de hormona tiroidea estimula la síntesis de proteínas, incluida la TSH. Este efecto predomina cuando la dosis de T_3 dada es pequeña, mientras que dosis altas de dicha hormona harían más evidente la inhibición por retroalimentación (Magner, 1990).

Además, esta regulación también ocurre vía hipotalámica, por hormonas que estimulan o inhiben (TRH y DA, respectivamente) los niveles de TSH. Así pues, las hormonas tiroideas e hipotalámicas interactúan para modular tanto los niveles circulantes de TSH como la transcripción de los genes codificadores de la hormona (Morley, 1981; Gershengorn, 1986).

1.1.2.2. Control neuroendocrino.

1.1.2.2.1. Hormona de liberación de tirotropina. (TRH, "thyrotropin-release hormone").

El TRH es un tripéptido que posee un efecto positivo en el hipotálamo sobre la función tiroidea, y aunque se encuentra ampliamente distribuido por el cuerpo, parece ser que la región del núcleo paraventricular está particularmente involucrada en el axis TRH-TSH (de Greef, 1992). No obstante, esta respuesta positiva en el hipotálamo puede ser abolida por lesiones hipotalámicas y estímulos externos

(cambios en la temperatura ambiente, stress, ciclo día-noche).

La liberación del TRH está regulada de forma negativa por las hormonas tiroideas, y aunque sobre esta retroalimentación existen grandes lagunas, se sabe que: en las ratas hipertiroideas, la liberación de TRH está disminuida en un 30-40%, mientras que el hipotiroidismo inducido por tiroidectomía o la administración de drogas tirostáticas se asocia con un aumento en el contenido hipotalámico del ARNm de pro-TRH (de Greef, 1992). No obstante, el tratamiento con MMI, que induce también un aumento del contenido de ARNm de pro-TRH en el hipotálamo, no altera la liberación de TRH a nivel de este órgano (Rondeel, 1988; Rondeel, 1990), y sólo cuando el hipotiroidismo se induce mediante tiroidectomía o la administración de PTU, se aumenta moderadamente el nivel de TRH en la sangre portal hipofisal (Rondeel, 1992).

1.1.2.2.2. Otros factores hipotalámicos.

1. Somatostatina (SRIH).

La somatostatina inhibe la secreción de GH, pero también la liberación de TSH. En la rata, la somatostatina no afecta a los niveles basales plasmáticos de TSH, pero sí inhibe la respuesta de TSH a TRH de manera dosis-dependiente, e incluso, se ha sugerido que *in vivo*, parte de la retroalimentación negativa que ejercen las hormonas tiroideas está mediada por el aumento de la sensibilidad de las células tirotropas a la somatostatina hipotalámica (Spira, 1986).

En situaciones de hipotiroidismo inducidas por la administración de PTU se ha visto que se duplica la capacidad de los extractos hipotalámicos para inactivar a la SRIH, y se disminuye en el mismo grado el contenido hipotalámico de SRIH (Berelowitz, 1980).

2. Neurotensina (NT).

La neurotensina afecta a los niveles plasmáticos de TSH; algunos estudios sugieren que una inyección intravenosa de NT eleva la concentración plasmática de TSH en la rata, mientras que en otros una inyección de este factor en el tercer ventrículo de la rata no cambia los niveles circulantes de TSH, o incluso, los disminuye (Vijayan, 1980).

3. Momoaminas.

En la rata, la norepinefrina estimula la secreción de TSH por la activación de los receptores α , mientras que la dopamina inhibe su secreción (Spira, 1986).

1.1.2.2.3. Hormonas tiroideas.

La administración de hormonas tiroideas, como se ha mencionado, inhibe los niveles plasmáticos de TSH basal y la estimulación de la liberación de la TSH inducida por TRH, como consecuencia de la reducción del número de receptores de TRH en células que secretan hormona tiroestimulante.

1.1.3. Metabolismo y acciones de las hormonas tiroideas.

1.1.3.1. Metabolismo.

El metabolismo de las hormonas tiroideas en tejidos extratiroideos involucra a una serie de reacciones enzimáticas complejas como son: desyodación, conjugación y/o desaminación y descarboxilación oxidativa. No obstante, la principal ruta metabólica es la desyodación, que está mediada por una familia de enzimas presentes en la glándula tiroidea y en tejidos extratiroideos (Leonard, 1990). Se han identificado dos reacciones generales de desyodación: pérdida de un átomo de yodo del anillo fenólico (externo), recibe el nombre de 5'-desyodación, y si el átomo de yodo se libera del anillo tirosilo (interno) se denomina 5-desyodación. La 5'-desyodación se considera como una ruta de activación porque genera directamente el metabolito activo (T_3) a partir de la "prohormona" inactiva (T_4) y, por el contrario, la 5-desyodación es una ruta de inactivación porque da lugar a un metabolito biológicamente inerte (rT_3). Se conocen tres tipos de desyodasas:

1. Desyodasa tipo I: Está presente en tejidos tiroideos y extratiroideos (riñón, hígado, pulmón, músculo, piel) y posee principalmente actividad 5'-desyodasa, aunque en menor medida también desyoda el anillo tirosilo (actividad 5-D), genera la mayor parte de la T_3 liberada a la circulación.

2. Desyodasa tipo II: Sólo posee actividad 5'-desyodasa, se halla presente en el cerebro, pituitaria y tejido adiposo marrón, y es la responsable de la mayoría de la T_3 producida a partir de la T_4 dentro de las células.

3. Desyodasa tipo III: Tiene sólo actividad sobre el anillo tirosilo y se expresa en el córtex cerebral y piel de ratas adultas y en placenta y otros tejidos fetales (St Germain, 1994).

La importancia fisiológica de la desyodación sobre la economía de las hormonas tiroideas es grande, y así, diversos estudios en ratas neonatales y fetos han demostrado que, en situaciones de déficit de hormonas tiroideas, se favorece la conversión de T_4 a T_3 en órganos como el cerebro, lo que constituye un mecanismo

de protección muy eficaz, especialmente durante periodos críticos del desarrollo como el perinatal, en el que el desarrollo del cerebro depende en gran medida de las hormonas tiroideas (Ruiz de Oña, 1988; Aláez, 1992b; Porterfield, 1993).

1.1.3.2. Acciones biológicas de las hormonas tiroideas.

La primera acción reconocida de las hormonas tiroideas fue su efecto en la generación de calor, que se refleja en un aumento del consumo de oxígeno y del metabolismo basal; así, activan los mecanismos oxidativos mitocondriales en hígado, riñón, músculos y corazón (van Hardeveld, 1986).

Las hormonas tiroideas intervienen también en la regulación de procesos metabólicos como la síntesis y degradación de proteínas, tanto estructurales como enzimáticas (α -glicerolfosfato deshidrogenasa mitocondrial, enzima málico...), incrementan el metabolismo lipídico, afectando más a la degradación que a la síntesis, intervienen en la regulación del metabolismo de carbohidratos (aumentan la gluconeogénesis y la utilización de la glucosa) y también, participan en la síntesis y el mantenimiento del nivel adecuado de algunas vitaminas, y en su transformación en cofactores enzimáticos (Freake, 1995; Venditti, 1997).

Además, entre los efectos que ejercen cabe destacar el papel que juegan en procesos de crecimiento, diferenciación y desarrollo, y entre ellos cabe citar la metamorfosis de los anfibios (Nikodem, 1990) o su actuación directa sobre el gen de GH (Yaffe, 1984).

La falta de hormonas tiroideas durante el desarrollo de los mamíferos lleva asociada múltiples alteraciones en el crecimiento y maduración de muy diversos tejidos. En etapas tempranas, en el sistema nervioso central, durante el periodo crítico del desarrollo embrionario y perinatal, la falta de hormonas tiroideas puede producir daños severos e irreversibles (Eayrs, 1968 ; Timiras, 1989), que en el hombre conducen a un retraso mental profundo (Dobbing, 1977; Morreale de Escobar, 1983; Legrand, 1986). Este periodo, en el que el cerebro es muy vulnerable se denomina crítico, coincide con una etapa de mitosis activas y diferenciación de las células nerviosas, y en el hombre se sitúa entre el final de la gestación y los 2 años de edad.

1.1.4. Interacción entre hormonas tiroideas e insulina.

Las hormonas tiroideas y la insulina ejercen acciones metabólicas contrarias, no obstante, aún no se conoce bien el efecto que ejercen la T_3 y la T_4 sobre el

metabolismo de la insulina. En trabajos anteriores, se ha mostrado que el hipertiroidismo puede aumentar (Beer, 1989; O'Meara, 1993), disminuir (Ikejiri, 1978; Escrivá, 1981), o incluso, no alterar (Taylor, 1985) los niveles de insulina. El hipotiroidismo también se muestra como un cuadro controvertido, aunque aún menos estudiado que el hipertiroidismo.

En el hombre, el hipotiroidismo usualmente se presenta con unas concentraciones basales de insulina normales y, raramente disminuidas (Lenzen, 1984). Por otro lado, el hipotiroidismo experimental puede ir acompañado de una variabilidad similar a la del hipertiroidismo en cuanto a los niveles plasmáticos de insulina. Jolin y col. (1970) observaron en la rata que la inducción del hipotiroidismo mediante la tiroidectomía o la administración de ciertos goitrógenos (ClO_4^- , ReO_4^- , MMI) disminuían los valores circulantes de insulina frente a los controles, mientras que si se le administraba a las ratas fármacos antitiroideos como propiltiouracilo (PTU) y SCN^- (isotiocianato), se producía un aumento en la insulinemia de estos animales respecto a sus controles. Montes y col. (1977) indujeron en la rata un hipotiroidismo experimental mediante tiroidectomía, e inicialmente observaron, a los 5, 10 y 15 días después de la operación, que los niveles circulantes de insulina no se alteraban, mientras que si se prolongaba más el déficit de las hormonas tiroideas, los valores plasmáticos de esta hormona disminuían respecto a sus animales control. La terapia de reemplazamiento con dosis fisiológicas de T_4 , al igual que la administración de GH, normalizó los bajos niveles de insulina de estos animales hipotiroideos (Jolin, 1970; Montes, 1977).

A pesar de que la velocidad de secreción de la insulina puede estar aumentada (Lenzen, 1984) o no alterada (O'Meara, 1993) en situaciones de exceso y déficit de hormonas tiroideas, parece que en los pacientes hipertiroides la respuesta de la insulina a la administración de glucosa intravenosa u oral está muy exagerada (Ahrén, 1981; O'Meara, 1993), mientras que el hipotiroidismo produce un aumento, una disminución o no altera dicha respuesta.

La velocidad de desaparición de la insulina aumenta por el exceso de hormonas tiroideas (Moggetti, 1994) y disminuye por el déficit (Lenzen, 1984), con lo que la duración de la acción de la hormona se ve alterada por el estado tiroideo.

Estas alteraciones en la secreción de la insulina podrían hacer pensar en cambios a nivel de los islotes pancreáticos, y así, se ha observado que la hipotrofia

de los islotes parece ser un efecto directo de las hormonas tiroideas sobre el páncreas endocrino que resulta de unos cambios degenerativos tras situaciones de hipertiroidismo prolongado (Lenzen, 1976; Lenzen, 1978). En este sentido también, Morovat y col. (1998) apuntan que los altos niveles plasmáticos de insulina encontrados en cerdos jóvenes tiroidectomizados pueden ser debidos, al menos en parte, a un descenso en la sensibilidad de los tejidos a esta hormona, como previamente se había sugerido en situaciones de hipertiroidismo (Ahrén, 1981; Müller, 1988) e hipotiroidismo (Jayendra, 1972; Katsilambros, 1972).

Como hemos visto, el estado tiroideo afecta a la secreción normal de la insulina, así como a su metabolismo (Foss, 1990) y contenido pancreático (Katsilambros, 1972), lo que conduce a una modificación de la homeostasis glucídica que podría llevar al desarrollo de una diabetes (más comúnmente en el hipertiroidismo que en el hipotiroidismo).

1.2. FACTORES DE CRECIMIENTO SIMILARES A LA INSULINA (IGFs).

Los factores de crecimiento similares a la insulina ("insulin-like growth factors") IGF-I y II son polipéptidos similares estructuralmente a la proinsulina, de hecho, aunque son codificados por genes individuales, se encuentran relacionados ancestralmente con el gen de la insulina y poseen efectos metabólicos similares a esta (Humbel, 1990). Se sintetizan en numerosos tejidos sobre los que ejercen acciones a nivel de los procesos de proliferación y diferenciación, tanto locales (auto y paracrinas) como endocrinas por la unión a receptores específicos de membrana.

En la sangre y otros fluidos extracelulares, los IGFs forman complejos con unas proteínas específicas ("insulin-like growth factor-binding proteins", IGFBPs), que constituyen una familia de péptidos relacionados estructuralmente entre sí.

1.2.1. Estructura, síntesis y transporte.

1.2.1.1. Estructura.

Los IGFs son polipéptidos de cadena única de 70 y 67 aminoácidos (IGF-I y II, respectivamente), con tres puentes disulfuro, y comparten entre sí una homología del 62%, y con la proinsulina del 42% (Sara, 1990). En la estructura de estas proteínas se han caracterizado varios dominios: A y B (similares a la insulina), C (análogo al péptido de conexión de la proinsulina) y D (no está presente en la insulina).

La estructura primaria de los IGFs está altamente conservada entre especies. El IGF-I de rata difiere del humano en tres aminoácidos, y el IGF-II tan solo muestra cuatro sustituciones conservativas respecto al péptido humano (Daughaday, 1989). No obstante, en el suero humano se han identificado variantes de estos péptidos de distinta longitud, se han detectado formas truncadas y de alto peso molecular de ambos IGFs, probablemente generadas por un procesamiento post-traduccional, dado que no se han identificado ARNm que codifiquen para esas primeras formas.

Los genes que codifican para IGF-I y II en el hombre y en la rata comparten numerosos elementos estructurales.

El gen que codifica para el IGF-I está compuesto por 6 exones separados por 5 intrones de un tamaño de 1.9 a 50Kb. Los exones 1 y 2 codifican el péptido señal y una región 5' no traducida; estos exones sufren un acoplamiento alternativo con el exón 3 que codifica el resto del péptido señal y la mayoría del dominio B. El exón 4 codifica el resto del dominio B, C, A y D y los 16 primeros aminoácidos del péptido E. El exón 5 codifica parte del péptido E, y el exón 6 el resto del péptido E y una secuencia de la región 3' no traducible (Lund, 1994). Este gen está regulado por dos promotores, y como consecuencia de diferentes empalmes alternativos y de quien lidera la transcripción, se generan dos transcritos de IGF-I: ARNm de IGF-Ia (carece de la secuencia del exón 5 que codifica para el péptido E) y ARNm de IGF-Ib (contiene las 52 bases del exón 5 que codifican para el péptido E) (Hall, 1992).

El gen de IGF-II consta de 9 exones y excepto los exones 7, 8 y parte del 9, que codifican para el péptido maduro, son exones no traducidos. Este gen está controlado por cuatro promotores y, como consecuencia de la activación diferencial de esos promotores y de los diferentes emplames alternativos se generan tres transcritos de IGF-II.

1.2.1.2. Síntesis y transporte.

La expresión de los genes de los IGFs es muy ubicua, se ha detectado su ARNm en diversos tejidos como: hígado, pulmón, hipófisis, bazo, riñón, corazón, músculo esquelético, ovario, útero, testículo, cerebro, glándula mamaria y otros (Hall, 1992 y Lund, 1994), en medios condicionados de muchas células (Humbel, 1990) y en la sangre. También se ha descrito la presencia de IGF-I y II o ambos en otros líquidos corporales como orina, linfa, líquido cefalorraquídeo, semen, saliva, leche o líquido folicular. No obstante, el mayor productor de IGFs es el hígado, que

secreta más del 90% del IGF total circulante (Möller, 1991).

Los IGFs, a diferencia de la insulina, circulan por la sangre unidos, prácticamente en su totalidad, a unas proteínas transportadoras específicas (IGFBPs) formando dos complejos de unos 150 y 50kDa, aproximadamente. Estas proteínas se encuentran presentes también en el espacio extracelular y pueden controlar la distribución tisular o celular de los IGFs, modificando su acción y su biodisponibilidad; también pueden participar en la unión de los IGFs a su receptor.

1.2.2. Acciones biológicas de los IGFs.

1.2.2.1. *In vitro*.

Los efectos de los IGFs *in vitro* pueden ser a corto plazo, como las acciones metabólicas sobre las proteínas y carbohidratos, o a largo plazo, como las acciones sobre el crecimiento y la diferenciación celular.

1. Efectos sobre la progresión del ciclo celular: El IGF-I funciona como un factor de progresión del ciclo celular junto con los factores competentes que lo inician y capacitan a las células para responder a los factores de progresión.

Se ha visto que células quiescentes en G_0 pueden ser inducidas a entrar en G_1 por los llamados factores competentes (PDGF y FGF); sin embargo, el tratamiento de estas células con dichos factores de competencia y otros de progresión, como el IGF-I, permite el avance hacia G_1 y la continuación del ciclo celular, produciéndose la síntesis de ADN y la proliferación celular (Jones, 1995).

2. Efectos sobre la proliferación celular: Los IGFs poseen una actividad mitogénica sobre una gran variedad de células (fibroblastos, condrocitos, osteoblastos, células foliculares tiroideas, células neuronales, adipocitos, líneas tumorales...) de ahí que participen en el crecimiento del embrión, feto y neonato, en fenómenos de hipertrofia fisiológica o compensadora de ciertos órganos, en reparación de heridas en nervio, músculo y células endoteliales (Hunziker, 1994; McCarthy, 1994).

3. Efectos sobre la muerte celular: Los IGFs poseen la capacidad de inhibir la muerte celular por apoptosis en ciertas células (hematopoyéticas y células de carcinoma humano de pecho MCF-7); sin embargo, morfológicamente las células mueren por necrosis más que por apoptosis, y en esos casos, los IGFs no han demostrado aumentar la supervivencia celular de otros tumores (MDA-231, HEP-2 y KB).

4. Efectos sobre la diferenciación celular: Los IGFs estimulan la diferenciación de los mioblastos, osteoblastos, adipocitos y oligodendrocitos (Hunziker, 1994; McCarthy, 1994); además, intervienen en la maduración de la función testicular y ovárica, inducen la eritropoyesis, estimulan el crecimiento de las neuritas y están implicados en la sinaptogénesis.

5. Efectos sobre la función celular: Los IGFs regulan la secreción hormonal de un numeroso tipo de células.

IGF-I y II estimulan la síntesis y secreción hormonal de las células ováricas y muestran efectos sinérgicos en combinación con FSH y estrógeno, aumentan el número de receptores de ACTH y en cultivos de células somatotropas de pituitaria, inhiben la secreción de GH (Melmed, 1986). También poseen importantes efectos sobre el sistema inmune: potencian la función citotóxica de las células T (Clark, 1997).

1.2.2.2. *In vivo*.

La administración de IGFs provoca una serie de efectos metabólicos a corto plazo y, crecimiento a largo plazo.

1. Efectos de la administración de IGFs en animales: En ratas neonatales, la infusión de IGF-I provoca hipoglucemia por la estimulación de la captación de glucosa en la periferia, pero sin afectar a su producción hepática, y no altera la concentración de los ácidos grasos libres al contrario que la insulina. Recupera la función renal y aumenta las proteínas corporales totales y, a pesar de que no incrementa el peso de la carcasa, sí aumenta el del bazo, riñón, timo e intestino (Gargosky, 1994).

A nivel hormonal, la administración de IGF-I disminuye los niveles de GH, pero aumenta el de catecolaminas (Glasscock, 1992).

Los efectos de las altas concentraciones de IGF-II no alteran el peso corporal ni la longitud de los animales control, aunque la concentración sérica de IGF-I disminuye (Glasscock, 1992). Por el contrario, en las ratas hipofisectomizadas, aumenta su peso y longitud a la vez que desciende la urea en el suero (Humbel, 1990).

2. Efectos de la administración de IGF-I en humanos: Se recogen en la Tabla I:

Tabla 1.- Efectos de la administración de IGF-I *in vivo* en humanos.

| FUNCION | EFECTO DEL IGF-I |
|------------------------------|--|
| Metabolismo de la glucosa | ↑ captación de glucosa ↓ producción hepática de glucosa (humanos) ↑ sensibilidad aparente a la insulina Hipoglucemia (especialmente con administración iv) |
| Metabolismo lipídico | ↓ cetonas séricas ↓ ácidos grasos libres séricos (humanos) ↓ triglicéridos |
| Anabolismo proteico | ↑ síntesis proteica ↓ excreción de nitrógeno ↑ proteínas corporales totales ↑ peso corporal/órgano, especialmente de timo, riñón, bazo e intestino Mejora la cicatrización |
| Función renal | ↑ velocidad de filtración glomerular ↑ flujo plasmático renal ↑ velocidad de recuperación de un fallo renal agudo isquémico |
| Hormonas contrarregulatorias | ↓ GH ↓ Glucagón ↑ Catecolaminas |
| Crecimiento lineal | ↑ en hipopituitarismo y sujetos insensibles a GH |
| Miscelánea | Taquicardia, edema periférico, aumento de las parótidas y pérdida de sensibilidad |

(Jones, 1995)

1.2.2.3. Acciones autocrinas, paracrinas y endocrinas.

Aunque el hígado es la principal fuente de IGFs, muchos órganos expresan estos factores (Hall, 1992; Lund, 1994). La ubicuidad de los IGFs sugiere unas acciones autocrinas/paracrinas que pueden ser muy relevantes para la diferenciación y proliferación celular.

La importancia de estos efectos locales es más evidente en aquellos órganos y tejidos con mayor expresión y concentración de IGFs como el hígado, riñón, testículo, células de la granulosa y sistema nervioso central, mientras que las acciones endocrinas participarían en el crecimiento corporal global integrado (Daughaday,

1989). No obstante, la importancia relativa de cada modo de acción varía de un tejido a otro y con la etapa de desarrollo.

En la etapa fetal, se ha sugerido un papel predominante de las acciones auto y paracrinas sobre las endocrinas (Daughaday, 1989). En el feto, los genes de IGF-I y II se expresan en muchos tejidos, pero sus niveles circulantes son bajos (Lund, 1986). Por otro lado, en la etapa postnatal, existe la posibilidad de una interacción entre las acciones auto/paracrinas y endocrinas de IGF-I, ya que tras el nacimiento aumentan progresivamente los niveles de IGF-I a la vez que el número de receptores hepáticos de GH, mientras la expresión del gen de IGF-I se reduce (Rotwein, 1993).

1.3. PROTEÍNAS TRANSPORTADORAS DE IGFs (IGFBPs).

1.3.1. Estructura, síntesis y regulación.

1.3.1.1. Estructura.

Los IGFs circulan por el plasma unidos a una familia de proteínas transportadoras relacionadas estructuralmente, las IGFBPs. Se han clonado y secuenciado siete polipéptidos (IGFBP-1 a 7), pero sólo se han estudiado seis (IGFBP-1 a 6), y 4 de ellos (IGFBP-1 a 4) se encuentran en el suero en cantidades importantes (Rechler, 1998). Se trata de unas proteínas de un tamaño similar (201 a 289 aminoácidos) y de un peso molecular entre 21.5 y 31.4kDa.

La analogía más destacada respecto a la estructura de estos péptidos es la conservación de 18 residuos de cisteína tanto en el extremo carboxi como en el amino terminal. Además, en el extremo C-terminal de todas las IGFBPs existe una secuencia conservada arg-gly-asp que parece ser la secuencia mínima requerida en muchas proteínas de matriz extracelular para unirse a receptores de membrana (Rosenfeld, 1990).

A pesar de estos aspectos similares, hay varias diferencias entre las secuencias de aminoácidos de las IGFBPs, como el hecho de que las secuencias espaciadoras existentes entre los residuos de las cisteínas no están bien conservadas, la variabilidad en la secuencia del péptido señal o la diferente glicosilación de las IGFBPs.

1.3.1.2. Síntesis.

Las IGFBPs son producidas por una gran variedad de tejidos y se encuentran en varios fluidos biológicos.

En el suero, las IGFBPs circulan en forma de dos complejos, uno de 150-

200kDa que contiene en cantidades equimolares la IGFBP-3 (GH dependiente) y una proteína (subunidad ácido-lábil, ALS), y el complejo de 30kDa que contiene otras formas de IGFbps (IGFBP-1 y 2).

Se han hallado también diversas formas de IGFbps en numerosos líquidos corporales: linfa, leche, líquido cefalorraquídeo, líquido amniótico, plasma seminal, líquido folicular, humor acuoso y vítreo, orina, así como en el medio condicionado de numerosos cultivos celulares (Rosenfeld, 1990; Rajaram, 1997). En la leche humana, por ejemplo, se han encontrado IGFBP-1, 2 y 3, mientras que en la de rata también está presente la IGFBP-4; no obstante, en ambos casos, la proteína predominante, como en el suero, es la IGFBP-3. En el fluido cerebroespinal, sin embargo, la forma predominante es IGFBP-2, al igual que en la linfa, e IGFBP-1 es la proteína mayoritaria en el líquido amniótico.

Las IGFbps también se sintetizan en múltiples órganos y tejidos (Straus, 1991; Babajko, 1993; Gosteli-Peter, 1994); IGFBP-1 se expresa en hígado, placenta o endometrio; IGFBP-2 abunda en hígado, riñón, intestino y pulmón, pero donde mantiene unos niveles altos es en el cerebro (plexos coroideos). IGFBP-3, por su parte, se expresa en hígado, placenta y riñón, mientras que el ARNm de IGFBP-4 se encuentra de manera abundante en hígado y los de IGFBP-5 y 6, en riñón y pulmón, respectivamente.

1.3.1.3. Regulación.

1.3.1.3.1. Variaciones diurnas.

Los valores plasmáticos de IGFBP-1 están sujetos a variaciones diurnas que se relacionan con los niveles de insulina; las cifras circulantes de esta proteína transportadora son muy bajas por la tarde y a media noche, y muy altas por la mañana; además, parece ser que este aumento coincide con un incremento en los niveles de IGF-I (Holly, 1988).

IGFBP-2 y 3 son más estables y no muestran variaciones diurnas ni están sujetas a cambios postprandiales.

1.3.1.3.2. Nutrición.

El efecto de la restricción proteico-calórica altera los niveles séricos y de expresión de las IGFbps, incluso en los fetos de madres ayunadas (Straus, 1991). En las ratas neonatales, la malnutrición aumenta la expresión de IGFBP-1 y 2 en hígado, aunque la realimentación reduce los niveles del ARNm de ambas proteínas a los

valores control. La expresión hepática de IGFBP-3 disminuye ligeramente con la malnutrición, y la realimentación eleva sus niveles por encima de los control (Rivero, 1995; Goya, 1996).

1.3.1.3.3. Ejercicio.

En el hombre adulto, el ejercicio se acompaña de un aumento en los niveles circulantes de IGFBP-1 y 3 y un descenso en los niveles de insulina e IGF-I (Rajaram, 1997).

1.3.1.3.4. Ontogenia.

Durante el periodo fetal, IGFBP-1 y 2 son las proteínas transportadoras predominantes en el hombre y la rata, se conservan altos niveles durante el periodo neonatal, disminuyendo progresivamente a la vez que empieza a predominar IGFBP-3 que es la abundante en adulto (Babajko, 1993).

En la pubertad, IGFBP-3 alcanza un pico, y disminuye durante el periodo adulto. Por el contrario, IGFBP-1 y 2 muestran unos niveles altos en el nacimiento y la senescencia y bajos durante la pubertad (Rosenfeld, 1990).

1.3.1.3.5. Hormonas.

El nivel de influencia de las hormonas sobre los valores de las IGFbps depende de: la magnitud de cambio en la producción de la correspondiente proteína transportadora en el/los tejido/s diana/s y de la contribución de ese/esos tejido/s en la secreción de la proteína transportadora y, además, las hormonas pueden afectar a los niveles séricos de una o más proteínas transportadoras. La insulina, por ejemplo, parece ser la principal reguladora de la producción hepática de IGFBP-1, mientras que la GH parece alterar los niveles circulantes de IGFBP-3 (aumenta los niveles séricos de IGFBP-3 e induce la producción de ALS), al igual que los glucocorticoides (disminuyen los niveles de IGFBP-1 y 2, pero aumentan los de IGFBP-3) (Luo, 1990). Las hormonas también regulan la expresión de las proteínas transportadoras por uno o múltiples mecanismos.

1.3.2. Tipos de IGFbps y acciones biológicas.

Los IGFs no sólo están presentes en la circulación, sino también en el espacio extracelular, unidos a las IGFbps (Baxter, 1993; Jones, 1995; Rechler, 1998). Las IGFbps ligan IGF-I e IGF-II, pero no insulina y así, pueden controlar su distribución tisular o celular, participar en su unión a sus receptores o regular su acción por la degradación de estas IGFbps por parte de unas proteasas (Fowlkes, 1997).

1.3.2.1. Tipos de IGFbps.

1. IGFBP-1: Es una proteína de 25kDa que se sintetiza de manera predominante en el hígado. Presenta una forma desfosforilada, con baja afinidad por IGF-I, que se cree que potencia la acción de IGF-I, y otra fosforilada, que inhibe las acciones mitogénicas de este factor de crecimiento. Además, IGFBP-1 se comporta como inhibidor de IGF-I cuando este factor se presenta en altas concentraciones, pero actúa como estimulador si está presente en el medio de cultivo junto con bajos niveles de plasma pobre en plaquetas (Jones, 1995; Rechler, 1998).

Las principales señales reguladoras de la IGFBP-1 son metabólicas; diversos estudios han demostrado que la combinación insulina/glucosa es el mayor determinante de sus niveles. Las concentraciones circulantes de IGFBP-1 están elevadas en el ayuno, la malnutrición y la diabetes mellitus de ambos tipos (Cotterill, 1988; Suikkari, 1988; Yeoh, 1988; Straus, 1994; Rivero, 1995; Goya, 1996). Por el contrario, la realimentación o la ingesta de carbohidratos y la infusión de insulina durante el "clamp" de glucemia en pacientes de diabetes tipo II o el tratamiento de las ratas diabéticas con insulina se acompaña de un rápido descenso de los niveles de IGFBP-1 (Cotterill, 1988; Suikkari, 1988; Yeoh, 1988; Lewitt, 1994; Goya, 1996). Este patrón de regulación es similar al de las hormonas contrarreguladoras de la insulina, como el glucagón, lo que ha hecho que se sugiera que la IGFBP-1 podría desempeñar un papel contrarregulador en el mantenimiento de la homeostasis glucídica (Lewitt, 1991; Baxter, 1995). Además, en el suero humano, IGFBP-1 muestra, a diferencia del resto de las proteínas transportadoras bien caracterizadas, un ritmo circadiano marcado que no depende del estatus secretor de GH, sino que está regulado por el metabolismo, probablemente por la secreción de insulina (Holly, 1988).

En la rata, se ha descrito una regulación similar en ciertos estados catabólicos como la malnutrición y la diabetes; en ambas situaciones, los niveles de insulina y GH son bajos, pero se produce un incremento en los niveles hepáticos del ARNm de IGFBP-1, lo que sugiere que, al menos durante la etapa neonatal en que la GH no ha establecido totalmente sus conexiones neuroendocrinas, es la insulinemia la responsable del aumento en los transcritos de IGFBP-1 (Rivero, 1995; Goya, 1996).

2. IGFBP-2: Esta proteína de bajo peso molecular (31-36kDa) ha sido menos estudiada que la IGFBP-1. Su acción predominante es la inhibición de la acción de

IGF-I e IGF-II, aunque en ciertos tipos de células puede comportarse como un estimulador débil de la acción del IGF-I (Baxter, 1993; Jones, 1995; Rechler, 1998).

A pesar de que los niveles circulantes de IGFBP-2 son menos sensibles a los cambios metabólicos agudos que IGFBP-1, se ha descrito una regulación por el estado nutricional. En situaciones de malnutrición, en la rata, se produce un aumento tanto a nivel sérico como de expresión del ARNm hepático de esta proteína (Straus, 1994; Rivero, 1995); por el contrario, la realimentación y el tratamiento de los animales diabéticos con insulina se acompaña de un descenso en las concentraciones circulantes y los niveles de ARNm hepático de IGFBP-2 (Goya, 1996), lo que ha llevado a sugerir a ciertos autores un importante papel en la regulación de esta proteína por parte de los nutrientes (Thissen, 1994).

3. **IGFBP-3:** Es la proteína transportadora predominante en el suero de rata adulta, y su peso molecular oscila entre 38 y 43kDa dependiendo del número de sitios glicosilados. En la circulación, la IGFBP-3 se asocia con una proteína de 80kDa llamada ALS ("acid-labile subunit") y una molécula de IGF para formar un complejo de 150kDa. Este complejo consta de IGFBP-3 e IGF-I y II en una proporción equimolecular, lo que sugiere que la mayor parte de esta proteína transportadora está saturada en el suero (Rajaram, 1997).

La expresión tisular de IGFBP-3 es muy ubicua; los tejidos con mayor abundancia de esta proteína transportadora son hígado, riñón, placenta, útero, ovario, testículo, bazo, páncreas, estómago y corazón (Rajaram, 1997).

Existen evidencias que demuestran que IGFBP-3 puede potenciar e inhibir las acciones de IGF-I *in vitro*, indicando que esta proteína transportadora puede ser un importante modulador de las acciones de IGF-I *in vivo* (Gargosky, 1994). La presencia de IGFBP-3 en suero puede tener también un papel muy importante aumentando la vida media de los IGFs, sin olvidar que esta proteína transportadora está sujeta a una regulación por la acción de ciertas proteasas (Fowlkes, 1997).

El principal regulador hormonal de IGFBP-3, y por consiguiente del complejo ternario, es la GH. Se ha observado que los niveles circulantes y de expresión hepática de esta proteína transportadora son dependientes de GH, dado que ambos valores se reducen tras la hipofisectomía de las ratas y aumentan después del tratamiento con GH (Glasscock, 1991; Gargosky, 1994; Gosteli-Peter, 1994). No obstante, estudios más recientes han mostrado que el tratamiento con insulina de ratas

deficientes en GH puede aumentar los niveles circulantes de esta proteína transportadora (Butler, 1996). Además, se ha observado que el ayuno prolongado, la subnutrición y la diabetes provocada en la rata por la administración de STZ causan una reducción de los valores séricos de IGFBP-3 (Rivero, 1995).

4. IGFBP-4: Es una proteína no glicosilada de 25kDa y 32-36kDa que fue aislada por primera vez en células de osteosarcoma, aunque está presente en otras líneas celulares donde se han descrito distintas isoformas (Rajaram, 1997). Se trata de una proteína fundamentalmente inhibidora de las acciones de los IGFs, lo que protege a las células de una sobrestimulación por parte de los factores de crecimiento, o permite una activación de rutas de señales transmembrana alternativas que son inhibidas por la exposición a los IGFs (Rechler, 1998).

5. IGFBP-5: Esta proteína se purificó primero a partir de suero de rata adulta, y presenta la capacidad de unirse a la matriz extracelular. Su principal acción es potenciar el efecto de los IGFS (Jones, 1995).

6. IGFBP-6: Se expresa en múltiples tejidos y en suero, y su principal acción es la inhibición de los efectos del IGF-II.

1.3.2.2. Acciones biológicas.

Las IGFBPs parecen modular las acciones de los IGFs, dado que regulan su disponibilidad en los tejidos diana. En este sentido, los niveles séricos de las proteínas transportadoras pueden jugar un importante papel regulando las acciones endocrinas de los IGFs.

1. Modular las acciones de los IGFs: La actividad de los IGFs es neutralizada como consecuencia de su unión a las IGFBPs, de ahí que se diga que estas proteínas transportadoras poseen una función puramente inhibidora (Jones, 1995; Rechler, 1998). No obstante, la ausencia de las IGFBPs aumentaría el efecto de los IGFs y desequilibraría la homeostasis glucídica, puesto que los IGFs no parecen estar controlados por la glucemia. Sin embargo, se han descrito varios mecanismos capaces de liberar a los IGFs de sus proteínas transportadoras, principalmente mediante el descenso de la afinidad de los factores de crecimiento por sus IGFBPs. Este mecanismo incluye la unión de las IGFBPs a moléculas de la matriz extracelular (Rajaram, 1997), fosforilación de las proteínas transportadoras (Coverley, 1995) y degradación proteolítica de las IGFBPs (Fowlkes, 1997).

2. Aumentar la semivida de los IGFs: Las IGFBPs pueden facilitar las

acciones endocrinas de los IGFs por el aumento de su vida media en la circulación. Esta estabilización de los IGFs depende fundamentalmente de la IGFBP-3, y aunque otras proteínas transportadoras, como IGFBP-1 y 2 también participan sobre todo en periodos inmaduros, desempeñan un papel menor porque presentan unas vidas medias más cortas que la proteína transportadora de alto peso molecular (Rosenfeld, 1990). Así pues, la IGFBP-3 es la proteína que altera la relación de IGFs libres y ligados, lo que indirectamente prolonga la semivida de estos factores de crecimiento o los protege de su rápida degradación, y por tanto, a la vez, regula sus acciones metabólicas.

3. Controlar el transporte de los IGFs desde el espacio vascular: Para obtener la respuesta que estimula el crecimiento por parte de los IGFs, se necesita que estos factores séricos sean transportados desde los vasos al líquido extracelular, y para ello, se requiere que las IGFbps, que llevan unidos a ellas IGFs, sean degradadas o puedan cruzar la barrera endotelial.

La mayor parte de los IGFs circula unida al complejo de 150kDa (ALS-IGFBP-3-IGF) lo que hace que sea considerado como un reservorio de IGFs y cobre gran importancia en el transporte de los factores de crecimiento fuera del compartimento vascular (Rajaram, 1997). Así pues, para que esta salida se produzca, y dado que el complejo no es capaz de atravesar el endotelio vascular, se necesita la presencia de unas proteínas capaces de reducir la afinidad de la IGFBP-3 por los IGFs (Fowlkes, 1997), o también se ha apuntado hacia una reducción en la afinidad para la formación del complejo por la unión a esta proteína transportadora de alto peso molecular de glucosaminoglucanos presentes en la superficie de las células endoteliales (Jones, 1995).

El porcentaje de IGFs que no circulan unidos a la IGFBP-3 lo hacen unidos a la fracción de 30kDa que sí atraviesa la barrera capilar, por ello la abundancia de estas proteínas en periodos inmaduros parece estar dirigida a facilitar el paso del endotelio a los IGFs en momentos de desarrollo.

1.4. FACTORES ENDOCRINOS QUE REGULAN EL DESARROLLO: HORMONAS TIROIDEAS E IGFs, SU INTERACCION.

Los niveles circulantes de los IGFs, como hemos venido viendo, están influenciados por multitud de factores, entre los que se incluyen GH, edad, nutrición,

sepsis, hormonas tiroideas y esteroides (Daughday, 1989; Sara, 1990), y están muy implicados regulando el desarrollo en etapas inmaduras de los mamíferos. La importancia de las hormonas tiroideas sobre el SNC es sobradamente conocida y ha sido ya someramente expuesta. Por ello, el estudio de la interacción de estos factores endocrinos con las hormonas tiroideas tiene una gran relevancia en estudios perinatales.

1.4.1. Interacción entre las hormonas tiroideas y el axis IGFs/IGFBPs.

En el hombre, el hipotiroidismo disminuye los niveles circulantes de IGF-I, y también su actividad biológica (Chernausk, 1983; Cavaliere, 1987; Miell, 1993). En la rata, este descenso del IGF-I aparece asociado a una disminución de la expresión hepática del gen de este factor de crecimiento (Burstein, 1979; Gallo, 1991). Por el contrario, los pacientes hipertiroideos muestran unos valores circulantes de IGF-I altos o normales junto con una baja actividad biológica (Westermarck, 1988; Miell, 1993). Sin embargo, estudios más recientes con ratas han demostrado que el hipertiroidismo no altera los niveles séricos totales de IGF-I, pero sí disminuye sus valores libres (Frystyk, 1995).

Entre el periodo adulto y el neonatal existen diferencias fundamentales en cuanto a la regulación del axis IGFs/IGFBPs. Se ha establecido que, en periodos fetales, la secreción de IGFs en hígado es independiente de GH, y en la etapa neonatal de la rata, esta secreción parece regida también por un equilibrio insulina/nutrientes de forma independiente de GH (Rivero, 1995; Goya, 1996) finalmente, en periodo adulto, aunque es indudable que la hormona de crecimiento es el regulador principal (Straus, 1994; Thissen, 1994), el equilibrio insulina/nutrientes también parece jugar un papel (Goya, 1996; Goya, en prensa en Life Sci.). En este contexto, las acciones de las hormonas tiroideas sobre la secreción de los IGFs estarán, sin duda, en adulto, mediadas por la GH, ya que es conocido que las hormonas tiroideas son necesarias para la expresión normal de la GH *in vitro* (Shapiro, 1978; Geary, 1989; Ezzats, 1991; Ceda, 1992) e *in vivo* (Hervás, 1975; Samuels, 1989). Todo ello sugiere "a priori" que las hormonas tiroideas van a incidir sobre la secreción de los IGFs de forma distinta en periodos inmaduros y en periodo adulto según la secreción de IGFs sea más o menos dependiente de GH (Glasscock, 1990; Glasscock, 1991; Kim, 1993). En cualquier caso, no se puede excluir un efecto directo de las hormonas tiroideas sobre la secreción del IGF-I e independiente de GH,

puesto que la T_3 es capaz de incrementar la secreción de este factor de crecimiento en hígado de rata perfundido (Ikeda, 1989); así pues, las acciones de las hormonas tiroideas sobre la regulación del axis IGFs/IGFBPs presenta muchas lagunas de conocimiento.

De igual forma, se ha descrito que los desórdenes tiroideos son capaces de inducir cambios en los niveles de las IGFBPs. Se ha demostrado que, en el hombre, el hipotiroidismo disminuye los niveles de IGFBP-1 y 3, y aumenta los de IGFBP-2 (Miell, 1993; Miell, 1994), mientras que la tirotoxicosis incrementa los niveles circulantes de IGFBP-1 y 3 (Miell, 1993).

Se ha establecido que el efecto de las hormonas tiroideas sobre los IGFs y sus proteínas transportadoras depende del estado de desarrollo en la rata (Nanto-Salonen, 1992). Durante el periodo perinatal, las ratas hipotiroideas mostraron un aumento en los niveles séricos y de su ARNm hepático para la IGFBP-2 que se normalizó por el reemplazamiento temprano con hormona tiroidea (Nanto-Salonen, 1991; Nanto-Salonen, 1992).

En las ratas hipotiroideas adultas, los bajos niveles circulantes de IGFBP-3 e IGFBP-4 se asociaron a un descenso del ARNm de IGFBP-3 y a un aumento paradójico del ARNm de IGFBP-4 (Nanto-Salonen, 1992). Este descenso en la expresión hepática de IGFBP-3 de las ratas hipotiroideas se ha confirmado en otros estudios, en los que además se encontró un aumento en la abundancia del ARNm de IGFBP-1 y 2 (Rodríguez-Arno, 1993a; Rodríguez-Arno, 1994).

El tratamiento de las ratas hipotiroideas con GH normalizó los niveles de IGFBP-3 sin afectar a la expresión de IGFBP-2 e IGFBP-4 (Nanto-Salonen, 1993), lo que sugiere, de nuevo, que estos efectos de las hormonas tiroideas sobre los genes se producen por mecanismos independientes y que algunas veces son mediados por la GH.

Recientemente, se ha mostrado que las ratas hipertiroideas incrementan los niveles séricos de IGFBP-1 e IGFBP-4 (Frystyk, 1995). Finalmente, no se puede excluir una acción directa de las hormonas tiroideas sobre las IGFBPs. Se ha visto que la T_3 estimula, a nivel transcripcional, la formación de IGFBP-1, 2 y 3 (Ceda, 1992; Schmid, 1992; Angervo, 1993a). Además, se ha demostrado en cultivos de hepatocitos de ratas adultas que la T_3 induce un efecto directo positivo sobre la expresión de IGFBP-4 y, como consecuencia, sobre la actividad de los IGFs (Demori,

1997).

La importancia de las hormonas tiroideas durante el desarrollo es conocida, y dada la implicación del axis IGFs/IGFBPs en la proliferación y diferenciación celular, el estudio de la interacción entre estas hormonas y dichos factores posee una importancia relevante en la regulación endocrina del desarrollo; sin embargo, como se ha expuesto, dicha interrelación muestra numerosos aspectos desconocidos.

1.5. TRANSPORTADORES DE GLUCOSA (GLUTs).

La glucosa es la principal fuente de energía metabólica para las células. El carácter hidrofílico de esta molécula implica la necesidad de que existan proteínas transportadoras, para que atraviese la bicapa lipídica, que constituyen los sistemas de membrana. En el túbulo proximal del riñón y el lumen intestinal, la captación de glucosa es activa porque se mueve en contra de gradiente, por lo que el proceso se lleva a cabo mediante un cotransportador Na^+ /glucosa. En los restantes tejidos, el transporte se realiza por difusión facilitada, y en este proceso interviene una familia de proteínas estructuralmente relacionadas llamadas GLUTs.

1.5.1. Estructura, función y expresión tisular.

En la actualidad, se han identificado seis isoformas de GLUT producto de diferentes genes. Sus pautas de expresión son también distintas, tanto en lo que se refiere al tejido en donde se encuentran como a su concentración.

Todos los transportadores de glucosa tienen un tamaño similar (492-524 aminoácidos) y su estructura aparece bastante conservada entre las distintas isoformas y entre diferentes especies, si bien las regiones más divergentes corresponden a sus extremos C y N (Gould, 1990). Se trata de proteínas muy hidrófilas; casi la mitad de su secuencia está inmersa en la bicapa lipídica, y allí forman 12 dominios transmembranos conectados por bucles hidrofílicos por fuera y por dentro de la célula. Los extremos C y N son citoplasmáticos.

- GLUT-1: Se expresa en mayor medida en los tejidos fetales (menos en adultos), placenta y cerebro; en este último, facilita el paso de la glucosa a través de la barrera hematoencefálica. También es la isoforma predominante en células cultivadas y en muchos tumores dado que prácticamente todos los mitógenos estimulan su expresión (Hiraki, 1988). A pesar de que en alguno de ellos lo está en cantidad mínima, el GLUT-1 se encuentra casi en todos los tejidos, por lo que se

considera el responsable de la captación constitutiva de glucosa.

- GLUT-2: La expresión de este transportador es más restringida: hígado (media la captación y liberación por el hepatocito), membranas basolaterales del intestino delgado y riñón (participa en el transporte transepitelial de glucosa) y células β (participa en la secreción de insulina inducida por glucosa).

- GLUT-3: Su mayor expresión se produce en el tejido nervioso, y concretamente en el cerebro, esto es, en células con un alto requerimiento de glucosa. Se cree que este transportador es el que media el paso de esta hexosa a las neuronas (Maher, 1993). Se encuentra también, pero en cantidades menores, en placenta, hígado, riñón y corazón, pero no en músculo esquelético. La ubicuidad del GLUT-3 ha sugerido que, junto con el GLUT-1, participe en el transporte constitutivo de la glucosa.

- GLUT-4: Su localización tisular es muy restringida, se encuentra en los tejidos adiposos blanco y marrón, músculo cardíaco, diafragma y músculo esquelético (tejidos sensibles a la insulina).

Se trata de un transportador insulino-sensible; el GLUT-4 se localiza en vesículas intracelulares en situación basal, pero la presencia de insulina provoca su translocación a la membrana plasmática (Barnard, 1992; Stephens, 1995).

- GLUT-5: Es la isoforma más diferente en cuanto al grado de homología (Gould, 1990) y presenta mayor afinidad por la fructosa que por la glucosa, por lo que se cree que es el transportador de la cetohexosa de la dieta. Se expresa mayoritariamente en la membrana apical de los enterocitos del yeyuno, aunque también se detecta en los tejidos insulino-sensibles mencionados anteriormente, tejido adiposo y cerebro.

- GLUT-6: No existe como proteína funcional. Su pseudogen origina un transcrito homólogo al del GLUT-3, de expresión ubicua, pero con múltiples codones stop y desplazamientos de la pauta de lectura (Gould, 1993).

- GLUT-7: Este transportador facilita el paso de la glucosa-6-fosfato, procedente de la glucogenolisis y la gluconeogénesis, desde el citoplasma al retículo endoplásmico. Se localiza específicamente en el retículo del hígado y posee muchas concordancias con la estructura del GLUT-2.

1.5.2. Efecto del estado tiroideo sobre los transportadores de glucosa.

La expresión de los GLUTs, que se produce de manera específica en los

tejidos, puede ser alterada por multitud de factores, y entre ellos se incluyen glucosa, insulina, hormonas tiroideas, factores de crecimiento y edad (Burant, 1991).

Las hormonas tiroideas aumentan la actividad metabólica tisular. Las ratas tratadas con T_3 y T_4 , en músculo y tejido adiposo, aumentan el metabolismo de la glucosa, la velocidad de su captación y su transporte basal, debido al menos en parte, al incremento del contenido de GLUT-4, tanto en la membrana plasmática como en fracciones internas, y también se incrementa la expresión del transportador (Casla, 1990; Weinstein, 1991). No obstante, este aumento de la velocidad de transporte en el hipertiroidismo no sólo se asocia con un aumento en el número de transportadores GLUT-4, sino también con un aumento de su actividad funcional, al menos en los adipocitos (Matthaei, 1995). Estos aspectos se han corroborado también *in vitro*: células derivadas de hígado de rata ARL15 (Weinstein, 1990), en cardiomiocitos (Gosteli-Peter, 1996) y células Clone 9, que sólo expresan GLUT-1 (Shetty, 1996).

El hipotiroidismo neonatal experimental, por el contrario, disminuye la expresión de GLUT-4, así como de GLUT-1 tanto en el músculo esquelético como en el adipocito (Weinstein, 1991; Matthaei, 1995). El hipotiroidismo, a pesar del marcado descenso del contenido de GLUT-1 y 4, no disminuye el transporte de glucosa estimulado por la insulina al menos en el adipocito (Matthaei, 1995), lo que implicaría un aumento en la actividad funcional de los transportadores de glucosa.

En contra de las observaciones previas en el músculo esquelético, el hipotiroidismo aumenta la expresión y el contenido cardíaco de GLUT-1, y disminuye el ARNm de GLUT-4, aunque mantiene los niveles en la membrana de esta proteína transportadora. La administración de T_3 suprime el aumento de GLUT-1, incrementa la expresión de GLUT-4 y mantiene su contenido en los extractos membranosos (Weinstein, 1992).

La expresión de los transportadores de glucosa se encuentra regulada por la edad. Durante la etapa fetal y al principio de la postnatal, el GLUT-1 es la isoforma predominante y se expresa en músculo, tejido adiposo marrón y corazón (Santalucía, 1992; Postic, 1994). Después, en la vida postnatal, se produce una represión del GLUT-1 en músculo y tejido adiposo marrón, que es concomitante con un aumento en la expresión del GLUT-4 (Santalucía, 1992; Postic, 1994). Esta represión del GLUT-1 y la inducción del GLUT-4 pueden estar mediadas por diferentes mecanismos, entre ellos, las hormonas tiroideas. Se ha visto que el hipotiroidismo

altera la transición normal de GLUT-1 a GLUT-4 desde los niveles fetales a los neonatales en corazón y tejido adiposo marrón (Castelló, 1994). Este efecto se podría producir de una manera directa puesto que se ha descrito la existencia de un elemento de regulación positiva en el gen de GLUT-4 capaz de responder a las hormonas tiroideas (Torrance, 1997b), resultado que podría explicar los obtenidos *in vivo*, antes mencionados.

El hígado juega un papel central en la regulación de la homeostasis glucídica y tiene capacidad para almacenar glucógeno y para liberar glucosa a la circulación. El hígado es también el principal sitio gluconeogénico y el único tejido en que la concentración intracelular de glucosa puede exceder a la de la circulación. La isoforma transportadora de glucosa predominante en el hígado es el GLUT-2, como hemos visto, y es la encargada de captar y liberar la glucosa. La alteración de la expresión de este transportador de glucosa modificaría en gran medida el metabolismo de los carbohidratos, al igual que lo altera el estado tiroideo. El hipotiroidismo experimental disminuye el contenido y la expresión hepática del GLUT-2, mientras que el hipertiroidismo los incrementa (Weinstein, 1994).

Con respecto a otras influencias endocrinas sobre la expresión de los GLUTs, la insulina parece jugar un papel crucial. En el músculo esquelético de la rata, la hipoglucemia crónica (subnutrición) aumenta el contenido de GLUT-1 sin alterar el de GLUT-4 (Rubio, 1996); sin embargo, el GLUT-4 también responde a los estímulos insulínicos, y se ha visto que las ratas subnutridas presentan una translocación de este transportador por la insulina en músculo más eficaz que los animales control (Escrivá, en evaluación en Diabetología). En cuanto al GLUT-2, la insulina inhibe su expresión (Postic, 1993a; Colomb, 1995) y la glucosa la estimula (Postic, 1993b; Rencurel, 1996). No obstante, los cultivos de islotes de Langerhans procedentes de ratas neonatales y adultas subnutridas no alteran su contenido en GLUT-2, aunque sí aumenta el de GLUT-1 (Martín, 1995).

En este trabajo se intenta aclarar si la posible regulación de los transportadores de glucosa por las hormonas tiroideas tendría mecanismos similares a los que rigen la regulación de la secreción del axis IGFs/IGFBPs por dichas hormonas tiroideas.

1.6. PLANTEAMIENTO DEL TEMA.

El programa genético rige el desarrollo de los mamíferos en periodo

embrionario, pero después, factores externos, llamados ambientales, modulan dicho desarrollo de forma decisiva. Estos factores son estudiados en las llamadas alteraciones adquiridas del desarrollo, a las que nuestro grupo de investigación ha dedicado su trabajo desde 1970. Entre estos factores ambientales los nutrientes ocupan un lugar preponderante no sólo por ser el sustrato energético para crecer, sino porque modulan factores endocrinos genéticamente establecidos que regulan el crecimiento como son: la insulina, las hormonas tiroideas y los IGFs (Aláez, 1992b; Escrivá, 1992; Rivero, 1995; Goya, 1996; Alvarez, 1997; Martín, 1997).

El trabajo que se presenta en esta tesis es un intento de estudio de las posibles interacciones que pueden existir entre las hormonas tiroideas, insulina e IGFs en un modelo de hipotiroidismo por tiroidectomía y en tres etapas de vida de la rata (neonatal, destetada y adulta).

Los IGFs son polipéptidos con acciones endocrinas, autocrinas y paracrinas (Daughday, 1989), si bien su función parece estar modulada por sus proteínas transportadoras (IGFBPs). Ambos, IGFs e IGFBPs son secretados por el hígado, y dicha secreción está modulada por el estado nutricional y la GH (Straus, 1994; Thissen, 1994). El axis IGFs/IGFBPs constituye un sistema regulatorio complejo que posee un importante papel en el crecimiento y la diferenciación tisulares, y que está implicado en numerosos procesos durante el crecimiento y también durante el periodo adulto.

En periodos inmaduros del desarrollo, se expresan mayoritariamente el IGF-II y el complejo de IGFBPs de 30kDa (IGFBP-1 y 2), pero después este perfil es reemplazado en el animal adulto, mostrando altos niveles de IGF-I e IGFBP-3, y reducidos de IGF-II, IGFBP-1 y 2. Se ha descrito que estos cambios se retrasan por la falta de hormonas tiroideas (Gallo, 1991; Nanto-Salonen, 1991), lo que sugiere que la influencia de la T_3 y la T_4 sobre el complejo IGFs/IGFBPs es edad-dependiente (Nanto-Salonen, 1992).

Las hormonas tiroideas juegan un papel fundamental en el inicio y el mantenimiento del crecimiento de los mamíferos en etapas inmaduras. Estas hormonas, también afectan a casi todos los aspectos del metabolismo y así, su acción estimula las rutas catabólicas y oxidativas porque modifican la síntesis de enzimas clave del metabolismo de lípidos y carbohidratos o porque alteran las acciones de otras hormonas reguladoras (insulina, glucagón, catecolaminas) (Okajima, 1978;

Venditti, 1997). Las hormonas tiroideas y la GH, a través de los IGFs, son esenciales para un crecimiento normal, no obstante, el contenido hipofisario y los niveles circulantes de GH están regulados por las hormonas tiroideas *in vivo* (Hervás, 1975; Samuels, 1989) e *in vitro* (De Fesi, 1984) y, además, también controlan la expresión del gen de GH (Evans, 1982; Yaffe, 1984). Por otra parte, se sabe que el axis GH/IGFs actúa como principal mecanismo para el crecimiento, ya que el efector de las acciones de la GH sobre el desarrollo son los IGFs (Daughday, 1989; Jones, 1995), por tanto, las acciones de la T₃ y la T₄ sobre el sistema IGF se podrían explicar por el efecto directo de estas hormonas tiroideas sobre la secreción de GH. Sin embargo, hay indicios experimentales que muestran que no todas las acciones de las hormonas tiroideas sobre la secreción de IGFs están mediadas por la GH. La perfusión de hormona tiroidea en hígado aumenta la secreción de IGFs (Ikeda, 1989), y las dosis de GH dadas a hipotiroideos no restauran los bajos niveles de IGFs (Nanto-Salonen, 1993). Nuestro grupo, junto con otros autores, ha establecido que en periodos de inmadurez, el sistema IGFs/IGFBPs parece estar regulado por el balance insulina/nutrientes más que por la GH (Rivero, 1995; Goya, 1996), ello ha sido estudiado en animales subnutridos y diabéticos, y se ha establecido la existencia de un descenso en los niveles circulantes y de expresión hepática de los IGFs de estas ratas (Rivero, 1995; Goya, 1996).

Las hormonas tiroideas afectan globalmente al metabolismo, propiciando una compleja regulación en los niveles de insulina, no obstante, nunca había sido estudiada la insulina como posible mediadora de las acciones de las hormonas tiroideas sobre el axis IGFs/IGFBPs. Se ha descrito que el hipotiroidismo produce un descenso en los niveles de IGFs y que disminuye la biodisponibilidad de dichos factores (Burstein, 1979; Miell, 1993), mientras que el hipertiroidismo produce un aumento de los IGFs, aunque también disminuye su biodisponibilidad (Miell, 1993). Dicha biodisponibilidad depende, sin duda, de las variaciones en las IGFBPs, luego las hormonas tiroideas parecen alterar el axis IGFs/IGFBPs; sin embargo, queda por aclarar si el mediador de sus acciones es siempre la GH, si se trata de una acción específica de las hormonas tiroideas o son otras hormonas las que median su acción.

La insulina parece tener un papel como reguladora del axis IGFs/IGFBPs en etapas inmaduras, por ello, en este trabajo, nos propusimos estudiar, en un mismo modelo de hipotiroidismo por tiroidectomía, las variaciones a nivel circulante y de

expresión hepática del ARNm de IGFs e IGFbps en tres poblaciones de animales: neonatos (10-20 días), destetados (27-37 días) y adultos (77-87 días), y en él, dosificamos además, la insulina, GH y glucemia. El trabajo se divide en tres partes:

1. Estudio de las alteraciones del axis IGFs/IGFBPs en situaciones de hipotiroidismo (tiroidectomía o tratamiento con MMI) desde la etapa neonatal a la adulta y la posible implicación de la insulina como mediadora de ellas.

2. Estudio de la repercusión sobre el axis IGFs/IGFBPs, a nivel circulante y en la expresión hepática de su ARNm, de las mismas tres poblaciones tiroidectomizadas después de la rehabilitación con hormona tiroidea por dos vías: inyección intraperitoneal de T₄ e implante de pellet subcutáneo para una absorción continuada.

También se intenta, en una población de ratas diabéticas, la rehabilitación de los IGFs y las IGFbps por la administración de tiroxina, como estudio complementario al anterior.

3. Estudio de las variaciones de los transportadores de glucosa en animales neonatales hipotiroideos para establecer la posible existencia de correlación entre las acciones de las hormonas tiroideas sobre dichos transportadores de glucosa y sobre el axis IGFs/IGFBPs.

MATERIAL Y METODOS

2. MATERIAL Y METODOS.

2.1. ANIMALES.

A lo largo del trabajo que constituye la presente tesis, se han utilizado ratas de la raza Wistar obtenidas del propio criadero del Instituto de Bioquímica (Centro mixto CSIC-UCM, ubicado en el departamento de Bioquímica y Biología Molecular II de la Facultad de Farmacia). Criar nuestros propios animales ha permitido ejercer un estricto control de sus condiciones nutricionales y generales, tanto en las etapas gestacional y lactante como en la adulta; dicho control es imprescindible en los modelos experimentales que han sido objeto de este trabajo.

En el mencionado criadero existe un acondicionador de temperatura que mantiene esta variable ambiental constante entre 22 y 24°C. Por otra parte, las ratas están sometidas a un ciclo de luz/oscuridad automático, gracias a un reloj controlador que ilumina la estancia a las 7:00 h y la oscurece a las 19:00 h.

El inicio de la gestación fue establecido mediante la observación, por frotis, de la presencia de espermatozoides en la vagina de la rata (180-200g) al día siguiente de su apareamiento con el macho (300-400g); dicha condición se confirmó a los 14 días por palpación abdominal. El día del nacimiento (día 0 de vida) todas las camadas se uniformaron, disponiéndose 8 crías, con número equivalente de machos y hembras en cada una. Las ratas se destetaron el día 22 de vida y se agruparon en jaulas que contenían 4 animales.

2.2. COMPOSICION DE LA DIETA GENERAL

El alimento suministrado fue el pienso SANDERMUS S-10, adquirido en SANDERS; se presenta en forma de porciones prensadas cuya composición, en gramos por ciento, es la siguiente:

| | |
|-----------------------|-----|
| Proteínas..... | 18 |
| Grasas..... | 2.5 |
| Almidón..... | 35 |
| Azúcares totales..... | 3.5 |
| Cenizas..... | 8 |
| Fibra..... | 5.5 |
| Humedad..... | 13 |

| | |
|--------------|------|
| Calcio..... | 1.2 |
| Fosfato..... | 0.65 |
| NaCl..... | 0.6 |

El resto de los ingredientes está constituido por una mezcla de minerales y vitaminas, cuya composición es la siguiente:

MINERALES (mg/Kg de pienso)

| | |
|----------------|-----|
| Cobalto | 0.6 |
| Yodo..... | 1.5 |
| Selenio..... | 0.3 |
| Cobre..... | 15 |
| Hierro..... | 25 |
| Zinc..... | 50 |
| Manganeso..... | 80 |

VITAMINAS (por Kg de pienso)

| | | |
|--------------------------|-------|------|
| Vitamina A..... | 10000 | U.I. |
| Vitamina D3..... | 2000 | U.I. |
| Vitamina E..... | 15 | mg |
| Vitamina K..... | 1 | mg |
| Vitamina B1..... | 1 | mg |
| Vitamina B2..... | 3.5 | mg |
| Vitamina B6..... | 1 | mg |
| Vitamina B12..... | 15 | µg |
| Acido fólico..... | 0.3 | mg |
| Biotina..... | 15 | µg |
| Acido nicotínico..... | 30 | mg |
| Pantotenato cálcico..... | 10 | mg |
| Colina..... | 250 | mg |

Considerando las cifras convencionales de equivalencia calórica de los tres principios inmediatos (4.1 Kcal/g para los glúcidos y prótidos y 9.0 Kcal/g para los

lípidos), la mezcla descrita posee un valor de 2.54 Kcal/g.

2.3. HIPOTIROIDISMO.

Se estudiaron de manera comparativa dos poblaciones de animales, controles e hipotiroideas, compuestas por ratas de diferentes edades, que abarcaron desde la etapa neonatal a la adulta. El estudio comprendió animales neonatales hasta 20 días de vida, destetadas de 22 a 37 días, y adultas, hasta 87 días de edad.

Ratas control: Los animales control procedían de progenitores alimentados *ad libitum* en todo momento. Las controles-lactantes fueron amamantadas por ratas que dispusieron de pienso libremente, y las controles-adultas recibieron directamente este tipo de dieta a partir del destete.

Estos animales no fueron sometidos a ningún tipo de tratamiento. No obstante, a un grupo de estas ratas control se les practicó una operación simulada para que pudieran compararse con los animales tiroidectomizados, eliminando así en dicha comparación posibles consecuencias debidas al stress de la intervención.

Ratas hipotiroideas: El hipotiroidismo se produjo por tiroidectomía quirúrgica, aunque con el fin de facilitar esta operación se suministró en el agua de bebida, y en una proporción del 0.02% (p/v), 5'-mercaptoimidazol (MMI) días antes de la operación en las tres poblaciones estudiadas (neonatos, destetadas y adultas), lo que provocó la hipertrofia de la glándula y posibilitó su eliminación. Se continuó con dicho tratamiento hasta el momento del sacrificio de los animales con el fin de mantener unos niveles bajos de hormonas tiroideas y prevenir su renovación por la posible existencia de tejidos tiroideos residuales.

2.4. MODELOS DE HIPOTIROIDISMO. (Figura 1).

2.4.1. Animales hipotiroideos neonatales.

En los estudios realizados en periodo neonatal, el MMI se suministró en el agua de bebida materna, con lo que los animales lactantes lo recibieron por vía indirecta a través de la leche.

2.4.1.1. Ratas neonatales tiroidectomizadas. (T₅, Figura 1).

A estos animales, a los 2 días de vida, se les administró MMI en el agua de bebida (0.02%, p/v), se tiroidectomizaron a los 5 días de vida y se sacrificaron a los 5, 10 y 15 días después de la operación (10, 15 y 20 días de vida, respectivamente).

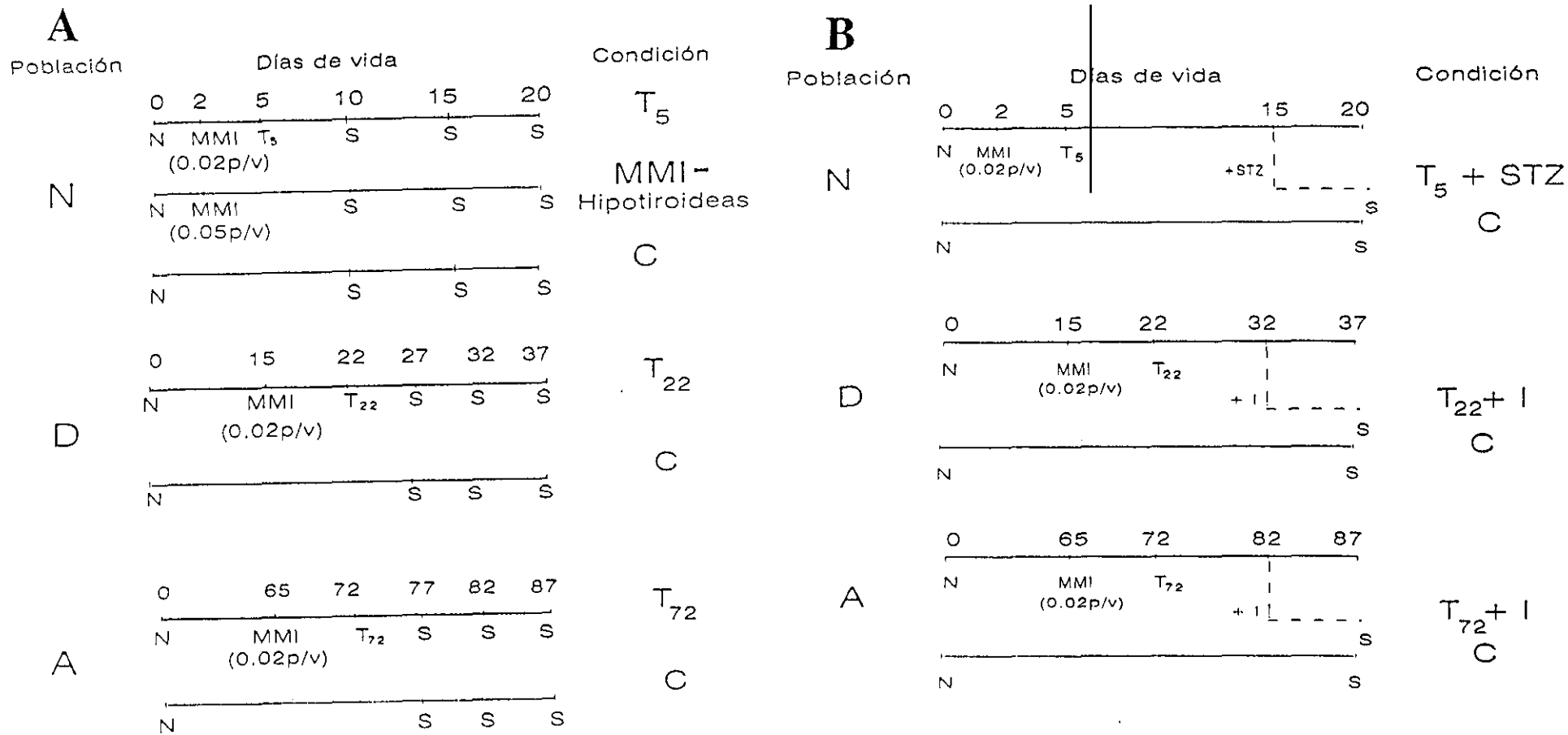


Fig 1 A) Diseño experimental del estudio de hipotiroidismo de ratas neonatales (N) tiroidectomizadas (T) y tratadas con MMI (hipotiroidneas-MMI) y animales destetados (D) y adultos (A) operados quirúrgicamente. Las abreviaturas de las distintas poblaciones son: T₅, ratas neonatales tiroidectomizadas a los 5 días de vida; hipotiroidneas-MMI, ratas que recibieron sólo MMI; T₂₂, ratas destetadas tiroidectomizadas a 22 días; T₇₂, ratas adultas tiroidectomizadas a 72 días; C, ratas control; N, nacimiento; T, tiroidectomía; MMI, metimazol; S, sacrificio.

B) Diseño experimental del estudio del tratamiento con estreptozotocina (STZ) de las ratas neonatales (N) tiroidectomizadas y de la administración de insulina a animales destetados (D) y adultos (A) operados quirúrgicamente. Las abreviaturas de las distintas poblaciones son: T₅ + STZ, ratas neonatales tiroidectomizadas a los 5 días y tratadas con STZ; T₂₂ + I, ratas destetadas operadas a los 22 días y tratadas con insulina; T₇₂ + I, ratas adultas tiroidectomizadas a 72 días y tratadas con insulina; C, animales control; N, nacimiento; T, tiroidectomía; MMI, metimazol; S, sacrificio.

El suministro de este bociógeno se realizó en los animales tiroidectomizados para asegurar el hipotiroidismo en ellos, aun en caso de la existencia de posibles residuos de glándula después de la operación.

Los animales tiroidectomizados recibieron desde el día de su operación lactato de calcio al 1% en el agua de bebida, junto con el MMI, para evitar la hipocalcemia debida al posible daño o extirpación que pudo sufrir la glándula paratiroides durante la tiroidectomía.

2.4.1.2. Ratas neonatales tratadas con MMI. (Hipotiroides-MMI, Figura 1).

En la población neonatal, se estableció también un segundo modelo de hipotiroidismo que consistió tan solo en la administración de MMI al 0.05% (p/v) desde el segundo día de vida hasta el momento del sacrificio (10, 15 y 20 días de vida). En este caso, no se sometió a los animales a la tiroidectomía, con lo que se consiguió un hipotiroidismo que podría parecer más suave, aunque los niveles de las hormonas tiroideas fueron igualmente bajos respecto a las ratas control.

2.4.1.3. Ratas neonatales tiroidectomizadas tratadas con STZ. (T₅ + STZ, Figura 1).

A un grupo de animales neonatales tiroidectomizados, a los 10 días de la operación (15 días de vida), se les bloqueó la secreción de insulina mediante la administración intraperitoneal de una solución de estreptozotocina (STZ, Upjohn Farmoquímica, SA, Madrid) en tampón citrato 0.05M pH 4.5. La dosis administrada fue de 70mg/Kg de peso y los animales se sacrificaron a los 15 días después de la tiroidectomía (20 días de vida), esto es, a los 5 días de la administración de STZ.

La comprobación de la falta de insulina en esta población se llevó a cabo mediante la determinación de la glucemia e insulinemia.

2.4.2. Animales hipotiroides destetados.

2.4.2.1. Ratas destetadas tiroidectomizadas. (T₂₂, Figura 1).

En esta población de animales, la administración de MMI (0.02%, p/v) se inició una semana antes del destete (15 días de vida). Posteriormente, a los 22 días de vida, se tiroidectomizaron, y se sacrificaron a los 5, 10 y 15 días después de la operación (27, 32 y 37 días de vida, respectivamente).

2.4.2.2. Ratas destetadas tiroidectomizadas tratadas con insulina. ($T_{22} + I$, Figura 1).

La glucemia de las ratas hipotiroideas destetadas, que estaba disminuida respecto a las controles, se le normalizó mediante la administración de insulina Lente (mono componente de páncreas porcino y bovino) de Novo (amablemente suministrada por Novo Nordisk Pharma SA, Madrid). Esta insulina es una mezcla formada por un 30% de insulina de páncreas porcino en estado "amorfo" y un 70% de insulina de páncreas bovino en forma cristalina. Su acción es lenta, comenzando a las 2.5 horas de su administración, alcanzando un máximo a las 7-15 horas y finalizando su acción a las 24 horas.

Las dosis de insulina administradas y la pauta concreta de tratamiento, que se describe a continuación, se determinó por tanteo, aunque se consideró adecuada la dosis capaz de mantener la glucemia en un rango normal (80-120mg/ml).

El tratamiento se inició a los 10 días de la tiroidectomía (32 días de vida) y consistió en la administración durante 5 días de 1 UI de insulina vía subcutánea por la mañana (9h). Se efectuaron medidas diarias de la glucemia antes de administrar la insulina para comprobar la evolución del tratamiento. Finalmente, los animales fueron sacrificados a los 37 días de vida (15 días después de la tiroidectomía).

2.4.3. Animales hipotiroideos adultos.

2.4.3.1. Ratas adultas tiroidectomizadas. (T_{72} , Figura 1).

La pauta seguida con estos animales fue la misma que en las ratas destetadas, pero en este caso se tomó como día uno del experimento aquel en el que los animales alcanzaron los 120g de peso (65 días de vida), iniciándose entonces la administración del MMI (0.02%, p/v). Se sacrificaron a los 5, 10 y 15 días después de la tiroidectomía (77, 82 y 87 días de vida, respectivamente).

2.4.3.2. Ratas adultas tiroidectomizadas tratadas con insulina. ($T_{72} + I$, Figura 1).

En esta población, como en el caso de las ratas destetadas tiroidectomizadas, que también recibieron el tratamiento hormonal, la pauta de administración se determinó por tanteo y teniendo en cuenta los valores de glucemia.

El tratamiento se inició a los 10 días después de la tiroidectomía (82 días de vida). En este caso, a los animales se les administraron 2 UI de insulina por vía subcutánea durante 5 días repartidas en dos dosis, una por la mañana (9h) y otra por

la tarde (17h). También, como con los animales destetados, antes de proceder a la administración de insulina, se midió la glucemia. Al finalizar el tratamiento, los animales fueron sacrificados (15 días después de la tiroidectomía, es decir a los 87 días de vida).

2.5. MODELOS DE HIPOTIROIDISMO CON REHABILITACION. (Figura 2).

2.5.1. Animales hipotiroideos tratados con tiroxina.

Una vez establecido el cuadro de hipotiroidismo en los animales neonatales, destetados y adultos, fueron tratados con T_4 según las pautas que se especifican a continuación.

En principio, la recuperación con tiroxina se realizó mediante la inyección de la hormona, pero con el fin de conseguir una absorción más gradual, y por tanto, una rehabilitación más fisiológica, se recurrió a la implantación de pellets bajo la piel.

2.5.1.1. Rehabilitación mediante inyección de T_4 . ($T_5 + T_4$ (R), Figura 2).

A los 10 días después de la operación, y con una población de animales neonatales tiroidectomizados (T_5), destetados (T_{22}) o adultos (T_{72}), se inició una pauta de recuperación que consistía en administrar durante 5 días una dosis diaria, vía intraperitoneal, de T_4 ($1.5\mu\text{g}/100\text{g}$ de peso para las ratas neonatales y $1.75\mu\text{g}/100\text{g}$ de peso para los animales destetados y adultos).

2.5.1.2. Rehabilitación mediante implantación de pellets.($T_5 + T_4$ (RP), Figura 2).

Otro grupo diferente de ratas neonatales, destetadas y adultas fue sometido a un proceso de rehabilitación con T_4 por implantación de pellets (IRA, Sarasota, FL, USA). Este dispositivo, que libera la hormona de forma continuada, se implantó subcutáneamente realizando una pequeña incisión en el lomo del animal. La dosis administrada en este proceso de rehabilitación fue la misma que en el caso anterior ($1.5\mu\text{g}/100\text{g}$ de peso para la población neonatal y $1.75\mu\text{g}/100\text{g}$ de peso para las ratas destetadas y adultas, respectivamente), sin embargo, en el caso de los animales destetados y adultos el tratamiento se realizó durante 5 ó 10 días.

2.6. MODELO DE DIABETES POR ESTREPTOZOTOCINA. (Figura 3).

El cuadro de diabetes mellitus se provocó mediante la inyección vía intraperitoneal (ip) de una solución de STZ (Upjhon Farmoquímica, S.A., Madrid)

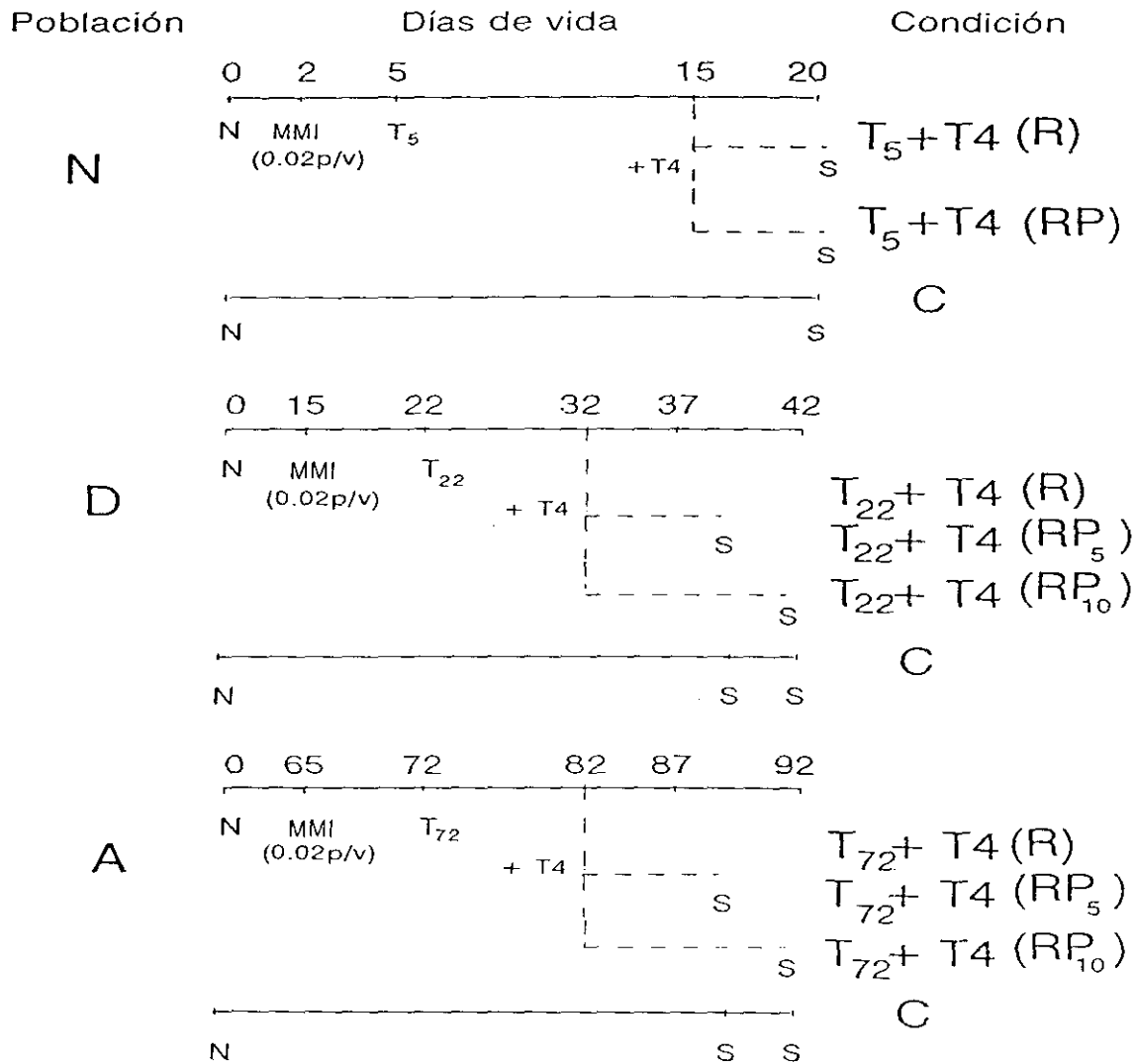


Fig 2 Diseño experimental del estudio de rehabilitación con T₄ de ratas neonatales (N), destetadas (D) y adultas (A). Las abreviaturas de las distintas poblaciones son: T₅ + T₄ (R), ratas neonatales tiroidectomizadas y tratadas con 1.5μg/100g de peso de T₄ de forma diaria vía ip; T₅ + T₄ (RP_{1,5}), ratas neonatales operadas y tratadas con 1.5μg/100g de peso de T₄ (pellet); T₂₂ + T₄ (R), ratas destetadas operadas y tratadas con una inyección de 1.75μg/100g de peso de T₄; T₂₂ + T₄ (RP₅), ratas destetadas operadas, tratadas con 1.75μg/100g de peso de T₄ (pellet) durante 5 días; T₂₂ + T₄ (RP₁₀), ratas destetadas tiroidectomizadas y tratadas con 1.75μg/100g de peso de T₄ (pellet) durante 10 días; T₇₂ + T₄ (R), ratas adultas operadas a los 72 días y tratadas con una dosis ip de 1.75μg/100g de peso de T₄ durante 5 días; T₇₂ + T₄ (RP₅), ratas adultas tiroidectomizadas y tratadas con 1.75μg/100g de peso de T₄ (pellet) durante 5 días; T₇₂ + T₄ (RP₁₀), animales adultos tiroidectomizados y tratados durante 10 días con 1.75μg/100g de peso de T₄ (pellet); C, animales control; N, nacimiento; T, tiroidectomía; MMI, metimazol; S, sacrificio.

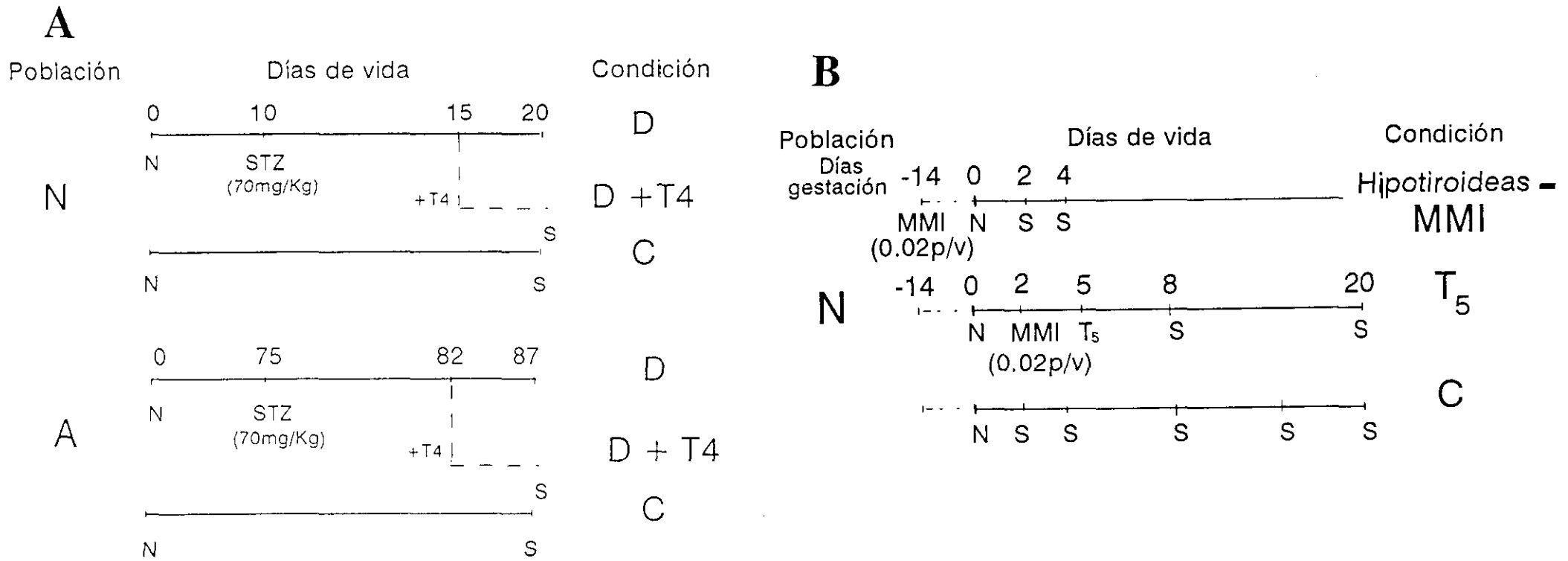


Fig 3 A) Diseño experimental del estudio de tratamiento con T₄ de ratas neonatales (N) y adultas (A) diabéticas. Las abreviaturas empleadas para las distintas poblaciones son: D, ratas diabéticas; D + T₄, ratas diabéticas neonatales tratadas con pellets de T₄ (1.5µg/100g de peso) y ratas adultas diabéticas tratadas con T₄ (1.75µg/100g de peso); C, animales control; N, nacimiento; T, tiroidectomía; MMI, metimazol; S, sacrificio.

B) Diseño experimental del estudio de los transportadores de glucosa en ratas neonatales (N) hipotiroides tratadas con MMI (MMI) y tiroidectomizadas (T). Las abreviaturas de la población son: C, animales control; N, nacimiento; T, tiroidectomía; MMI, metimazol; S, sacrificio.

en tampón citrato 0.05M pH 4.5. Se estudiaron animales controles y diabéticos de las poblaciones neonatal y adulta.

La administración de la STZ (70mg/Kg peso) se realizó a los 10 días de vida en el caso de las ratas neonatales, o a los 72 días de vida, en las ratas adultas; tres días más tarde se comprobó el estado de diabetes de dichos animales mediante la determinación de la glucemia y, posteriormente, de la insulinemia. Los animales fueron sacrificados a los 20 y 87 días de vida, respectivamente.

2.6.1. Tratamiento de animales diabéticos con T₄. (D + T₄, Figura 3).

Con el fin de observar el efecto de las hormonas tiroideas en los animales diabéticos respecto al axis IGFs/IGFBPs, se administró T₄ a unas poblaciones de ratas diabéticas neonatales y adultas.

El tratamiento hormonal de los animales diabéticos neonatales y adultos, que se realizó mediante la implantación de pellets, se inició en el caso de los primeros a los 15 días de vida, y en el de los segundos, a los 82 días de vida, y las dosis administradas fueron de 1.5µg/100g de peso y 1.75µg/100g de peso, respectivamente. La duración del tratamiento fue de 5 días, con lo que los animales se sacrificaron a los 20 y 87 días de vida, respectivamente.

2.7. ESTUDIO DE LOS TRANSPORTADORES DE GLUCOSA (GLUTs) EN RATAS NEONATALES HIPOTIROIDEAS. (Figura 3).

El estudio de los GLUTs durante el desarrollo de la rata se llevó a cabo en poblaciones neonatales hipotiroideas y controles, desde los 2 a los 20 días de edad.

La pauta que se siguió comenzó con la administración de MMI (0.02%, p/v) en el agua de bebida de las ratas preñadas a partir del día 14 de gestación; las crías fueron sacrificadas a los 2 y 4 días de vida (hipotiroideas-MMI).

Por otro lado, los animales neonatales de 8 y 20 días de edad (T₃), que se incluyeron en este estudio, fueron sometidos a la misma pauta que las ratas neonatales tiroidectomizadas, esto es, se inició la administración del fármaco bociógeno a los 2 días de vida (0.02%, p/v), se tiroidectomizaron a los 5 días de edad y se sacrificaron a los 3 y 15 días después de la operación (8 y 20 días de vida, respectivamente).

2.8. RECOGIDA DE MUESTRAS.

Los animales neonatales y adultos empleados en el estudio fueron sacrificados entre las 09:00 y las 11:00 horas, aunque para las ratas hipotiroideas tratadas con T₄ se estableció la hora del sacrificio en las 11:00 horas.

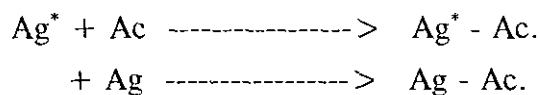
Las muestras de sangre (mezcla arterial y venosa) se obtuvieron del tronco del animal tras la decapitación y se recogieron en tubos eppendorf con y sin heparina para obtener suero y plasma, respectivamente. Se dejaron coagular en hielo durante 30 minutos, y a continuación fueron centrifugados 10 minutos a 12.000rpm (Microfuge 11, Beckman); el suero y el plasma se trasvasaron a otra serie de tubos eppendorf que se conservaron a -80°C hasta su posterior análisis.

Las muestras de tejidos (hígado, hipófisis, corazón, cuádriceps y gastrocnemius) se extrajeron inmediatamente después de la decapitación, se sumergieron en N₂ líquido y se conservaron a -80°C hasta el momento de su valoración.

2.9. DETERMINACION RADIOINMUNOLOGICA DE IGF-I.

2.9.1. Fundamento del radioinmunoanálisis.

El RIA es un caso particular del radioanálisis competitivo basado en una reacción de competición entre un ligando dado que actúa como antígeno (hormona, Ag) y otro antígeno marcado (hormona*, Ag*) por la unión a un receptor específico, su anticuerpo (Ac). En esquema:



Esta reacción de competición tiene lugar durante la incubación de ambos antígenos, marcado y no marcado (frío), con el anticuerpo, produciéndose la unión del antígeno marcado al anticuerpo en proporción inversa a la concentración de antígeno frío que lo desplaza de la unión, ya que el antígeno frío presenta una mayor afinidad por el anticuerpo respecto al antígeno marcado, esto es, el antígeno frío tiene mayor actividad biológica. Así pues, el grado de competición, y por tanto la concentración del ligando a valorar, puede conocerse por los cambios en la concentración del antígeno marcado libre o del complejo antígeno* - anticuerpo. A continuación, se procede a la separación de la radiactividad libre del complejo inmunológico para valorar la radiactividad ligada, y por comparación con la

radiactividad ligada en presencia de cantidades conocidas y crecientes de antígeno (curva patrón), puede conocerse su concentración en una disolución problema.

Este análisis presenta la sensibilidad de las técnicas isotópicas y posee la especificidad propia de los métodos inmunológicos, lo que permite valorar un componente en una muestra de gran complejidad con un mínimo de interferencias.

Para obtener resultados fiables se debe tener en cuenta las siguientes condiciones:

1. Que el anticuerpo obtenido sea específico del antígeno (sustancia problema) y que sus diluciones sean adecuadas.

2. Que el antígeno se pueda marcar con un isótopo radiactivo de manera que se consiga una alta actividad específica sin una disminución de su actividad biológica.

3. Que el método de separación de la radiactividad libre de la ligada en forma del (complejo Ag-Ac) sea adecuado.

2.9.2. Filtración en gel.

Esta técnica permite la separación de las IGFbps del suero y constituye el paso previo para la determinación de la concentración de IGF-I mediante RIA y de IGF-II por radiorreceptor (RRA). Además, este procedimiento fue mostrado como el idóneo por nuestro grupo de investigación frente a la extracción en ácido fórmico-acetona y a la de ácido-etanol con crioprecipitación, sobre todo para el caso de muestras procedentes de ratas neonatales (Rivero, 1994).

2.9.2.1. Fundamento.

La cromatografía de permeabilidad o de tamiz molecular separa las moléculas en función de su tamaño, forma y peso molecular mediante el paso de las muestras a través de una matriz de pequeñas esferas de material inerte que está englobada en una columna.

Esta técnica constituye el método de elección para la eliminación de interferentes indeseables de distinto peso molecular respecto a los problemas por diferentes razones:

- a) es la cromatografía más sencilla,
- b) no requiere muestras muy puras,
- c) no se presentan fenómenos de adsorción, lo que la hace ideal para muestras biológicas lábiles,
- d) permite separaciones rápidas sin necesidad de unos gradientes de elución,

e) produce bandas estrechas en el cromatograma y, finalmente,

f) permite correlacionar fácilmente el peso molecular con el volumen de elución.

Entre los parámetros a tener en cuenta en este tipo de cromatografía se encuentra el coeficiente de disponibilidad (K_{av}) de una molécula, dado que representa la fracción de la fase estacionaria accesible para la difusión de dicha molécula. Se expresa como:

$$K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0}$$

donde:

V_e (volumen de elución): volumen necesario para eluir una molécula determinada.

V_0 (volumen vacío): volumen de la fase móvil en el que se distribuyen las moléculas de peso molecular suficientemente elevado como para no penetrar por el tamiz molecular.

V_t (volumen total): volumen de la columna (fase móvil y estacionaria) en el que se distribuyen las moléculas de peso molecular muy bajo.

El K_{av} de una molécula es independiente de las dimensiones de la columna y se relaciona de forma constante con su coeficiente de difusión.

2.9.2.2. Material y reactivos.

Columna. Se utilizaron columnas de vidrio borosilicado XK 16/100 (Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Suecia) de 100cm de altura y 16mm de diámetro.

Fase móvil. Está formada por ácido acético 1M y cloruro sódico 0.02M en agua; se emplea para el equilibrado de la columna y como eluyente.

Fase estacionaria. Se utiliza Sephadex G-50 Fine (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Suecia). Posee un rango de fraccionamiento de 1.600 a 30.000Da, adecuado por tanto, para la separación de IGFs (7.600Da) de sus proteínas ligadoras (aproximadamente 50.000Da).

2.9.2.3. Calibración de la columna.

Para determinar con exactitud en qué fracciones eluyen los IGFs y sus

proteínas ligadoras una vez separadas, se filtró una alícuota de IGF marcado radiactivamente con ^{125}I , se recogieron fracciones de unos 2ml y, a continuación, se procedió a su conteo en un contador Packard Auto-Gamma Cobra II. En las tres columnas empleadas el IGF eluyó con un K_{av} de 0.22.

El perfil de elución del péptido marcado mostró claramente dos picos de radiactividad de IGF, el primero correspondía a las IGFBPs y el segundo a los IGFs.

2.9.2.4. Filtración de los sueros.

Se diluyó la muestra de suero en una proporción 1:1 en ácido acético 2M, de forma que la concentración final de ácido en la muestra fuera 1M, y para disociar los complejos IGF/IGFBP se mantuvo la mezcla durante una hora a temperatura ambiente. A continuación, la muestra se filtró por la columna a un flujo de 4ml/h y se utilizó como eluyente ácido acético 1M y cloruro sódico 0.02M. Finalmente, las fracciones correspondientes a IGF se reunieron y se liofilizaron. El liofilizado se resuspendió en tampón de RIA y se repartió en alícuotas que se conservaron a -20°C hasta su análisis.

2.9.3. Marcaje radiactivo de IGF-I y II.

2.9.3.1. Fundamento.

Se persigue la obtención de péptidos con suficiente radiactividad específica pero sin una actividad biológica disminuida, de forma que la cuantificación de IGF en la muestra posea una adecuada sensibilidad.

Para el marcaje radiactivo de IGFs se utilizó una modificación del método de la cloramina T (Hunter, 1962) que es ampliamente utilizado para marcar pequeñas cantidades de proteína con una alta radiactividad específica que se empleará como radioligando en el radioanálisis competitivo. La reacción que tiene lugar es una oxidación del Na^{125}I en presencia de una proteína que contiene residuos de tirosina, con la subsiguiente incorporación del radioyodo a dichos residuos. La cloramina T es la sal sódica del ligando N-monocloro de la p-toluenosulfonamida y en disolución acuosa se degrada lentamente formando ácido hipocloroso que es un agente oxidante. Así, el NaI en presencia de cloramina T y a pH ligeramente básico (pH 7.5) es oxidado, se generan iones yodinio (I^+) que reaccionan con el anillo fenólico de la cadena lateral de la tirosina y que se incorporan en orto respecto al hidroxilo.

El proceso se detiene por dilución de la mezcla de reacción en presencia de una alta concentración de BSA (albúmina sérica bovina), ello altera las condiciones

de reacción y hace que se incorpore el ^{125}I al BSA, que por ser una proteína de alto peso molecular es fácilmente separable del IGF. Finalmente, se separa la proteína marcada del yodo radioactivo no incorporado, así como de la albúmina marcada mediante filtración en gel.

2.9.3.2. Material y reactivos.

Hormona. Se utilizaron rhIGF-I y rhIGF-II (IGF-I y II humano recombinante) de Boehringer Mannheim (Leverkusen, Alemania) que vienen liofilizados. Se reconstituyeron en ácido acético 0.1M y se liofilizó una alícuota. Estos péptidos también se emplearon en la elaboración de la curva patrón en el ensayo de RIA y en el de RRA.

Na ^{125}I . Se presenta a una concentración de 100mCi/ml y es suministrado por Amersham (Amersham Ibérica S.A., Madrid).

Columna. Se emplearon columnas de Sephadex G-50 Fine equilibradas antes del marcaje con PBS 0.03M (tampón fosfato), BSA al 0.25% (p/v) y azida sódica 0.02% (p/v) para el marcaje de IGF-I, o con ácido acético 1M y BSA al 0.25% (p/v) en el caso del marcaje del IGF-II.

2.9.3.3. Procedimiento.

La reacción se desarrolló en el mismo tubo donde se liofilizó el péptido que se resuspendió en PBS 0.5M (tampón fosfato). A continuación, se añadió el yodo radiactivo (Na ^{125}I) y la disolución de cloramina T (1mg/ml en PBS 0.01M) recién preparada y se dejaron transcurrir 30 segundos para que se produjera la yodación del péptido.

La reacción se detuvo por la adición de BSA al 5% (p/v) en PBS 0.01M para el marcaje de IGF-I, y con BSA al 5% (p/v) en ácido acético 1M en el marcaje de IGF-II. A continuación, se transfirió la mezcla de reacción a la columna y se recogieron fracciones de 1ml a un flujo de unos 30ml/h. Se contó una alícuota de cada fracción en un contador γ (Packard Auto-Gamma Cobra II) para conservar las fracciones interesantes que se mantuvieron congeladas a -20°C y divididas en alícuotas.

2.9.3.4. Cálculo del rendimiento y la actividad específica.

El rendimiento es el porcentaje del total de radiactividad presente en el tubo de reacción que se incorpora al péptido, y se calcula como el cociente entre las cpms del pico de IGF-I ó II y las cpms totales eluidas de la columna. (Osciló entre 47-78%

para el IGF-I y 45-81% para el IGF-II).

La radiactividad incorporada al péptido se obtiene al multiplicar el rendimiento y la radiactividad añadida al tubo de reacción corregida a la fecha del marcaje. Finalmente, el cociente de la radiactividad incorporada y la masa del polipéptido nos permite conocer la actividad específica en $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$. (Osciló entre $90\text{-}160\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ para IGF-I y $90\text{-}174\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ para el IGF-II).

2.9.3.5. Perfil de elución de radiactividad.

El perfil obtenido por el método de la cloramina T muestra tres picos de radiactividad: el primero corresponde al BSA que se yoda al detener la reacción, el segundo, es la hormona marcada y, por último, el tercero, se identifica con el yodo libre que no ha reaccionado ni con la hormona ni con el BSA (Figura 4).

2.9.3.6. Repurificación del IGF marcado.

El péptido marcado conserva su actividad biológica durante más de dos meses. Sin embargo, el ligamiento inespecífico en el RIA aumenta al transcurrir el tiempo, aunque este inconveniente se evita repurificando ciertas fracciones del marcaje; de esta manera, se consigue separar la hormona marcada íntegra de la deteriorada por la radiactividad y del yodo radiactivo desprendido del péptido.

La repurificación se efectúa en las mismas condiciones que el marcaje y su perfil de elución también muestra tres picos: el primero probablemente se debe a polímeros de IGF-I, el segundo, que es el mayor, se corresponde con la hormona marcada y, finalmente, en tercer lugar, eluye el yodo libre, desprendido del péptido marcado.

2.9.4. Desarrollo del RIA de IGF-I.

2.9.4.1. Material y reactivos.

Patrón. Se empleó IGF-I humano recombinante (rhIGF-I) de Boehringer Mannheim que viene liofilizado. Se obtiene de *E. coli* y presenta una pureza superior al 95%. También se utiliza esta hormona en los marcajes.

Tampón. Está compuesto por tampón fosfato 0.01M pH 7.5, cloruro sódico 0.15M, azida sódica al 0.02% (p/v) y BSA al 0.5% (p/v). Se utilizó para diluir el patrón, las muestras filtradas, el radioligando, el primer anticuerpo y también para reconstituir las muestras filtradas después de su liofilización.

Radioligando. Se empleó ^{125}I -IGF-I que se diluyó con tampón de RIA para obtener de 8.000 a 10.000cpm/tubo.

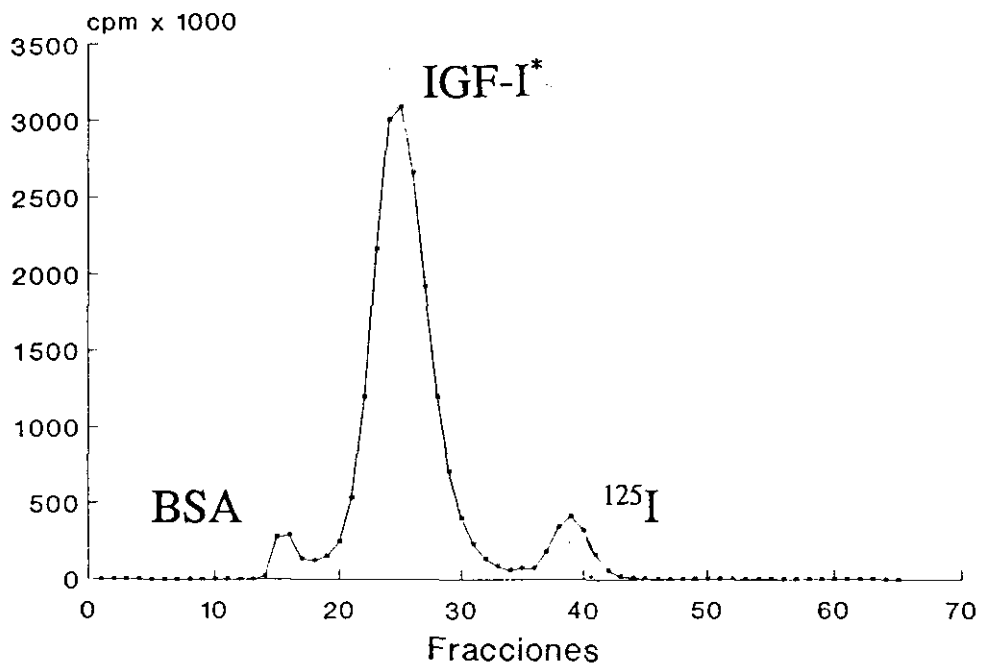
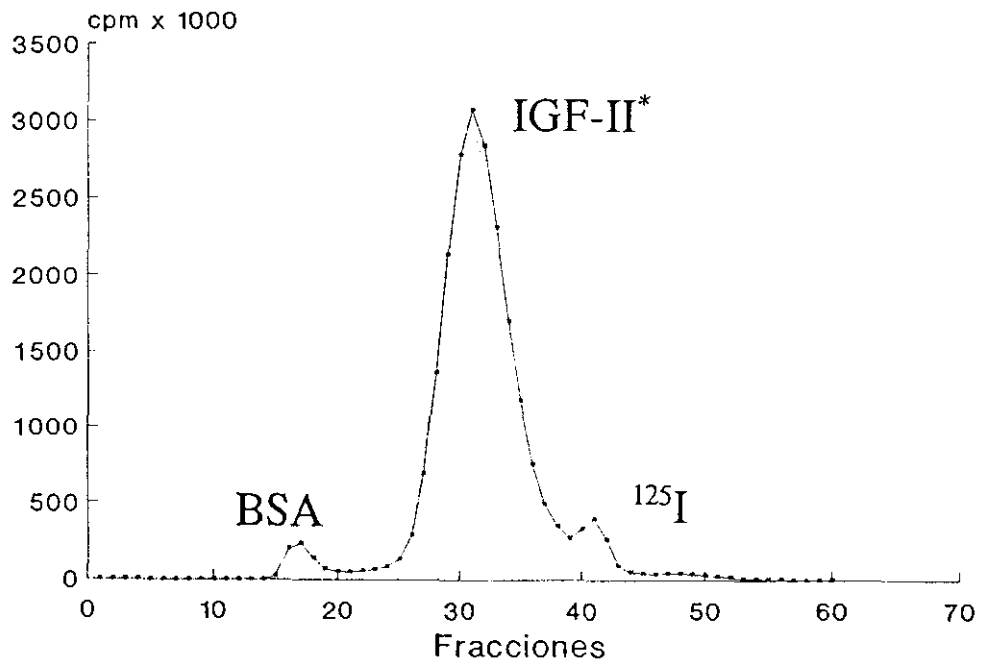
A**MARCAJE IGF-I****B****MARCAJE IGF-II**

Fig 4 Perfil de elución de radiactividad en columna de Sephadex G-50 tras el marcaje de IGF-I (A) o IGF-II (B) con ¹²⁵I por el método de la cloramina T modificado.

Primer anticuerpo. Se utilizó un antisuero policlonal (fracción globulínica) anti-IGF-I obtenido en conejos inmunizados con hIGF-I y el fragmento C-terminal (residuos 5-57) de KabiGen AB (Estocolmo, Suecia) que se presenta en forma de liofilizado. La dilución empleada fue de 1:1.000.

Segundo anticuerpo. Se empleó una suspensión de complejos de anticuerpo y microsefarios obtenidos en oveja y que precipita anticuerpos de conejo (Pharmacia Decanting Suspension 3).

2.9.4.2. Preparación de las muestras.

Las muestras de suero se analizaron después de ser sometidas a la filtración en gel para separar las proteínas ligadoras de IGF. Se evaluaron a una dilución 1:40.

2.9.4.3. Procedimiento.

La curva patrón abarca un rango de concentraciones de 100 a 0.2ng/ml y se analizó por duplicado al igual que las muestras.

Para llevar a cabo el análisis, se añadió el primer anticuerpo a los tubos de las muestras y a los patrones y, a continuación, el radioligando. Después de una incubación a 4°C de 16-20h, se adicionó la suspensión del segundo anticuerpo, se volvieron a incubar durante 30 minutos ahora a temperatura ambiente y se les añadió agua destilada (0.5ml). Finalmente, los tubos se centrifugaron durante 10 minutos a 1.500g y 4°C, se descartó el sobrenadante y se procedió al conteo del precipitado durante dos minutos en un contador de radiactividad γ (Packard Auto-Gamma Cobra II).

2.9.4.4. Cálculos.

Para calcular la concentración de IGF-I en las muestras se empleó un programa en el que se construye la curva patrón según una representación logarítmica, poniendo en abscisas el logaritmo de la concentración de hormona, y en ordenadas la función logarítmica de la proporción de ligamiento B/B_0 .

Esta proporción se calcula por la expresión:

$$B/B_0 = \frac{B-N}{B_0-N}$$

donde, B es la radiactividad ligada de la muestra o patrón correspondiente, B_0 , la media de la radiactividad de los tubos donde el ligamiento es máximo, y N, la media

de la radiactividad ligada a los tubos donde el ligamiento es inespecífico.

La función logarítmica se expresa como:

$$\text{logit } B/B_0 = \ln \frac{B/B_0}{1 - (B/B_0)}$$

Se calculó para cada muestra $\text{logit } B/B_0$, se interpoló en la curva patrón la concentración correspondiente y se calcularon las medias de los duplicados. Por último, el resultado se multiplica por el factor de dilución de cada caso.

2.10. DETERMINACION RADIOINMUNOLOGICA DE T_3 Y T_4 .

La valoración de T_3 y T_4 en suero se realizó en el Centro de Investigaciones Biomédicas del CSIC, en el laboratorio de la Dra. Gabriela Morreale, mediante los RIAs específicos de alta sensibilidad descritos por Weeke y Orskov (1975) y modificados para la rata por Obregón y col. (1979).

De nuevo, damos las gracias a la Dra Gabriela Morreale y a sus colaboradores por la ayuda que nos prestaron.

2.10.1. Marcaje radiactivo de T_3 y T_4 .

El método se basa en una reacción de oxidación con cloramina T (Kjeld, 1975), donde el sustrato (T_3 o T_2) se yoda con ^{125}I o ^{131}I a una yodotironina de un grado superior de yodación. La reacción se detiene con metabisulfito sódico y la separación de las diferentes yodotironinas y el yoduro se lleva a cabo mediante filtración en gel (Sephadex G-25).

2.10.1.1. Material y reactivos.

Hormona. Se emplearon T_2 y T_3 reconstituidas en hidróxido sódico 0.05M, de forma que se consiguiera una concentración final de $10\mu\text{g/ml}$. Estos péptidos también se emplearon para elaborar la curva patrón de los RIAs.

Na ^{125}I . Se presenta con una concentración de 100mCi/ml y es suministrado por Amersham (Amersham Ibérica S.A., Madrid).

Columna. Se emplearon columnas de Sephadex G-25 equilibradas con PBS 0.05M pH 11.9.

2.10.1.2. Procedimiento.

El proceso se llevó a cabo a temperatura ambiente. A una alícuota de la

hormona se le añadió la solución de Na¹²⁵I y la de cloramina T (4mg/ml en PBS 0.05M pH 7.6). Transcurridos 20 segundos se paró la reacción con una disolución de metabisulfito (2.5mg/ml en PBS 0.05M pH 7.6), se transfirió la mezcla de reacción a la columna y se eluyó con PBS 0.05M pH 11.9 a un flujo de 40ml/h.

Se recogieron fracciones de 2ml, y a cada una de ellas se les añadió una gota de ácido clorhídrico 6N para que el pH final fuera neutro. A continuación, se contó una alícuota de cada fracción en un contador de radiactividad γ (Packard Auto-Gamma Cobra II). Los tubos de interés se protegieron con 2ml de metanol y se conservaron a 4°C.

2.10.1.3. Perfil de elución de radiactividad.

El perfil de elución tras el marcaje radiactivo de la hormona presentó tres picos de radiactividad: el primero de ellos correspondió al yodo que no se ha incorporado al péptido, el segundo, a la T₃ marcada y el tercero, a la T₄ yodada.

2.10.2. Desarrollo del RIA de T₃.

2.10.2.1. Material y reactivos.

Patrón. La hormona empleada como standard fue la rT₃ (T₃ de rata) que se resuspendió en hidróxido de sodio 0.05N para proporcionar una concentración de 4 μ g/ml.

Tampón. Se utilizó para la elaboración de la curva patrón y sirvió como base para la preparación de otros tampones del análisis. Está formado por fosfato disódico 0.038M, fosfato sódico 0.002M, mertiolato 0.6mM y BSA al 0.22% (tampón A).

En el ensayo, se empleó también este tampón sin albúmina (tampón C) y otro que tiene como base al tampón A, pero que además incluye en su composición 100mg de cisteína y 600mg de ANSA (competidor de proteínas), es el tampón B.

Radioligando. Se utilizó ¹²⁵I-T₃ que se diluyó en tampón B para proporcionar 6.000-7.000cpm/tubo.

Primer anticuerpo. Se trata de un antisuero de conejo obtenido de Henning Berlín GMBH (Alemania). Se diluyó con tampón A para conseguir un título de 1:50.000.

Segundo anticuerpo. Para precipitar el complejo antígeno-anticuerpo, se empleó una mezcla formada por suero de ternera, tampón C y polietilenglicol al 30% diluido en tampón C en las proporciones: 5:28:67.

2.10.2.2. Procedimiento.

La curva patrón abarca un rango de concentraciones de 0 a 5ng/ml y se analizó por triplicado, al igual que las muestras.

En el análisis, para igualar proteínas, se les añadió a los patrones, un volumen de suero libre de T₃ (10μl), y a las muestras, un volumen de tampón A. Después se adicionaron la hormona marcada y el primer anticuerpo. Tras una noche de incubación, se les adicionó el segundo anticuerpo (1.5ml), se centrifugó y se procedió al conteo del precipitado.

2.10.2.3. Cálculos.

Los niveles de T₃ se conocieron por la representación del logaritmo de la concentración frente a la relación B/T y la corrección del valor por el factor de dilución de las muestras que fue 10.

$$B/T = \frac{C_i - C_b}{C_s} * 100$$

donde, C_i es la radiactividad de un tubo problema, C_b, la radiactividad de los blancos y C_s, la de los standards de conteo.

2.10.3. Desarrollo del RIA de T₄.

2.10.3.1. Material y reactivos.

Patrón. El standard empleado fue la rT₄ (T₄ de rata) que se disolvió en hidróxido de sodio 0.05N para obtener una concentración final de 10μg/ml.

Tampón. Está formado por fosfato sódico 0.002M, fosfato disódico 0.038M, mertiolato 0.6mM y BSA al 0.05% (tampón A). Este tampón sin BSA (tampón B) se diluyó en una proporción 1:4 (tampón A: tampón B) y se empleó para elaborar la curva patrón y diluir las muestras (tampón C). Así mismo, en el análisis se utilizó otro tampón que se preparó a partir del tampón A con BSA al 0.22%, y no 0.05%, por la adición de 100mg de cisteína/l y 600mg de ANSA/l (Tampón D) y otro, a partir del tampón C, al que se le añadieron 100mg de cisteína/l (tampón E).

Radioligando. Se utilizó ¹²⁵I-T₄ diluida en tampón para conseguir 6.000-7.000cpm/tubo.

Primer anticuerpo. Se empleó una γ-globulina de conejo a un título de 1:30.000 diluido en tampón C.

Segundo anticuerpo. Consiste en una mezcla de suero de ternera, tampón E y polietilenglicol (PEG) al 30% diluido en tampón D (5:28:67).

2.10.3.2. Procedimiento.

La curva standard abarca un rango de concentraciones de 0-12.8ng/ml y, al igual que los problemas, se analizó por triplicado. A los patrones se les añadió un volumen de standard y otro de suero libre de T_4 (25 μ l), mientras que las muestras se diluyeron en tampón C en una proporción 1:33; a continuación se adicionaron el radioligando y el antisuero y se incubaron una noche en oscuridad. Al día siguiente, tras la adición del segundo anticuerpo (1.5ml) y la centrifugación de los tubos, se obtuvo un sedimento, cuya radiactividad se contó en un contador γ (Packard Auto-Gamma Cobra II).

2.10.3.3. Cálculos.

La concentración de T_4 se obtuvo por la interpolación en la recta que resulta al representar el logaritmo de la concentración frente a la relación B/T de los valores obtenidos tras el contaje. El factor de corrección de los datos debido a las diluciones fue 0.0667.

2.11. DETERMINACION RADIOINMUNOLOGICA DE INSULINA.

La determinación de la insulina en muestras de plasma se realizó por medio de unos kits comerciales de la casa Incstar.

2.11.1. Material y reactivos.

Patrón. Está constituido por insulina porcina liofilizada prediluida en tampón.

Tampón. Es un liofilizado compuesto por BSA, tampón borato y que incluye timerosal como conservante.

Radioligando. Se utilizó insulina porcina marcada con 125 I y diluida en BSA-tampón borato que además contiene EDTA (ácido diaminotetracético) y timerosal.

Antisuero. Se empleó un liofilizado de antisuero de insulina de cobaya diluido en el tampón del ensayo.

Complejo precipitante (GAGP-PPT). Está formado por un liofilizado que contiene en su composición suero de cobaya normal, precipitado con antisuero de cobaya macho y PEG. Al igual que en el caso de los otros reactivos, se resuspendió en agua destilada en el momento en que se realizó el ensayo.

2.11.2. Procedimiento.

El primer día se preparó la curva standard, que abarca un rango de concentraciones de 4 a 100 μ U/ml (0.16-4ng/ml) y las muestras. A continuación, se adicionó a todos los tubos primero el antisuero (excepto a los tubos que contenían la radiactividad total -T- y a los del ligamiento inespecífico -NSB-) después, la insulina marcada y se incubaron a 4°C durante 16-20 horas. Se añadió el complejo precipitante a todos los tubos excepto a los T, se mantuvieron unos 15-20 minutos a 20-25°C y transcurrido este tiempo se centrifugaron a 760g y 20-25°C durante 20 minutos. Por último, se contó el precipitado en un contador γ (Packard Auto-Gamma Cobra II) durante un minuto.

2.11.3. Cálculos.

Al igual que en los otros RIAs descritos, en este caso, se llegó a conocer la concentración de insulina mediante la representación del logaritmo de la concentración (abscisas) frente a la relación B/B₀ (ordenadas) y la posterior interpolación en esta gráfica de los valores de las muestras.

2.12. DETERMINACION RADIOINMUNOLOGICA DE HORMONA DE CRECIMIENTO (GH).

2.12.1. Preparacion de las hipófisis para el RIA.

Para llevar a cabo el análisis de los niveles de GH en las hipófisis, se debe homogenizar previamente el tejido. La homogenización de las hipófisis se realizó manualmente con ayuda de un potter de vidrio en PBS 0.01M pH 7.6 y el homogenado resultante de esta operación se conservó a -20°C. Las muestras se diluyeron en PBS 0.01M pH 7.6 con BSA al 1% en las proporciones determinadas por tanteo que ahora se detallan en función de la edad y condición del animal:

- ratas neonatales: hipotiroideas, 1:100 y 1:250 y controles, 1:250;
- ratas destetadas: hipotiroideas, 1:500 y 1:1.000 y controles, 1:1.000;
- ratas adultas: hipotiroideas, 1:5.000 y 1:10.000 y controles, 1:10.000.

2.12.2. Marcaje radiactivo de GH.

El marcaje radiactivo de la hormona de crecimiento se llevó a cabo siguiendo el método de la cloramina T (Hunter, 1962). Como ya se explicó en el marcaje radiactivo de IGF-I, la reacción química que tiene lugar es la oxidación del Na¹²⁵I en presencia de una proteína que contiene restos tirosina, y es en estos residuos donde

se incorpora el radioyodo. El proceso se detiene por la adición a la mezcla de metabisulfito, y a continuación, se separa la proteína marcada del yodo radiactivo no incorporado mediante filtración en gel (Sephadex G-50).

2.12.2.1. Material y reactivos.

Hormona: Se empleó rGH (GH de rata), que al igual que todos los reactivos (marcaje y RIA), son suministrados por el National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases (NIDDK, California, USA). La rGH se reconstituyó en NaHCO_3 0.01N (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y se repartió en alícuotas de 25 μl que se conservaron a -20°C . Este péptido también se utilizó para elaborar la curva patrón en el RIA.

Na^{125}I : Se presenta con una concentración de 100mCi/ml y es suministrado por Amersham (Amersham Ibérica, SA, Madrid).

Columna: Se emplearon columnas de Sephadex G-50 equilibradas con veronal 0.02M.

2.12.2.2. Procedimiento.

El proceso se llevó a cabo a temperatura ambiente. Así, a una alícuota de la hormona, se le añadió la solución de Na^{125}I y la solución de cloramina T (3.5mg/ml en PBS 0.05M) recién preparada y se agitó el tubo durante 90 segundos, momento en el que se produjo la yodación del péptido. La reacción se detuvo por la adición de una disolución de metabisulfito (1.7mg/ml en PBS 0.05M) que se preparó extemporáneamente. La mezcla de reacción se transfirió a la columna previamente equilibrada con veronal, tampón que se empleó para eluir las fracciones a un flujo aproximado de 30ml/h. Se recogieron fracciones de 0.5ml, sobre 0.1ml de BSA al 2% en PBS 0.01N, y de estas se contó una alícuota en un contador de radiactividad γ (Packard Auto-Gamma Cobra II). Las fracciones de interés se conservaron a -20°C en PBS-BSA al 2% (dilución 1:5).

2.12.2.3. Cálculo del rendimiento y la actividad específica.

El cálculo del rendimiento y de la actividad específica se llevó a cabo siguiendo lo ya descrito para el marcaje radiactivo de IGFs. El rendimiento obtenido en los marcajes de GH osciló entre un 85-95%, y la actividad específica de la hormona se situó en torno a 75-80 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$.

2.12.2.4. Perfil de elución de radiactividad tras el marcaje radiactivo de GH.

El perfil de elución obtenido tras el marcaje radiactivo de la hormona presenta

dos picos de radiactividad: el primero de ellos corresponde a la hormona marcada, y el segundo al yodo libre que no ha llegado a incorporarse al péptido.

2.12.2.5. Repurificación de la GH marcada.

La GH marcada conserva su actividad durante unos dos meses, sin embargo, con el tiempo se produce un aumento del ligamiento inespecífico en el RIA. No obstante, este inconveniente se supera repurificando las fracciones resultantes del marcaje.

La repurificación se realizó en las mismas condiciones en que se efectuó la purificación tras el marcaje, pero se empleó en este caso una columna de Sephadex G-100 y se recogieron fracciones de mayor volumen (2.5ml). Con esta operación se consiguió la separación de la hormona intacta (segundo pico) de la deteriorada (primer pico) y del yodo radiactivo (tercer pico) que libera el péptido con el paso del tiempo.

2.12.3. Desarrollo del RIA de GH.

2.12.3.1. Material y reactivos.

Patrón. La hormona utilizada como standard fue rGH que se presentó en forma de liofilizado y fue proporcionada por el NIDDK, al igual que el primer y el segundo anticuerpo. Se resuspendió en agua para proporcionar una concentración de $10\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

Tampón. Está constituido por PBS 0.01M pH 7.6, EDTA 0.025M y BSA al 1% (p/v) y se empleó para diluir las muestras, la radiactividad, el primer y el segundo anticuerpo.

Radioligando. Se utilizó ^{125}I -GH que se diluyó en el tampón del RIA para proporcionar unas 8.000cpm/tubo.

Primer anticuerpo. Se presentó como un liofilizado que se reconstituyó en agua (dilución 1:50). Se trata de un antisuero extraído de glándula pituitaria de rata con agua y sulfato de amonio. Se diluyó en suero de mono al 1% a un título de 1:500.000.

Segundo anticuerpo. Se utilizó una gamma-globulina antimono que fue proporcionada por el NIDDK por Antibodies, Inc. (California, USA). Precipita el suero normal de mono y está disuelto en PBS.

2.12.3.2. Procedimiento.

El primer día se prepararon las muestras y la curva patrón, que se analizó por

triplicado y abarcó un rango de concentraciones de 0.03 a 16ng/ml. Las muestras se analizaron por duplicado, y en el caso de las hipófisis, a las diluciones reseñadas.

Los problemas y los patrones se incubaron con los reactivos: se les añadió la dilución del antisuero y el tampón, y se mantuvieron 6 horas a 37°C. A continuación, se adicionó a los tubos el radioligando y se incubaron 18 horas a 37°C. Al día siguiente, se añadió el segundo anticuerpo y se incubaron durante 18 a 24 horas a 4°C. Finalmente, el tercer día, se lavaron con 2ml de PBS 0.01M pH 7.6, se centrifugaron 40 minutos a 760g, y se procedió al conteo de radiactividad del precipitado durante 2 minutos en el contador γ (Packard Auto-Gamma Cobra II).

2.12.3.3. Cálculos.

Como en el caso de los otros RIAs, los valores de GH se llegaron a conocer por la representación del logaritmo de la concentración (abscisas) frente a la relación B/B_0 (ordenadas) y la posterior corrección por el factor de dilución de las muestras; en el caso de las hipófisis, los cálculos se refirieron a mg de tejido.

Destacamos que las determinaciones de GH fueron realizadas con la colaboración de la Dra. Carmen Alvarez Escolá, miembro de nuestro grupo de investigación, y a quien reitero mi agradecimiento por su ayuda.

2.13. DETERMINACION DE LA CONCENTRACION SERICA DE IGF-II POR ANALISIS DE RADIORECEPTOR (RRA).

2.13.1. Fundamento.

Al igual que el RIA, el RRA es un caso particular del radioanálisis competitivo. La competición se establece entre una hormona (IGF-II) marcada y la misma hormona sin marcar por la unión a un receptor específico.

Los receptores se obtuvieron a partir de hígado de rata adulta que contiene receptores de IGF tipo II, y prácticamente carece de receptores tipo I.

2.13.2. Preparación de membrana plasmática particulada de hígado de rata.

Se homogeneizaron los hígados de rata en una solución de sacarosa 0.25M con PMSF 0.5mM en una proporción de 3.5ml/g de tejido. Se reunieron los homogenados y se filtraron a través de una gasa. A continuación, se centrifugaron durante 10 minutos a 600g y 4°C, se recogieron los sobrenadantes y de nuevo se

centrifugaron a 17.000g durante 30 minutos a 4°C. Los sobrenadantes que resultaron se reunieron y se les adicionó cloruro sódico y sulfato de magnesio hasta alcanzar una concentración final de 0.1 y 1M, respectivamente. Después se llevaron a cabo dos centrifugaciones a 40.000g durante 40 minutos y a 4°C, y el sedimento obtenido se resuspendió y homogeneizó en tampón Tris 50mM pH 7.7. Por último, se separó una alícuota de la preparación para determinar la concentración de proteínas según el método de Bradford. Esta preparación se conservó a -80°C repartida en alícuotas.

2.13.3. Desarrollo del RRA de IGF-II.

2.13.3.1. Material y reactivos.

Patrón. Se empleó rhIGF-II (IGF-II humano recombinante) de Boehringer Mannheim que se presenta en forma de liofilizado. Se obtiene de *E. coli*, presenta una pureza superior al 95% y se utilizó en los marcajes.

Tampón. Se empleó el tampón del RIA (PBS 0.01M pH 7.5 con cloruro sódico 0.15M, azida sódica 0.02% y BSA 0.5%). Se utilizó para diluir el patrón y reconstituir los liofilizados de las muestras de suero sometidas a la filtración en gel.

Tampón Tris-HCl. Incluye en su composición Tris base 0.05M y BSA al 0.5% (p/v) y su pH es 7.7. Se empleó para diluir la preparación de membranas y el radioligando, así como para el lavado de los tubos.

Radioligando. Se empleó ¹²⁵I-IGF-II, marcado por el método de la cloramina T (Hunter, 1962) y se diluyó en tampón Tris-HCl para obtener unas 10.000cpm/tubo.

Membrana. Se utilizaron diluidas a una concentración de 1mg proteína/ml en tampón Tris-HCl.

2.13.3.2. Procedimiento.

Este método se llevó a cabo en dos días. El primer día se prepararon las muestras, la curva patrón y se incubaron los reactivos, y en el segundo día, se procedió a la separación de la radiactividad libre y al conteo de los tubos.

La curva patrón comprende un rango de concentraciones de 100 a 0.2ng/ml y, al igual que las muestras, se analizó por triplicado. A los tubos con las muestras y los patrones se les añadió sucesivamente la dilución del radioligando y la de las membranas y se incubaron 20 horas a 4°C. Al día siguiente, se centrifugaron 10 minutos a 12.000rpm y 4°C y se aspiró el sobrenadante. Se lavó el precipitado con tampón Tris-HCl frío (200μl), y de nuevo se centrifugaron los tubos durante 5 minutos a 4°C y 12.000rpm. Finalmente, se contó el precipitado en un contador de

radiactividad γ (Packard Auto-Gamma Cobra II).

2.13.3.3. Cálculos.

La concentración de IGF-II en las muestras se calculó por el procedimiento usado en el RIA de IGF-I.

TECNICAS ELECTROFORETICAS.

Bajo este epígrafe se reúnen una serie de técnicas basadas en la migración que experimentan las especies iónicas en un solvente (en un medio líquido) por la acción de un campo eléctrico.

$$v_i = \mu \cdot E$$

donde, v_i es la velocidad lineal de migración, μ , la movilidad iónica y, finalmente, E, el campo eléctrico continuo.

Así pues, los diferentes iones de una muestra se desplazan bajo el efecto continuo del campo eléctrico, hacia el cátodo o el ánodo según el signo de su carga y a una velocidad propia de cada uno.

Para el análisis de las muestras se emplean soportes inertes (geles de agarosa, poliacrilamida...) que posibilitan:

- a) la utilización de pequeñas cantidades de muestras (del orden de μl) y su clara visualización;
- b) separación de los componentes de la muestra con gran resolución;
- c) y, tiempos de análisis cortos.

2.14. ANALISIS DE LAS PROTEINAS LIGADORAS DE IGF: WESTERN BLOT.

2.14.1. Fundamento.

En el "Western blot", en primer lugar se lleva a cabo una electroforesis en condiciones no reductoras para no desnaturizar las proteínas (transportadoras de glucosa o de IGFs), para separar las distintas IGFbps, y a continuación, dichas proteínas se transfieren a una membrana (de PVDF o nitrocelulosa) que se incubará con anticuerpos específicos contra determinadas IGFbps ("inmunoblot") o con ^{125}I -IGF-I ó II ("ligand blot", Hossenlopp, 1986).

2.14.2. Electroforesis.

Se realizó con el sistema Mini Protean II de Bio Rad (Richmond, California).

2.14.2.1. Preparación del gel.

El gel de poliacrilamida tiene dos zonas diferentes: una breve con una concentración de acrilamida del 5% llamada gel acumulador (alinea las muestras aplicadas) y otra que contiene un 12% de acrilamida que separa las proteínas (gel separador) que corren a su través. La composición del gel separador es la siguiente: agua, Tris-HCl 0.375M pH 8.8, SDS 0.1% (p/v), acrilamida/bis 40%, APS 0.05% (p/v) y TEMED. El gel acumulador incluye en su composición los mismos reactivos que el separador, sólo difieren en el porcentaje de poliacrilamida y en la concentración del Tris-HCl empleado, 0.125M pH 6.8 en el gel acumulador frente a 0.375M pH 8.8. en el gel separador.

2.14.2.2. Preparación de las muestras.

Las muestras se prepararon momentos antes de su aplicación. Se diluyeron 1:10 ("Western ligand blot" e "immunoblot") (Figura 5) en tampón LSB 2x (Laemmli sample buffer, Laemmli, 1970) que está constituido por Tris-HCl 0.0625M pH 6.8, glicerol 10% (v/v), SDS 2% (p/v) y como colorante azul de bromofenol 0.005% (p/v). A continuación, se calentaron 5 minutos a 95°C, y se dejó que tomaran la temperatura ambiente antes de su aplicación.

Como marcador de peso molecular se empleó un patrón de amplio rango (6.5-200kDa) de BioRad.

Finalmente, se aplicaron al gel las muestras y el patrón.

2.14.2.3. Condiciones de electroforesis.

La electroforesis se efectuó en el seno de una disolución formada por glicina 192mM, Tris base 25mM, SDS 0.1% (p/v) en agua destilada bajo una corriente continua de 125 V que se prolongó hasta que el frente de tinción alcanzó el borde inferior del gel.

2.14.3. Electrotransferencia.

La transferencia electroforética se realizó en el sistema Mini-trans-blot de BioRad y se utilizó como soporte para la transferencia una membrana de nitrocelulosa de 0.2 μ m de tamaño de poro.

Una vez concluida la electroforesis se extrajeron los geles y se sumergieron en el tampón de transferencia (Tris base 25mM, glicina 192mM y metanol 20% (p/v) en agua a pH 8.3). A continuación, cada gel se puso en contacto con la membrana de nitrocelulosa y se situaron entre dos láminas de papel Whatmamm 3MM y dos

CURVA DE CALIBRACION DE IGFBP-2

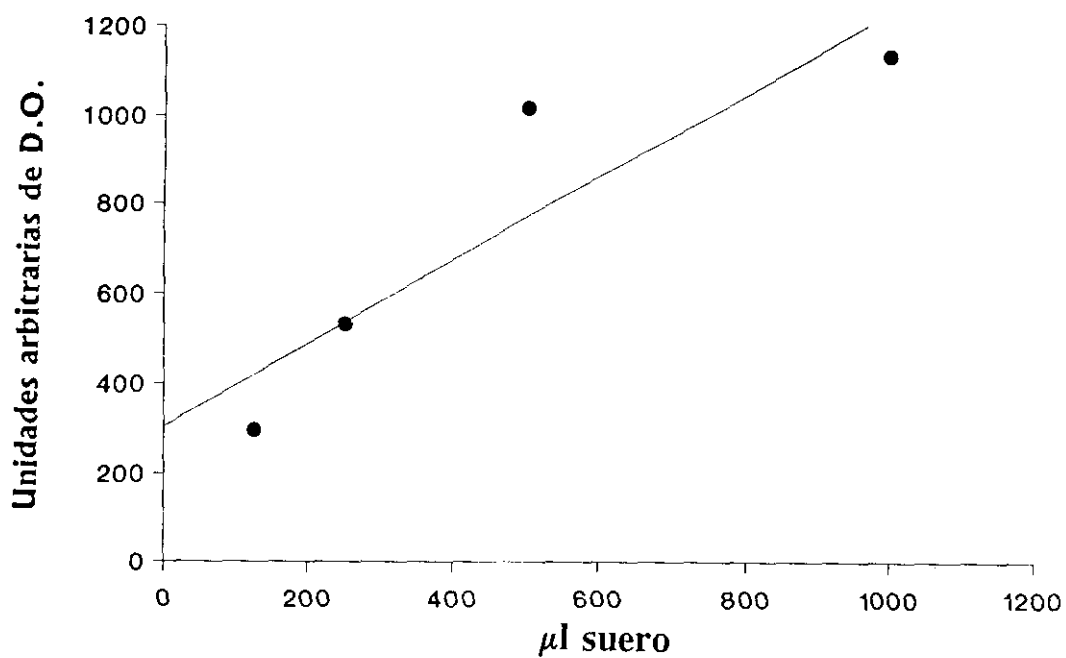
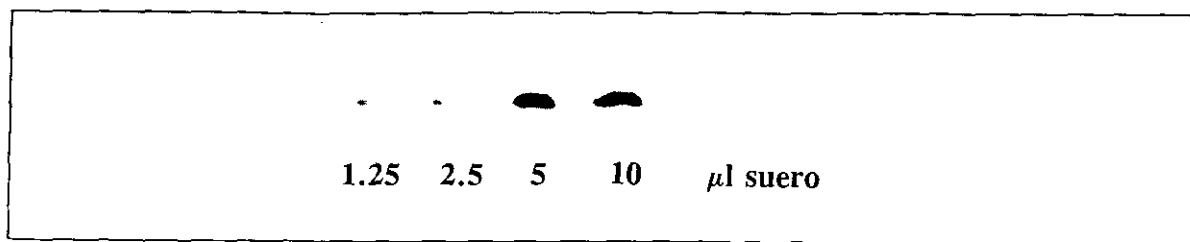


Fig 5 *Curva de calibración de IGFBP-2.*

almohadillas. Este montaje se colocó sobre un soporte para geles que se introdujo en la cubeta de transferencia. El proceso de transferencia se efectuó a 100 V durante 2 horas en el tampón ya señalado.

2.14.4. Western ligand blot.

2.14.4.1. Reactivos.

Los tratamientos posteriores de la membrana se realizaron en un tampón ("ligand blot buffer", LBB) que está formado por Tris-HCl 0.01M pH 7.55, cloruro sódico 0.15M, azida sódica 0.1% (p/v) en agua. Esta disolución fue la base para la preparación de otras:

1. Soluciones para la preparación de la membrana:

- a) Solución de Nonidet- P40 3% (v/v) en LBB.
- b) Solución de BSA al 1% (p/v) en LBB.
- c) Solución de Tween-20 al 0.1% (v/v) en LBB.

2. Solución para la incubación de la membrana. En ella se diluyó el radioligando y estuvo constituida por BSA al 1% (p/v) y Tween-20 al 0.1% (v/v) en LBB.

3. Soluciones para el lavado de la membrana.

- a) Solución de Tween-20 al 0.1% en LBB.
- b) LBB.

2.14.4.2. Preparación de la membrana.

Antes de incubar la membrana con el radioligando se sometió a una serie de lavados con los que se bloquearon sus sitios de unión libre por la exposición a una alta concentración de BSA. Así pues, la membrana se lavó en primer lugar con Nonidet-P40 a temperatura ambiente durante 30 minutos y ligera agitación, a continuación con una solución de BSA durante 2 horas, y finalmente, con una disolución de Tween-20 (10 minutos).

2.14.4.3. Incubación con el radioligando.

Una vez finalizados los lavados, la membrana se incubó sin agitación con una alícuota de una solución de radioligando preparada momentos antes ($1.5 \cdot 10^6$ cpm ^{125}I -IGF-I ó II) durante 18-20 horas a 4°C.

2.14.4.4. Lavado y detección de las IGF-BPs.

Finalizada la incubación, se procedió al lavado de la membrana con ligera agitación para eliminar el exceso de radioligando no incorporado, primero con LBB

y Tween-20 (dos veces) y después con LBB (3 veces) durante 15 minutos a 4°C. A continuación, y una vez seca la membrana, se puso en contacto con una película y entre pantallas intensificadoras a -80°C, procediéndose después a su revelado (Agfa Curex 60).

La integración por volumen de las bandas obtenidas por el Densitómetro Personal de Molecular Dynamics (Sunnyvale, California) se expresó como unidades arbitrarias de la densidad óptica.

2.14.5. Western immunoblot.

2.14.5.1. Reactivos.

El posterior procesamiento de la membrana se llevó a cabo en tampón TBS ("Tris-buffered saline") formado por Tris-HCl 0.05M pH 7.4 y cloruro sódico 0.2M en agua destilada. Esta disolución constituyó la base para la preparación de los siguientes tampones:

1. TBS-Tween: Tampón TBS con Tween-20 al 0.75% (v/v).
2. Solución bloqueante: TBS-Tween con leche en polvo desnatada al 5% (p/v).

Su preparación es extemporánea.

3. Solución de preincubación: TBS con 0.05mg/ml de BSA.

4. Anticuerpo primario: Se trata de un anticuerpo policlonal obtenido en conejos inmunizados contra bIGFBP-2 (de células de riñón). Se empleó al título recomendado por el proveedor (UBI, Inc., NY, USA), 1:2000.

5. Anticuerpo secundario: Se obtiene en cabras inmunizadas con anticuerpo de conejo y es una Inmunoglobulina-G (H+L) conjugada con fosfatasa alcalina (BioRad).

6. Soluciones de revelado:

a) Tampón Tris-MgCl₂ constituido por Tris-HCl 0.1M pH 9.5 y MgCl₂ 0.5mM en agua destilada.

b) Solución NBT: 30mg/ml en N,N-dimetilformamida al 70% (v/v, en agua destilada).

c) Solución BCIP: 15mg/ml en N,N-dimetilformamida.

Las proporciones utilizadas fueron: 100 Tris-MgCl₂: 1 solución NBT: 1 solución BCIP.

2.14.5.2. Preparación de la membrana.

Al igual que sucede en el "ligand blot", se deben bloquear los sitios de unión

libres de la membrana antes de incubarla con el primer anticuerpo; esto se consiguió exponiéndola a una alta concentración de proteína, presente en la leche en polvo.

Todos los lavados e incubaciones se realizaron a temperatura ambiente y con ligera agitación. Así, en primer lugar se lavó la membrana con TBS-Tween durante 5 minutos, para después sustituir este tampón por solución bloqueante donde se mantuvo la membrana durante 30 minutos y, finalmente, se hicieron dos lavados de 5 minutos con TBS-Tween.

2.14.5.3. Incubación con el primer anticuerpo.

Una vez finalizados los lavados, se incubó la membrana durante 2 horas con una alícuota de solución de preincubación donde estaba diluido el anticuerpo primario al título deseado y TBS-Tween. Transcurrido el tiempo de incubación, se lavó la membrana una vez en solución bloqueante y tres en TBS-Tween (5 minutos cada lavado).

2.14.5.4. Incubación con el anticuerpo secundario.

Se incubó ahora la membrana con una alícuota del segundo anticuerpo y TBS-Tween durante un tiempo que osciló entre 1 y 3 horas. A continuación, se lavó la membrana tres veces con TBS-Tween y dos con TBS (5 minutos cada lavado) y se secó entre papeles de filtro.

2.14.5.5. Detección de las IGFbps.

El revelado se basa en una reacción química catalizada por la fosfatasa alcalina conjugada al anticuerpo secundario que genera un producto insoluble de color púrpura sobre la membrana (Bers, 1985).

La membrana se sumergió en la solución de revelado durante el tiempo que se consideró conveniente según el fondo y señal deseados, y para detener la reacción se mantuvo en un recipiente con agua destilada durante 10 minutos. Finalmente, la membrana se dejó secar entre papeles de filtro.

2.14.6. Western immunoblot.

2.14.6.1. Reactivos.

Los tratamientos posteriores de la membrana se realizaron en un tampón (TBS) constituido por Tris-HCl 10mM pH 8 y cloruro sódico 150mM. Este tampón sirvió de base para otras disoluciones empleadas en el análisis:

1. Solución de bloqueo: TBS con leche en polvo desnatada al 5% y Tween al 0.05%.

2. Solución de bloqueo: Está constituida por TBS y Tween al 0.05%.

3. Anticuerpos primarios: Se trata de anticuerpos policlonales (Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA) obtenidos en carneros inmunizados contra péptidos que corresponden a los aminoácidos 254-272 del extremo C-terminal del precursor de la IGFBP-1 de ratón o a los aminoácidos 288-305 del mismo extremo del precursor de la IGFBP-2 de ratón. Se emplearon a un título de 1:100 diluidos en una alícuota de solución de bloqueo.

4. Anticuerpo secundario: Se trata de un complejo formado por una Inmunoglobulina-G-peroxidasa (Santa Cruz Biotechnology) que se diluye en solución de bloqueo a un título de 1:1.000.

En estos experimentos, se empleó como marcador de peso molecular un patrón preteñido de amplio rango (4-250kDa) de Novex.

2.14.6.2. Preparación de la membrana.

Para bloquear los sitios de unión libre de la membrana, esta fue tratada con una solución rica en proteínas lácteas durante 45 minutos, a temperatura ambiente y con ligera agitación.

2.14.6.3. Incubación con el anticuerpo primario.

La incubación de la membrana con el correspondiente anticuerpo se realizó durante una noche a 4°C y con ligera agitación. Después se sumergió la membrana en una solución compuesta por TBS y Tween al 0.05% y se efectuaron tres lavados de 5 minutos, a temperatura ambiente y con agitación.

2.14.6.4. Incubación con el anticuerpo secundario.

La membrana se puso en contacto con el segundo anticuerpo a temperatura ambiente durante 60 minutos, con ligera agitación. A continuación, se realizaron 4 lavados iguales a los anteriores, de 5 minutos de duración, a temperatura ambiente y con agitación; los 3 primeros lavados se efectuaron con TBS y Tween al 0.05%, y el último sólo con TBS.

2.14.6.5. Detección de las IGFbps.

La visualización de las IGFbps se logró mediante la técnica de quimioluminiscencia. La peroxidasa ligada al segundo anticuerpo en presencia del peróxido de hidrógeno oxida al luminol; en este proceso se genera una molécula intermedia emisora de luz que es capaz de impresionar una película. La señal obtenida es proporcional a la cantidad de complejo inmunológico que hay sobre la

membrana, esto es, a la cantidad de proteína (IGFBP-1, 2 o como veremos más adelante, GLUT-1, 2 ó 4) previamente transferida a esta.

La membrana se trató con los reactivos de un kit suministrado por Amersham (ECL), y la intensidad de las bandas obtenidas se cuantificó en un Densitómetro Personal (Molecular Dynamics).

2.15. ANALISIS DE LOS TRANSPORTADORES DE GLUCOSA (GLUTs): WESTERN INMUNOBLOT.

El procedimiento seguido fue la técnica del "Western blot", cuyos detalles se han descrito en el apartado anterior. En este caso, las condiciones para la electroforesis y electrotransferencia, al igual que la composición de los geles de poliacrilamida, fueron las mismas que allí se describieron. No obstante, cabe destacar varios aspectos que fueron distintos en este caso:

a) Las muestras se pusieron en contacto con el LSB a temperatura ambiente durante 30 minutos, no se calentaron.

b) La electrotransferencia no se efectuó sobre una membrana de nitrocelulosa sino sobre una de difluoruro de polivinilideno (Immobilon, Millipore) que previamente había sido sumergida en metanol (30s) y, a continuación, en agua (60s).

c) El marcador de peso molecular utilizado fue la fumarasa (48.500Da) por su similitud con el peso molecular de los GLUTs (Sigma).

2.15.1. Preparación de las muestras.

2.15.1.1. Reactivos.

La extracción de las membranas se llevó a cabo en distintos tampones en función del tejido que se tratara.

1. Tampón de homogeneización de los tejidos musculares y corazón: Está constituido por HEPES 25mM, sacarosa 250mM, EDTA 4mM, benzamidina 25mM, PMSF 0.2mM, inhibidor de tripsina 1U/ml y pepstatina 1 μ M a pH 7.4. Esta disolución también se empleó para la resuspensión de estos tejidos.

2. Tampón de homogeneización del hígado: Está formado por HEPES 25mM, sacarosa 250mM, EDTA 1mM, DTT 3mM, PMSF 0.1mM e inhibidor de tripsina 0.26U/ml a pH 7.4.

3. Tampón de resuspensión del hígado: Se compone de Tris 50mM, sacarosa 250mM, cloruro potásico 100mM y cloruro de magnesio 5mM a pH 7.4.

2.15.1.2. Extracción de las membranas de tejidos musculares y corazón.

El proceso seguido para obtener la fracción membranosa cruda (membranas globales) fue descrito por Santalucía y col. (1992). Los tejidos (0.3-0.5g) se homogeneizaron en 10 volúmenes de tampón de homogeneización y se centrifugaron a 4°C y 15.000g, durante 20 minutos en el caso de los músculos esqueléticos y a 10.000g, 5 minutos cuando se trató de músculo cardíaco. Los sobrenadantes obtenidos se enriquecieron en cloruro de potasio hasta obtener una concentración de 0.8M. Se incubaron 30 minutos a 4°C con agitación y, a continuación, se centrifugaron: el extracto cardíaco a 150.000g, durante 2 horas, y los extractos procedentes del gastrocnemius y el cuádriceps a 200.000g, 1.5 horas. El sedimento obtenido se resuspendió en el tampón empleado para la homogeneización, y tras determinar la concentración proteica del extracto se almacenó a -80°C hasta el momento de su análisis.

2.15.1.3. Extracción de las membranas hepáticas.

El método aplicado para extraer la fracción membranosa fue una adaptación del descrito por Thorens y col. (1988). Se partió de unos 0.2g de tejido, que una vez homogeneizados en 10 volúmenes de tampón, se centrifugaron a 4°C y 8.000g durante 10 minutos. El sobrenadante se volvió a centrifugar durante 20 minutos a la misma velocidad y el nuevo sobrenadante se centrifugó a 150.000g durante 40 minutos. El sedimento obtenido se resuspendió en un tampón distinto al de homogeneización y finalmente se analizó su concentración proteica y se almacenó a -80°C.

2.15.2. Western immunoblot. (Figura 6)

2.15.2.1. Reactivos.

1. Solución de bloqueo: PBS (NaCl 0.135M, KCl 2.7mM, KH₂PO₄ 1.4mM, Na₂HPO₄ 8mM, pH 7.4) con leche en polvo desnatada al 5%. Su preparación es extemporánea.

2. Anticuerpos primarios: Se trata de anticuerpos policlonales (Biogénesis) obtenidos en conejos inmunizados contra:

- un péptido que incluye los 12 aminoácidos del extremo C-terminal del transportador (anti-GLUT-4);

- un péptido sintético de secuencia basada en la prevista del GLUT del cerebro de la rata (anti-GLUT-1);

CURVA DE CALIBRACION DE GLUT-1

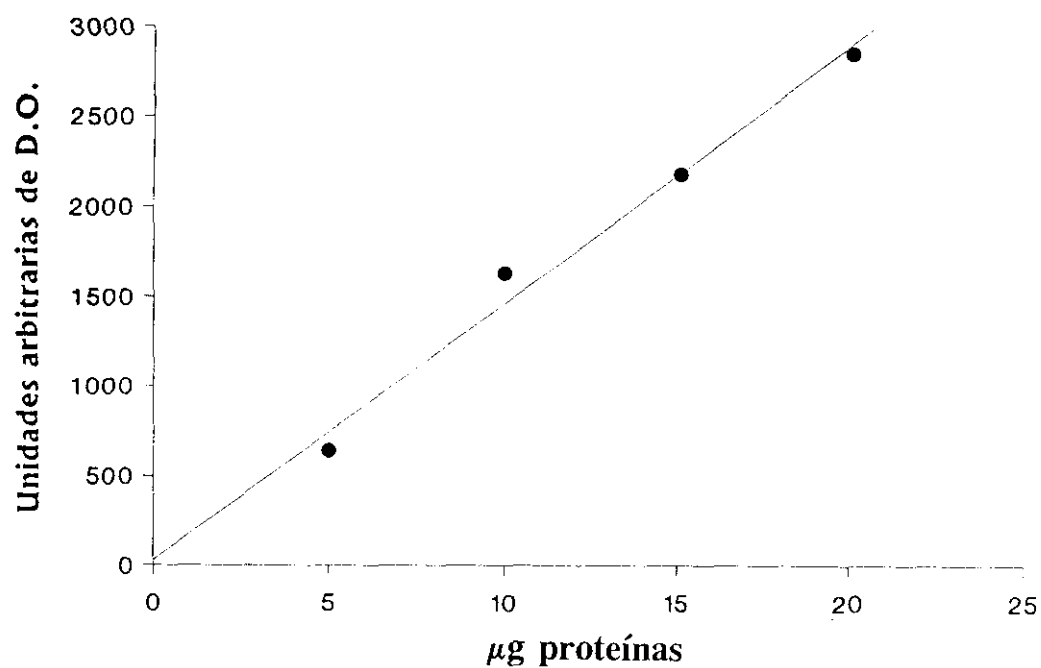
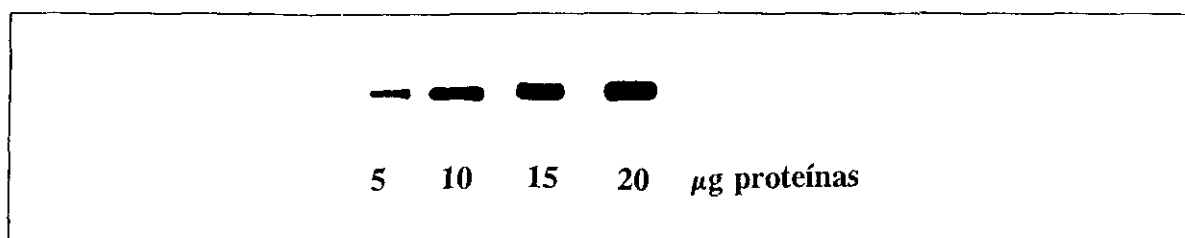


Fig 6 *Curva de calibración de GLUT-1.*

- un péptido sintético que incluye los 25 aminoácidos C-terminales de la secuencia del GLUT-2 de rata y otro péptido que contiene los 13 aminoácidos terminales del mismo tramo.

Se utilizaron a un título de 1:1.000 para el GLUT-2 y 4 y de 1:5.000 para GLUT-1 diluidos en PBS con BSA al 3% y azida sódica al 0.02%.

3. Solución de lavado: PBS con Tween al 0.1%.

4. Anticuerpo secundario: Consiste en un complejo formado por Inmunoglobulina-G-peroxidasa (Sigma) que se diluyó en PBS con leche desnatada al 1% y Tween al 0.05%.

2.15.2.2. Preparación de la membrana.

Después de la electrotransferencia se procedió al bloqueo de los sitios de ligadura inespecífica de la membrana mediante el tratamiento con una solución rica en proteínas lácteas durante 2 horas, con ligera agitación y a temperatura ambiente.

2.15.2.3. Incubación con el anticuerpo primario.

Se incubó la membrana con el anticuerpo correspondiente durante una noche a 4°C y con una ligera agitación. A continuación, se sumergió la membrana en una solución de PBS con Tween y se hicieron 4 lavados de 10 minutos a 37°C y con agitación.

2.15.2.4. Incubación con el anticuerpo secundario.

Se puso en contacto ahora la membrana con el segundo anticuerpo durante 60 minutos, a temperatura ambiente y con ligera agitación. Transcurrido el tiempo de incubación se realizaron 4 lavados iguales a los anteriores (10 minutos, 37°C y con agitación).

2.15.2.5. Detección de los GLUTs.

Para visualizar los GLUTs se utilizó la técnica de quimioluminiscencia, y la cuantificación del volumen de la mancha se realizó en un densitómetro (Molecular Dynamics).

Destacamos que la puesta a punto del método de determinación de los transportadores de glucosa fue realizada con la colaboración del Dr. Fernando Escrivá Pons, perteneciente a nuestro grupo de investigación, a quien agradecemos de nuevo su ayuda desinteresada.

2.16. ANALISIS DE EXPRESION DE IGFs E IGFBPs: ENSAYO DE PROTECCION DE RIBONUCLEASAS.

2.16.1. Extracción del ARN total.

2.16.1.1. Preparación de las muestras.

El ARN total se preparó por homogeneización de los tejidos en tiocianato de guanidina según el método descrito por Chomczynski y Sacchi (1987). Se partió así de una pequeña cantidad de hígado que se homogeneizó en una disolución formada por un 45% de solución D (tiocianato de guanidina 4M, citrato sódico 25mM pH 8 y lauril sarcosina 0.5%), 50% de fenol, 4% de acetato sódico 2M y un 10% de CIA (cloroformo y alcohol isoamílico en una proporción 24:1). El ARN así obtenido se purificó mediante una segunda extracción, se resuspendió en EDTA 0.5mM y, por último, se procedió a su valoración.

1. Valoración del ARN.

a) Cuantitativa.

El ARN total se cuantificó comparando la absorbancia de la muestra con un blanco (EDTA 0.5mM y agua) a tres longitudes de onda diferentes: 260nm (máximo de absorción del ADN y ARN), 280nm (máximo de absorción de las proteínas) y 310nm (máximo de absorción de impurezas). Esta operación nos permitió conocer la concentración de la muestra (medida de la absorbancia a 260nm), eliminar las interferencias debidas a las impurezas y también estimar la calidad del ARN extraído mediante el cociente de la absorbancia a 260 y 280nm, de manera que las muestras cuya relación 260/280 no oscilaba entre 1.7 y 2.2 fueron desechadas.

b) Cualitativa: Electroforesis.

Las muestras se sometieron a una electroforesis en gel de agarosa, lo que nos permitió confirmar la integridad del ARN y normalizar su cantidad en las distintas calles.

- *Preparación del gel:* Para preparar el gel se hirvió la agarosa disuelta en la solución tamponadora (Mops 20mM, acetato de sodio 5mM y EDTA 1mM) en una proporción del 1.1%. A continuación, se le adicionó formaldehído (15%) y se esperó hasta su compactación.

- *Preparación de las muestras:* Las muestras se prepararon momentos antes de su aplicación. Se tomó el volumen necesario para aplicar una cantidad de ARN determinada y se igualaron volúmenes con agua. A continuación, se le adicionó un

volumen de tampón desnaturante (67% formamida, 13% de formaldehído y 20% de Mops 0.2M, acetato de sodio 50mM y EDTA 10mM) y un 4% de bromuro de etidio para teñir las bandas de ARN ribosomal 18 y 28 s. Finalmente, se calentaron las muestras durante 5 minutos a 65°C y se les añadió un 10% de azul de bromofenol (colorante de la electroforesis).

- *Condiciones de la electroforesis:* Para la electroforesis se empleó el sistema Subcell Electrophoresis Cell de BioRad (Richmond, CA) y se empleó como tampón electrodo Mops (Mops 20mM, acetato de sodio 5mM, EDTA 1mM). La electroforesis se efectuó con corriente continua a 50 V durante 4 horas.

2.16.2. Ensayo de protección de ribonucleasas.

2.16.2.1. Fundamento.

El análisis se basa en la hibridación en solución de una ribosonda con el ARN de una muestra, la digestión de los fragmentos no hibridados y la posterior separación de esos híbridos en geles de poliacrilamida. Para ello, se parte de un ADNc plasmídico donde se encuentra el inserto correspondiente a los diferentes IGFs e IGFbps. Así, en presencia de una ARN polimerasa, y a partir del promotor del ADN plasmídico, se inicia la síntesis de una cadena de ARN marcada radiactivamente con ³²P-UTP (ribosonda) que va a ser complementaria a la cadena de ADN. A continuación, se adiciona la ribosonda a la muestra de ARN donde hibridará con los transcritos de ARN complementarios. Finalmente, los fragmentos de ARN no hibridados son degradados por las ARNasas y los híbridos (ARN-ARN) se separan en geles de poliacrilamida.

2.16.2.2. Preparación de las muestras.

Después de comprobar la integridad del ARN y normalizada su cantidad para los distintos grupos experimentales, se prepararon las muestras para su análisis.

La cantidad de ARN total hepático utilizado para los diferentes estudios fue de 20µg; se igualaron los volúmenes de las muestras con agua DEPC y se dejaron precipitando en 0.1 volúmenes de acetato sódico 3M y 2.5 volúmenes de etanol puro a -20°C hasta el momento de su análisis.

2.16.2.3. Síntesis de la ribosonda.

2.16.2.3.1. Reactivos.

1. ARNasa A (50u/mg): enzima extraída de páncreas porcino y proporcionada por Boehringer Mannheim (Leverkusen, Alemania).

2. Proteinasa K (20u/mg): se trata de una endopeptidasa obtenida del *Tritirachum album* (Boehringer Mannheim).

3. EcoRI (10u/ μ l): enzima de restricción servida por Boehringer Mannheim.

4. Hind III (10u/ μ l): enzima de restricción obtenida de Boehringer Mannheim.

5. Sistema ribosonda Gemini III Care: se empleó para generar las sondas de ARN (Promega, Madison, WI, USA) e incluía los componentes necesarios para la reacción de transcripción, como son: TSC (tampón de transcripción), DTT (antioxidante), ARNsin (inhibidor de ARNasas), dNTPs (nucleótidos no marcados: dATP, dCTP, dGTP y dUTP), ARN polimerasas (T7 y SP6).

6. ADNasa I (10u/ μ l): enzima extraída de páncreas porcino, libre de ARNasas que fue adquirida de Boehringer Mannheim.

7. 32 P-UTP (10mCi/ml): nucleótido marcado (Nuclear Ibérica, Madrid).

2.16.2.3.2. Obtención del plásmido.

1. Crecimiento de las bacterias.

Las bacterias se sembraron en un medio constituido por agar y ampicilina, lo que nos permitió el aislamiento de las cepas de *E. coli* resistentes a este antibiótico, ya que son estas las que presentaron el plásmido que incluía el ADNc de los IGFs y las IGFbPs.

Una vez aisladas las bacterias, se cultivó una colonia en un caldo LB (triptona, cloruro sódico y extracto de levadura) con ampicilina (50 μ g/ml) a 37°C durante 8 horas.

2. Aislamiento del plásmido.

Para extraer el ADNc plasmídico se rompió la pared bacteriana mediante la adición de una pequeña cantidad de lizozima, y la membrana plasmática, con ayuda de la solución de lisis (hidróxido sódico 2.4mM y SDS 0.12%) y se precipitaron las proteínas y el ADN cromosómico con acetato potásico 1.5M pH 4.5 y el ADN plasmídico con isopropanol. Este ADN plasmídico así obtenido se purificó mediante la adición de ARNasa A (10mg/ml) y proteinasa K (250 μ g/ml) que eliminaron el ARN y las proteínas, respectivamente. Tras la adición de PMSF, se añadió fenol a la mezcla y se reprecipitó el ADN plasmídico con acetato sódico 0.15mM y un 0.38% de etanol.

El ADN plasmídico se resuspendió en TE pH 8 (Tris base 10mM y EDTA 0.1mM) y se procedió a su valoración.

3. Valoración del ADN.

a) Cuantitativa.

Al igual que en el caso de la valoración del ARN, la concentración del ADN se cuantificó por la medida de las absorbancias de la muestra (ADN y agua) frente a un blanco (TE y agua) a las tres longitudes de onda ya mencionadas: 260, 280 y 310nm. También, como en el caso del ARN ya mencionado, se mostró una especial atención al cociente resultante de la relación 260/280.

b) Cualitativa: Electroforesis.

Las muestras de ADN plasmídico se sometieron a una electroforesis en gel de agarosa para confirmar su integridad.

- *Preparación del gel:* Se hirvió una proporción de agarosa del 1% en solución tampón (TAE pH 7.2, Tris base 1.6M, acetato sódico 0.8M, EDTA 40mM) y cuando la mezcla estuvo transparente, se dejó enfriar unos minutos y se vertió en el soporte.

- *Preparación de las muestras:* Se tomó una pequeña cantidad de muestra (1-1.5 μ l), se diluyó en el tampón de electroforesis (1:5) y se le adicionó un 10% de colorante (azul de bromofenol).

En todos los geles se incluyó además un standard (Lambda DNA-Hind III) que nos ayudó a conocer la concentración de cada banda por su intensidad y su peso molecular. Este standard fue tratado de la misma manera que las muestras.

- *Condiciones de la electroforesis:* Para la electroforesis se empleó el sistema Mini-Subcell Electrophoresis Cell de BioRad (Richmond, CA) y se utilizó como tampón de electrodo TAE con bromuro de etidio al 0.075%. La electroforesis se realizó con corriente continua a 70 V durante una hora.

2.16.2.3.3. Linearización del plásmido.

Una vez comprobada la integridad del ADNc se procedió a linearizar el inserto en el que se encuentra el vector que expresa los IGFs y las IGFbPs. Esto se consiguió incubando una cantidad de ADNc plasmídico (200 μ g-1mg) con la enzima de restricción y su tampón específicos para cada inserto (Tabla 2):

Tabla 2.- Enzimas de restricción.

| ADNc | INSERTO | ENZIMA DE RESTRICCIÓN | TAMPON |
|---------|---------|-----------------------|--------|
| IGF-I | pGEM-3 | Hind III | B |
| IGF-II | pGEM-3 | Hind III | B |
| IGFBP-1 | pGEM-3 | Hind III | B |
| IGFBP-2 | pGEM-4Z | Hind III | B |
| IGFBP-3 | pGEM-4Z | EcoRI | H |

La incubación con la enzima se realizó a 37°C durante 8 horas y en las proporciones: 83 agua: 6 ADN: 10 buffer RE: 1 RE. A continuación, y una vez terminada la digestión se procedió a purificar el plásmido mediante repetidas extracciones con fenol y por último, por precipitación con 0.83% de etanol puro y acetato sódico 0.12mM.

El ADNc plasmídico se resuspendió en TE y se valoró para comprobar su correcta linearización. En este caso, el gel mostró una única banda correspondiente al ADN linearizado y el standard Lambda DNA-Hind III (490µg/ml, Promega) nos permitió comprobar que su peso molecular correspondía efectivamente a dicho inserto.

2.16.2.3.4. Marcaje de la ribosonda.

Esta etapa incluye dos partes: reacción de transcripción (síntesis de la sonda de ARN) y reacción de la ADNasa (destrucción del ADNc plasmídico).

1. Reacción de transcripción.

Las ribosondas se construyeron según las técnicas descritas por Lowe y col. (1987). Se generaron las sondas marcadas por la incubación del plásmido linearizado (200-400ng/µl) con ³²P-UTP (α) y con los demás nucleótidos fríos (dATP, dGTP y dCTP) en presencia de la ARN polimerasa adecuada (Tabla 3) y de esta manera, se construyeron ribosondas antisentido (complementarias con el ADN).

Tabla 3.- ARN polimerasas.

| RIBOSONDA | ARN POLIMERASA | TAMAÑO FRAGMENTO PROTEGIDO |
|-----------|----------------|----------------------------|
| IGF-I | T7 | IGF-Ia 224bp y Ib 386bp |
| IGF-II | T7 | 500bp |
| IGFBP-1 | SP6 | 300 y 700bp |
| IGFBP-2 | SP6 | 550bp |
| IGFBP-3 | T7 | 343bp |

2. Reacción de la ARNasa.

Se procedió a la eliminación del ADN mediante la digestión con la ADNasa I y a continuación, a la purificación del ARN por medio de extracciones con fenol y una primera precipitación con acetato sódico 0.06mM y 70% de etanol. Después se volvió a precipitar con acetato sódico 0.04mM y un 98% de etanol y se procedió al conteo de una pequeña alícuota (1 μ l) en un contador de centelleo (1209 Rackbeta LKB Wallac).

2.16.2.3.5. Hibridación en solución.

2.16.2.3.5.1. Reactivos.

1. ARNasa T₁ (100.000u/ml): enzima obtenida de *Aspergillus oryzae* y proporcionada por Boehringer Mannheim.

2. ARNt: se obtiene a partir de la levadura de la cerveza y ayuda a precipitar el ARNm (Boehringer Mannheim).

2.16.2.3.5.2. Hibridación de la ribosonda.

El ARN total hepático (20 μ g) obtenido de los diferentes grupos experimentales fue hibridado con 500.000cpm de la ribosonda marcada durante 18 horas a 45°C en una solución que contenía formamida al 75%, Tris 80mM, EDTA 4mM, cloruro sódico 1.6M y SDS al 0.4%.

2.16.2.3.5.3. Digestión de la ARNasa.

La digestión de los fragmentos de ARN no hibridados se realizó con 40 μ g/ml de ARNasa A y 2 μ g/ml de ARNasa T₁ (Lowe, 1987; Hernández, 1990) durante una hora a 37°C. A continuación, se purificaron los fragmentos protegidos, previa eliminación de las ARNasas con ayuda de proteinasa K (0.2 μ g/ml), mediante la extracción con fenol y cloroformo seguida de una precipitación con etanol. Finalmente, los híbridos fueron sometidos a la electroforesis.

2.16.2.3.5.4. Electroforesis.

Los híbridos protegidos (ARN-ARN) se sometieron a electroforesis en gel desnaturalizante y se empleó el sistema Sequi-gen II Sequencing Cell de BioRad.

1. Preparación del gel.

La polimerización del gel se produjo en el aparato, y se llevó a cabo por la adición a una solución formada por poliacrilamida 8%, urea 8M y TBE 5% (Tris base 1M y EDTA disódico 20mM), un 0.037% de TEMED y APS 0.13mM. El espesor del gel fue de 0.2 mm.

2. Preparación de las muestras.

Las muestras fueron tratadas con un tampón que contenía un colorante de electroforesis constituido por xileno cianol al 1% y azul de bromofenol al 1%. A continuación, se calentaron 3 minutos a 95°C y se enfriaron en hielo.

En todos los geles se incluyeron, además de las muestras, carriles para la ribosonda no tratada con ARNasas (control negativo) y para la ribosonda digerida con ARNasas (control positivo).

3. Condiciones de la electroforesis.

Se efectuó en tampón de electrodo TBE (Tris base 1M, ácido bórico 1M, EDTA disódico 20mM) a 40 W hasta que el frente de tinción del colorante alcanzó la parte inferior del gel.

2.16.2.3.5.5. Cuantificación densitométrica.

La autorradiografía se realizó a -80°C poniendo en contacto el gel con una película. Las bandas, que representan los fragmentos protegidos, se cuantificaron por densitometría (Molecular Dynamics).

Destacamos y agradecemos de nuevo la colaboración del Dr. Luis Goya Suárez, compañero de nuestro grupo de investigación, por su ayuda en la puesta a punto del análisis de protección de la RNasa.

2.17. OTRAS DETERMINACIONES ANALITICAS.

2.17.1. Análisis de la glucemia.

2.17.1.1. Glucosa en sangre.

La determinación se realizó en un analizador Reflolux II M (Boehringer Mannheim); se trata de un aparato portátil frecuentemente utilizado por las personas

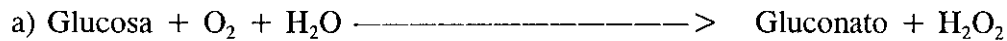
diabéticas para el autocontrol de su glucemia. Es un fotómetro de reflexión cuyo funcionamiento se basa en la coloración de una tira de plástico en cuyo extremo hay una zona impregnada de reactivo. Dicha zona se divide en dos mitades que se colorean con distinta intensidad y son leídas por un sistema de doble haz, lo que permite un amplio intervalo de medición (10-500mg/100ml). El tiempo total empleado en la determinación fue de 2 minutos.

2.17.1.2. Glucosa en sangre desproteïnizada.

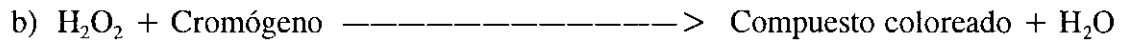
La desproteïnización de la sangre (30µl) se efectuó con una mezcla a partes iguales (150µl) de sulfato de cinc e hidróxido de bario (mezcla de Somogyi). A continuación, se centrifugó durante 5 minutos a 13.000rpm y se analizó la glucosa por el método de la glucosa oxidasa (GOD) en 50µl del sobrenadante.

Este análisis se basa en que la glucosa-oxidasa cataliza la oxidación de la glucosa a gluconato, reacción que se acopla a una oxidación de un cromógeno que genera un compuesto coloreado por la acción de la peroxidasa (POD):

GOD



POD



La medida de la absorbancia a 420nm (máximo del compuesto coloreado) de las muestras se comparó con la ofrecida por una solución patrón de glucosa de 9.1mg/ml (Boehringer Mannheim), lo que permitió el cálculo de la concentración sanguínea de glucosa según la expresión:

$$\frac{A_{problema}}{A_{patron}} \times 100 = mg \text{ glucosa}/100 \text{ ml sangre}$$

2.17.2. Determinación de las proteínas.

Las proteínas de los diferentes extractos crudos de membrana se determinaron por el método de Bradford (1976), utilizando una solución de 1mg/ml de γ- globulina como standard (Sigma). Se trata de un ensayo colorimétrico basado en el cambio de absorbancia que experimenta una solución ácida de Coomassie Brilliant Blue G-250

(465nm) cuando se pone en contacto con proteínas (595nm).

Se preparó una curva patrón a partir de la solución standard que abarcó desde 0-40mg/ml. A continuación, a los tubos de la curva patrón y a los problemas se les añadió 1ml de reactivo de coloración (BioRad Potein Assay) previamente diluido (1:5) y filtrado. Por último, tras 5 minutos de incubación en la oscuridad, se procedió a la lectura de los tubos en el espectrofotómetro a 595nm.

La concentración proteica de los extractos de membrana se conoció por la interpolación de los valores de sus absorbancias sobre la recta de la curva patrón.

2.18. CALCULOS ESTADISTICOS.

Los resultados se expresan como media \pm desviación standard (D.S.).

$$D.S. = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}} \quad E.S. = \frac{D.S.}{\sqrt{n}}$$

El número de datos de cada población (n) se detalla en cada experimento concreto.

En todos los casos, de manera previa al análisis estadístico pertinente, se aplicó el test de la X^2 para rechazar aquellos datos que se hallaban sensiblemente alejados de la media y que no se incluían dentro del intervalo

$$\bar{x} \pm \sqrt{\chi^2 \sum_{i=1}^{i=n} \left(\frac{\bar{x} - x_i}{n - 1} \right)^2}$$

donde X^2 se determinó en las tablas correspondientes en función del número de datos que quedaban fuera del intervalo definido.

2.18.1. Análisis de la varianza.

El grado de significación estadística de la diferencia entre las medias de dos poblaciones se determinó mediante el análisis de la varianza (ANOVA) de una vía (muestras independientes) o de dos vías (muestras apareadas). Este análisis consiste en comparar las varianzas S_D^2 (variabilidad de los datos dentro de cada muestra debida sólo al azar) y S_E^2 (variabilidad entre las muestras debida al azar y, si las

medias son distintas, a que las muestras proceden de poblaciones distintas) por el procedimiento de la F de Snedecor (Snedecor, 1956). Cuando el ANOVA es significativo o se busca qué media son iguales y cuáles distintas, se compara la cantidad experimental

$$t_{exp} = \frac{|\bar{x}_i - \bar{x}_j|}{\sqrt{S_D^2 \left(\frac{1}{n_i} + \frac{1}{n_j} \right)}}$$

con una $t_{\alpha}(f;k)$ con f = número de datos totales - número de grupos y k = número de comparaciones a analizar. Esta cantidad t_{α} se determina en las tablas correspondientes según el test a aplicar, que depende a su vez del objetivo y la planificación del experimento. Una diferencia se consideró significativa a partir de $p < 0.05$.

2.18.2. Regresión lineal y correlación.

El análisis de regresión lineal se llevó a cabo por el método de los mínimos cuadrados. Para verificar si la correlación obtenida era significativa se comparó el valor experimental (t_{exp}) con una t_{α} de $n-2$ grados de libertad:

$$t_{exp} = \sqrt{\frac{(n-2) r^2}{1-r^2}}$$

donde r es el coeficiente de correlación y n el número de parejas de datos.

Se consideró que había significación a partir de $p < 0.05$.

RESULTADOS

3. RESULTADOS.

3.1. TIROIDECTOMIA (T) Y TRATAMIENTO CON METIMAZOL (MMI) EN PERIODO NEONATAL.

3.1.1. Evolución del peso corporal.

Se estudia el peso corporal de los animales neonatales hipotiroideos de 10, 15 y 20 días de vida, tanto de los tiroidectomizados quirúrgicamente (5, 10 y 15 días después de la operación) como de los tratados con MMI.

La Tabla 4 muestra el esperado incremento del peso de los animales en relación a su edad, tanto en la población control como en las hipotiroideas (tiroidectomizada y tratada con MMI), aunque siempre el peso corporal estuvo disminuido respecto a las ratas control en ambas poblaciones hipotiroideas. No obstante, cabe destacar que esta disminución en el peso de los animales hipotiroideos fue más acusada en el caso de la población tiroidectomizada (a los 10 días de vida fue de un 9.28% y, a los 20 días de vida, de un 40.19%) que en la tratada con MMI (a los 10 días de vida fue de un 0.47% y, a los 20 días de vida, de un 17.45%) respecto a los controles, sin embargo, en ambos casos, a los 10 días de vida, la diferencia encontrada respecto a la población control estaba ya disminuida.

3.1.2. Niveles séricos de T_3 y T_4 y plasmáticos e hipofisarios de GH.

De un modo análogo a lo que sucedía con el peso corporal, las hormonas tiroideas circulantes disminuyeron en ambos grupos de animales neonatales hipotiroideos respecto al control (Figura 7) y ya, a los 10 días de vida (5 días después de la operación), se encontró una diferencia entre los niveles de T_3 y T_4 de las poblaciones hipotiroideas (tiroidectomizada y tratada con MMI) respecto a la control. La disminución en las cifras de T_3 a esta edad (10 días de vida) fue de un 55.29% para las ratas tratadas con MMI y de un 70.64% para las tiroidectomizadas respecto a los animales control, mientras que en el caso de la T_4 , el descenso en los valores circulantes fue de un 92.77% y un 91.19% para aquellas ratas a las que se le administró MMI y operadas, respectivamente, siempre respecto a los valores control a los 10 días de vida; por consiguiente, los animales tratados con MMI también mostraron unos niveles de hormonas tiroideas muy disminuidos respecto a los de la población control, aunque los niveles de descenso de T_3 no fueron tan bajos como en las tiroidectomizadas.

En los animales tiroidectomizados, de forma inesperada, los niveles

Tabla 4.- Peso corporal, niveles circulantes de glucosa, GH y contenido hipofisario de GH de ratas neonatales tiroidectomizadas (T), controles y tratadas con MMI (MMI) sacrificadas a los 10, 15 y 20 días de vida (5, 10 y 15 días después de la tiroidectomía) (ddT). Media de 8-10 animales \pm DS.

| | | DIAS DESPUES T (ddT) | | |
|------------------------------|-----------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| | | Días de vida () | | |
| | | 5 ddT (10) | 10 ddT (15) | 15 ddT (20) |
| Peso corporal (g) | T | 15.35 \pm 1.02 ^a | 23.11 \pm 1.23 ^a | 24.85 \pm 0.83 ^a |
| | Controles | 16.92 \pm 0.47 | 30.29 \pm 0.29 | 41.55 \pm 0.71 |
| | MMI | 16.84 \pm 0.35 ^{a,b} | 28.09 \pm 0.27 ^{a,b} | 34.30 \pm 0.95 ^{a,b} |
| GH plasmática (ng/ml) | T | 226.93 \pm 38.02 ^a | 81.78 \pm 16.01 | 7.70 \pm 0.52 ^a |
| | Controles | 110.34 \pm 13.21 | 71.76 \pm 2.20 | 2.21 \pm 0.15 |
| | MMI | 26.30 \pm 1.79 ^{a,b} | 4.81 \pm 0.26 ^{a,b} | 2.57 \pm 0.71 ^b |
| GH hipofisaria (μ g/mg) | T | 3.69 \pm 0.01 ^a | 2.97 \pm 0.02 | 11.55 \pm 0.15 ^a |
| | Controles | 2.57 \pm 0.09 | 3.00 \pm 0.06 | 11.13 \pm 0.35 |
| | MMI | 1.39 \pm 0.01 ^{a,b} | 2.79 \pm 0.08 ^a | 10.32 \pm 0.08 ^{a,b} |
| Glucemia (mg/100ml) | T | 103.79 \pm 2.96 ^a | 113,41 \pm 1.08 ^a | 105.92 \pm 4.85 ^a |
| | Controles | 124,31 \pm 1.17 | 124,91 \pm 3.09 | 131.62 \pm 1.69 |
| | MMI | 122,61 \pm 1.21 ^b | 118.54 \pm 2.57 ^b | 127.29 \pm 4.35 ^b |

^ap < 0.05 respecto a las ratas C

^bp < 0.05 respecto a las ratas T

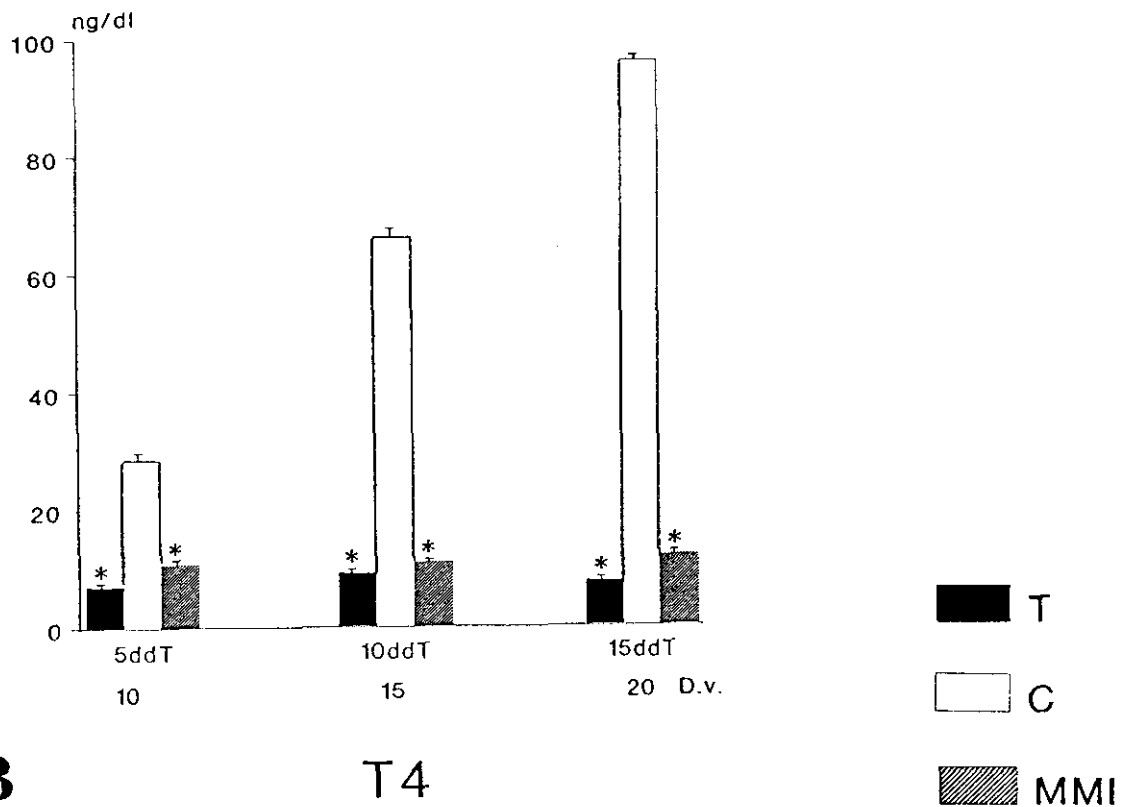
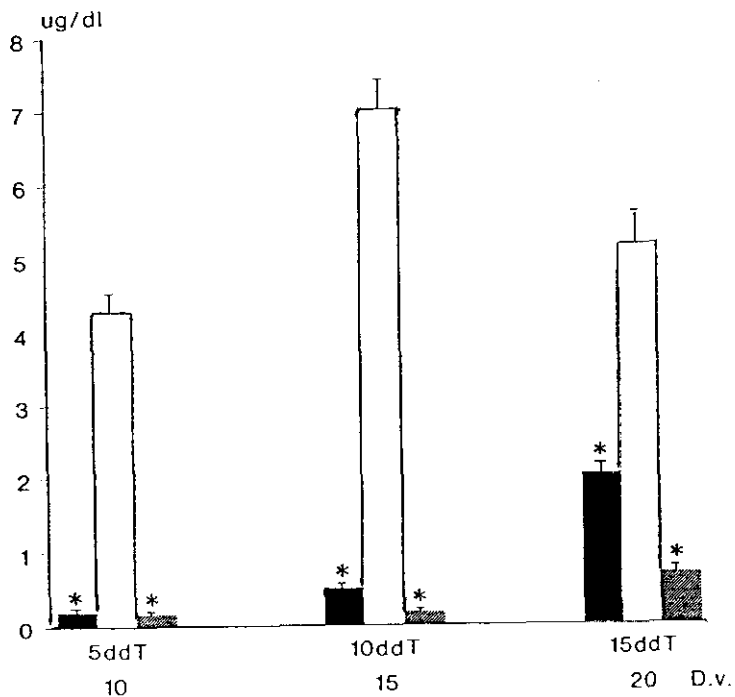
A**T₃****B****T₄**

Fig 7 Niveles de T_3 (A) y T_4 (B) en suero de ratas neonatales tiroidectomizadas (T), controles (C) y tratadas con MMI (MMI) de 10, 15 y 20 días de vida (5, 10 y 15 días después de la tiroidectomía) determinados por RIA. Media \pm DS de 8-10 animales. * Significación estadística respecto a los valores de la población control.

circulantes e hipofisarios de GH aumentaron a los 5 y 15 días después de la operación (10 y 20 días de vida) respecto a los valores control (Tabla 4); sin embargo, a los 15 días de vida (10 días después de la tiroidectomía) no se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos de animales, aunque se mantuvieron altos, probablemente por falta de población. Por el contrario, las ratas tratadas con MMI presentaron unos niveles de GH plasmática inferiores a los de los animales control (Tabla 4) en un 76.16% y un 93.30% a los 10 y 15 días de vida respectivamente, aunque a los 20 días de vida, ambas poblaciones presentaron una concentración de esta hormona circulante similar. Del mismo modo, a nivel hipofisario, estos neonatos tratados con MMI presentaron contenidos en GH inferiores a los de la población control.

En las tres etapas estudiadas, la población control mostró un incremento progresivo asociado a la edad en los niveles de T_3 y el contenido de GH en pituitaria, mientras que las cifras de GH plasmática disminuyeron. Por otra parte, en los animales hipotiroideos (tiroidectomizados y tratados con MMI) se observó una alteración de la pauta seguida durante el desarrollo por estas hormonas.

3.1.3. Glucemia e insulinemia.

Los valores de glucemia de los animales tratados con MMI fueron similares a los control, pero las cifras de glucosa en sangre de las ratas operadas disminuyeron respecto a las de la población control, por lo que la glucemia de las ratas tiroidectomizadas también fue inferior a la de aquellos animales a los que se les administró el fármaco bociógeno (Tabla 4).

La insulina plasmática de la población hipotiroidea tratada con MMI disminuyó respecto a los animales control en una proporción que osciló desde un 28.92% a los 10 días de vida hasta un 37.55% a los 20 días de vida (Figura 8). Sin embargo, la insulinemia aumentó en los animales operados respecto a los controles (27.48% a los 10 días de vida, y 42.59% a los 20 días de vida), lo que podría explicar el hecho de que los animales operados presentaran niveles de glucosa sanguínea inferiores a los de los animales control.

3.1.4. Factores de crecimiento similares a la insulina (IGFs): niveles séricos y expresión del ARNm hepático.

3.1.4.1. Niveles séricos.

Los niveles de IGF-I en suero de rata control experimentaron un incremento progresivo entre los 10 y 20 días de vida, pasando de 178.05 a 255.50ng/ml (Figura

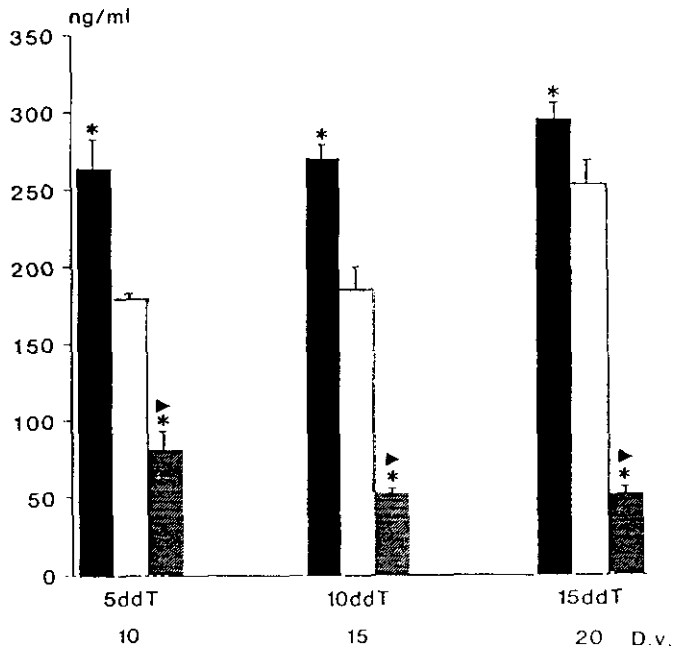
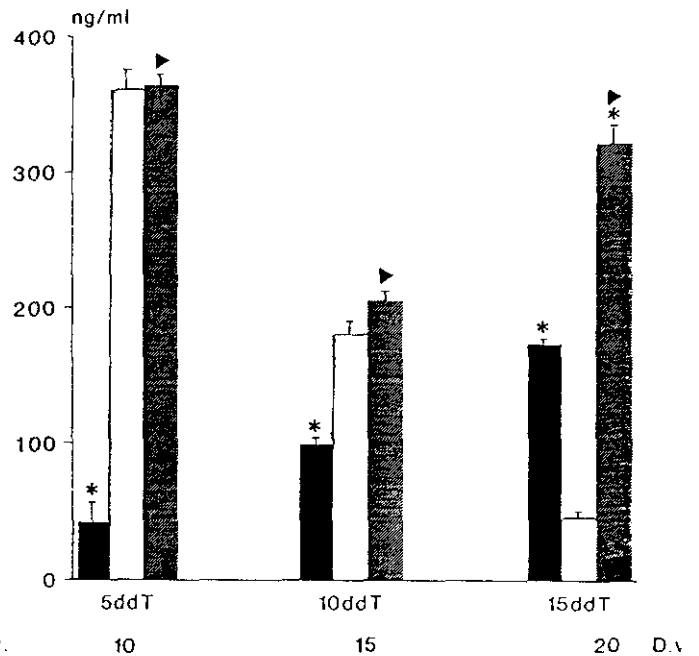
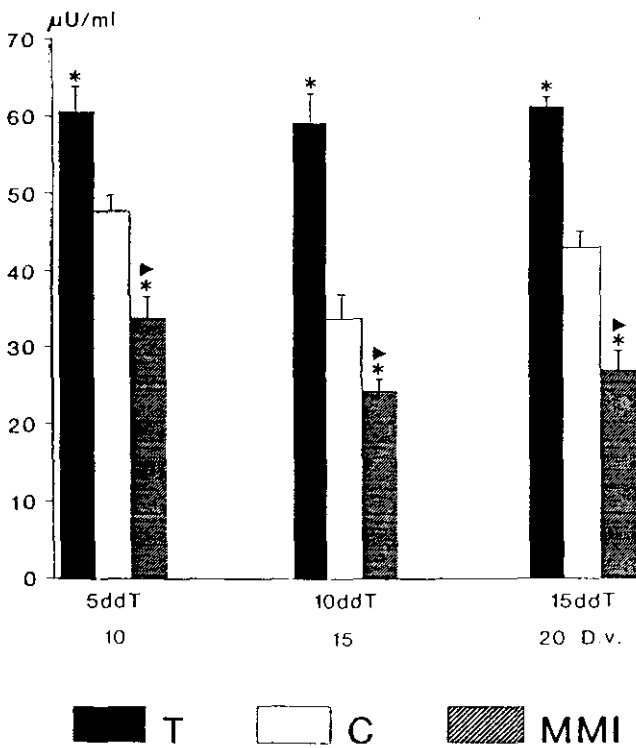
A**IGF-I****B****IGF-II****C****INSULINA**

Fig 8 Niveles circulantes de IGF-I (A), IGF-II (B) e insulina (C) de ratas neonatales tiroidectomizadas (T), controles (C) y tratadas con MMI (MMI) de 10, 15 y 20 días (5, 10 y 15 días después de la tiroidectomía). Media \pm DS de 8-10 animales. * Significación estadística respecto a los animales control. ▶ Significación estadística respecto a la población tiroidectomizada.

■ T □ C ▨ MMI

8). De manera análoga a lo ya descrito para la insulina, los animales tiroidectomizados presentaron niveles de IGF-I en suero significativamente superiores a los de sus controles en todas las edades analizadas. En las ratas tiroidectomizadas, los niveles del péptido fueron un 71.60% (10 días de vida), un 128.49% (15 días de edad) y un 64.40% (20 días de vida) superiores a los de sus controles.

Los niveles séricos de IGF-I de los animales tratados con MMI, por el contrario, disminuyeron respecto a los de los controles, de manera similar a lo que ocurrió con la insulinemia. Este descenso del IGF-I circulante se cifró en un 54.75% a los 10 días de vida y alcanzó hasta un 65.12% a los 20 días de vida.

En cualquier caso, el hipotiroidismo causó, al igual que en el caso de la insulina, un trastorno en el patrón de cambios de los niveles de IGF-I asociado a la edad.

En la Figura 8 se representan las concentraciones de IGF-II existentes en el suero de las poblaciones de ratas neonatales hipotiroideas (tiroidectomizadas y tratadas con MMI) y controles. En los animales control, se aprecia un descenso progresivo en los niveles de este péptido conforme aumenta la edad (359.92ng/ml a 45.90ng/ml).

En las ratas tiroidectomizadas, a los 10 y 15 días de vida (5 y 10 días después de la operación), se encontró un descenso en los valores circulantes respecto a la población control (88.34 y 44.93%, respectivamente), mientras que a los 20 días de edad (15 días después de la tiroidectomía), la concentración sérica del péptido se incrementó enormemente (278.04%) respecto a las ratas control. Por otro lado, los animales neonatales que fueron tratados con MMI presentaron unos niveles de IGF-II superiores a los controles desde los 20 días de edad.

3.1.4.2. Expresión del ARNm hepático.

La expresión hepática de IGF-I mostró un perfil similar al ya visto en suero. Así, se observó un aumento en el ARNm hepático de los neonatos tiroidectomizados y un descenso en el de los tratados con MMI; dicha disminución en la expresión se inició a los 15 días de vida, mientras que el aumento se apreció ya a los 10 días de vida (5 días después de la tiroidectomía) (Figura 9).

Al igual que se había mostrado a nivel circulante, la expresión del IGF-II en hígado disminuyó al aumentar la edad del animal control (Figura 9), sin embargo, las ratas hipotiroideas (tiroidectomizadas y tratadas con MMI) mostraron un perfil diferente que se modificó dependiendo del tipo de hipotiroidismo conseguido. Así,

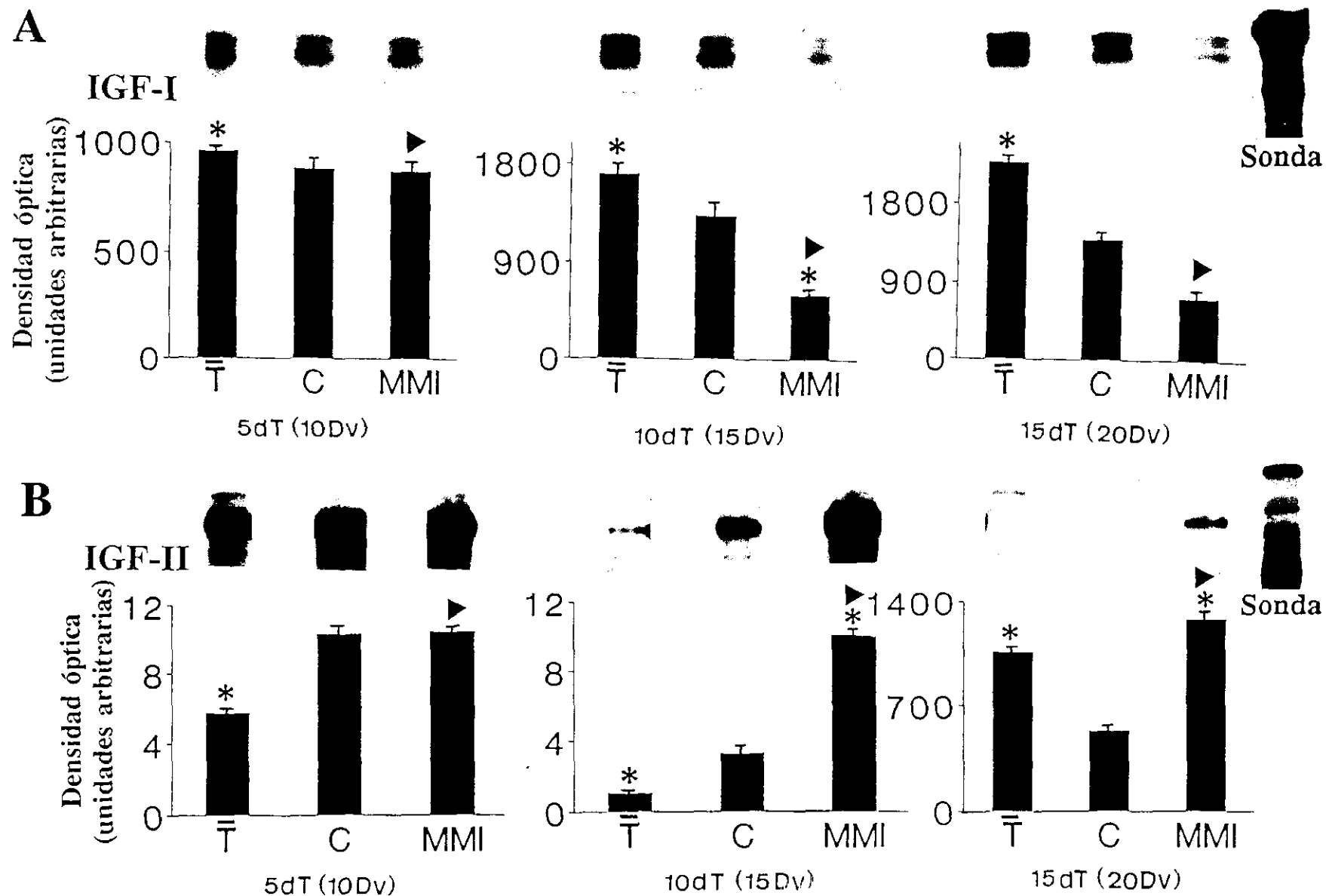


Fig 9 Expresión hepática del ARNm y valores densitométricos de IGF-I (A) y II (B) analizadas mediante el ensayo de protección de la RNasa en ratas neonatales tiroidectomizadas (T), controles (C) y tratadas con MMI (MMI) a los 10, 15 y 20 días de edad (5, 10 y 15 días después de la tiroidectomía). Media \pm DS de 5-6 análisis diferentes. * Significación estadística respecto a los animales control. ▶ Significación estadística respecto a la población tiroidectomizada.

en las poblaciones de animales tratados con MMI, los niveles de ARNm del péptido se vieron paulatinamente aumentados desde los 15 días de vida respecto a la población control y, por el contrario, en el caso de las ratas operadas quirúrgicamente, el hipotiroidismo cursó con niveles de expresión de IGF-II disminuidos (10 y 15 días de vida) aunque, finalmente, aumentaron (20 días de vida).

De nuevo, se encontró un paralelismo entre los niveles circulantes y los de ARNm de los péptidos, lo que sugiere la existencia de una regulación a nivel transcripcional en la secreción de los IGFs debido a la falta de hormonas tiroideas.

3.1.5. Estudio de regresión lineal y correlación.

Se efectuó el análisis de regresión y correlación de diversos parámetros de las ratas en periodo neonatal (Figura 10). Para los cálculos se reunieron en cada análisis los datos de las tres edades estudiadas.

Se encontró una fuerte correlación positiva entre los niveles séricos de IGF-I y los plasmáticos de insulina tanto en los animales hipotiroideos ($r = 0.83$, $p < 0.05$ para las ratas tiroidectomizadas y $r = 0.89$, $p < 0.05$ para las tratadas con MMI) como en los controles ($r = 0.96$, $p < 0.05$). Sin embargo, cuando se representaron los niveles circulantes de IGF-I frente a los de GH, estas poblaciones mostraron una correlación negativa ($r = -0.58$) o baja ($r = 0.46$ y 0.75) para los animales tiroidectomizados, tratados con el bociógeno y control, respectivamente.

3.1.6. Proteínas ligadoras de IGFs (IGFBPs): niveles séricos y expresión del ARNm hepático.

3.1.6.1. Niveles séricos.

3.1.6.1.1. Western ligand blot.

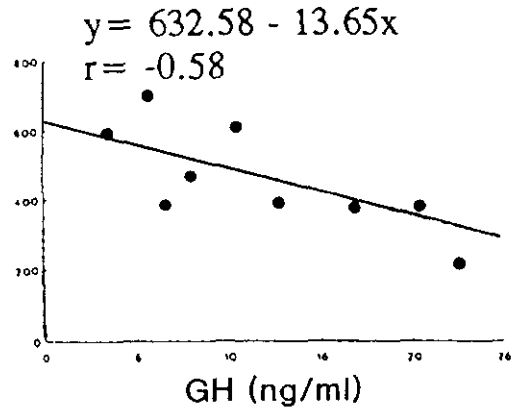
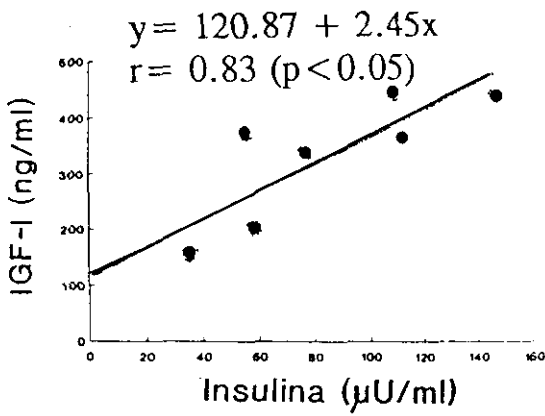
En todos los estadios analizados se observó un patrón claro constituido por tres grupos de bandas de un peso molecular estimado en 45kDa, 30kDa y 24kDa, y que se designan como IGFBP-3, IGFBP-1 y 2 e IGFBP-4, respectivamente (Figura 11).

En las ratas control, la banda de 30kDa disminuyó conforme lo hacía la edad del animal, mientras que la banda de 45kDa experimentó un aumento de intensidad paralelo al de la edad, lo cual no se aprecia con claridad en la Figura 11 debido al cambio de escalas.

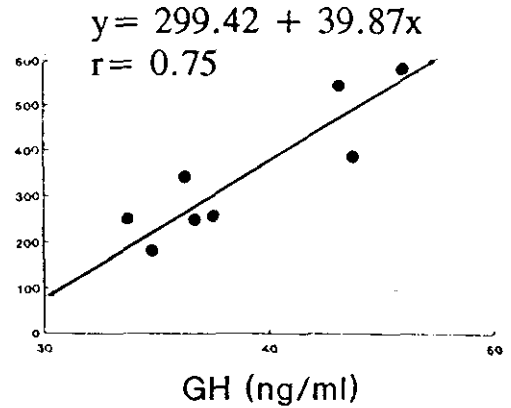
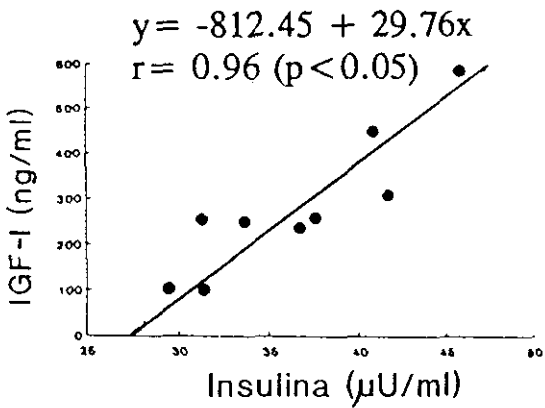
Los valores séricos de las proteínas de bajo peso molecular (IGFBP-1 y 2) aumentaron por la falta de hormonas tiroideas desde los 10 días de vida, sin embargo, dicho incremento fue más marcado en los animales tratados con el fármaco

NEONATOS

TIROIDECTOMIZADOS (T)



CONTROLES (C)



HIPOTIROIDEOS-MMI (MMI)

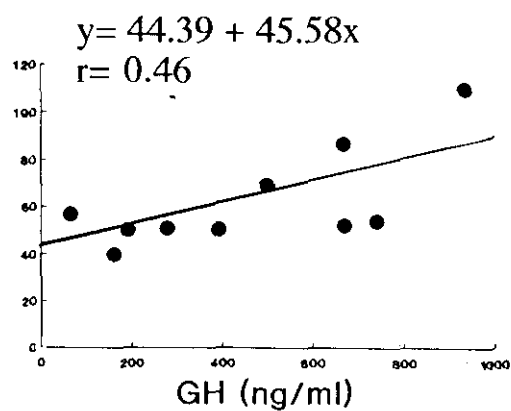
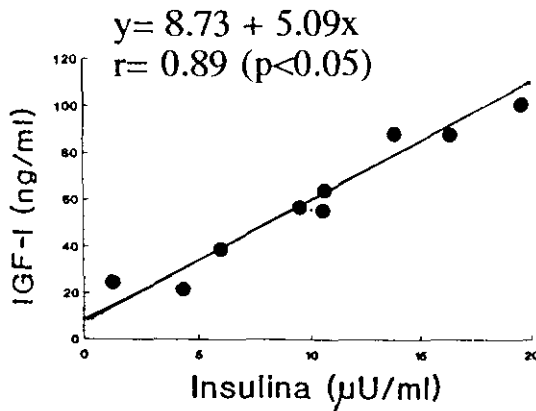


Fig 10 Análisis de regresión lineal y coeficiente de correlación de los niveles séricos de IGF-I y las concentraciones plasmáticas de insulina y GH en ratas neonatales tiroidectomizadas (T), controles (C) y tratadas con metimazol (MMI). Este análisis se efectuó reuniendo los datos de los tres estadios neonatales (10, 15 y 20 días de vida). Se muestran las diferencias estadísticas.

WESTERN LIGAND BLOT

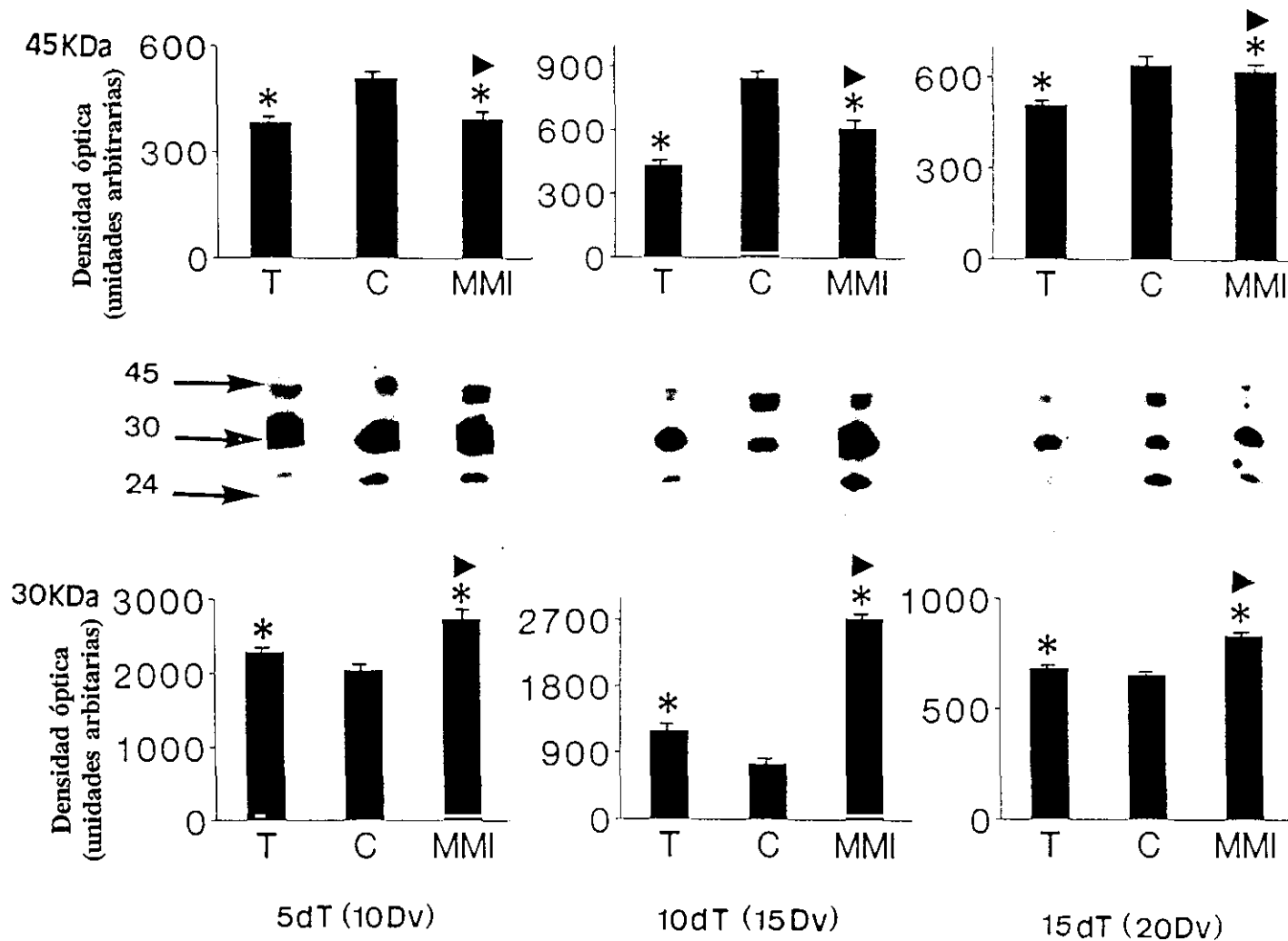


Fig 11 Análisis mediante "Western ligand blot" y cuantificación densitométrica de los niveles de las IGFbps en 2.5µl de suero de ratas neonatales tiroidectomizadas (T), controles (C) y tratadas con MMI (MMI) de 10, 15 y 20 días de vida (5, 10 y 15 días después de la operación). Media ± DS de 4 análisis diferentes. * Significación estadística respecto a los animales control. ▶ Significación estadística respecto a la población tiroidectomizada.

bociógeno, lo que puso de manifiesto una diferencia entre estas poblaciones de ratas en cuanto a las cifras séricas del complejo de 30kDa.

Los niveles de IGFBP-3 de las ratas hipotiroideas experimentaron un descenso también desde los 10 días de edad, pero fue más acusado en el caso de los animales neonatales tiroidectomizados que en el de los tratados con metimazol, siempre respecto a las ratas control; de nuevo, encontramos una alteración en el patrón de cambio de los niveles de las IGFbps en los animales hipotiroideos.

3.1.6.1.2. Western immunoblot.

El análisis mediante "Western ligand blot" mostró un aumento en las proteínas de bajo peso molecular del suero (IGFBP-1 y 2), y para averiguar si dicho incremento se debía a ambas proteínas por igual o al predominio de una de ellas sobre la otra, se recurrió a otro tipo de análisis que nos permitiera conocer la intensidad de la banda debida a cada proteína por separado; se trataron así las membranas con anticuerpos anti-IGFBP-1 y anti-IGFBP-2 específicos para rata.

El tratamiento de las membranas con anti-IGFBP-1 nos reveló un aumento significativo en los niveles séricos de esta proteína de bajo peso molecular en aquellos animales que fueron tiroidectomizados a 10, 15 y 20 días de vida respecto a las ratas control (Figura 12). Por el contrario, las poblaciones de ratas hipotiroideas a las que se les administró el fármaco bociógeno mostraron un descenso en los valores circulantes de este péptido respecto a la población control en todos los estadios analizados (10, 15 y 20 días de edad).

Los niveles circulantes de IGFBP-2 se encontraron aumentados por la falta de hormonas tiroideas (animales tratados con MMI y tiroidectomizados) a partir de los 10 y 15 días de edad, respectivamente (Figura 12); no obstante, el incremento observado fue mucho más acusado en el caso de las ratas tratadas con el fármaco antitiroideo respecto al mostrado por aquellos animales que fueron operados en todas las edades estudiadas (10, 15 y 20 días de vida).

3.1.6.2. Expresión del ARNm hepático.

Los niveles de ARNm hepático de la proteína de bajo peso molecular IGFBP-1 se encontraron aumentados en las ratas tiroidectomizadas respecto a las controles en los tres estadios analizados (Figura 13), mientras que disminuían en los animales hipotiroideos tratados con MMI también desde los 10 días de vida, mostrando un paralelismo con los valores circulantes de IGFBP-1 por inmunoblot (Figura 12).

La expresión de IGFBP-2 aumentó tanto en los animales neonatales tratados

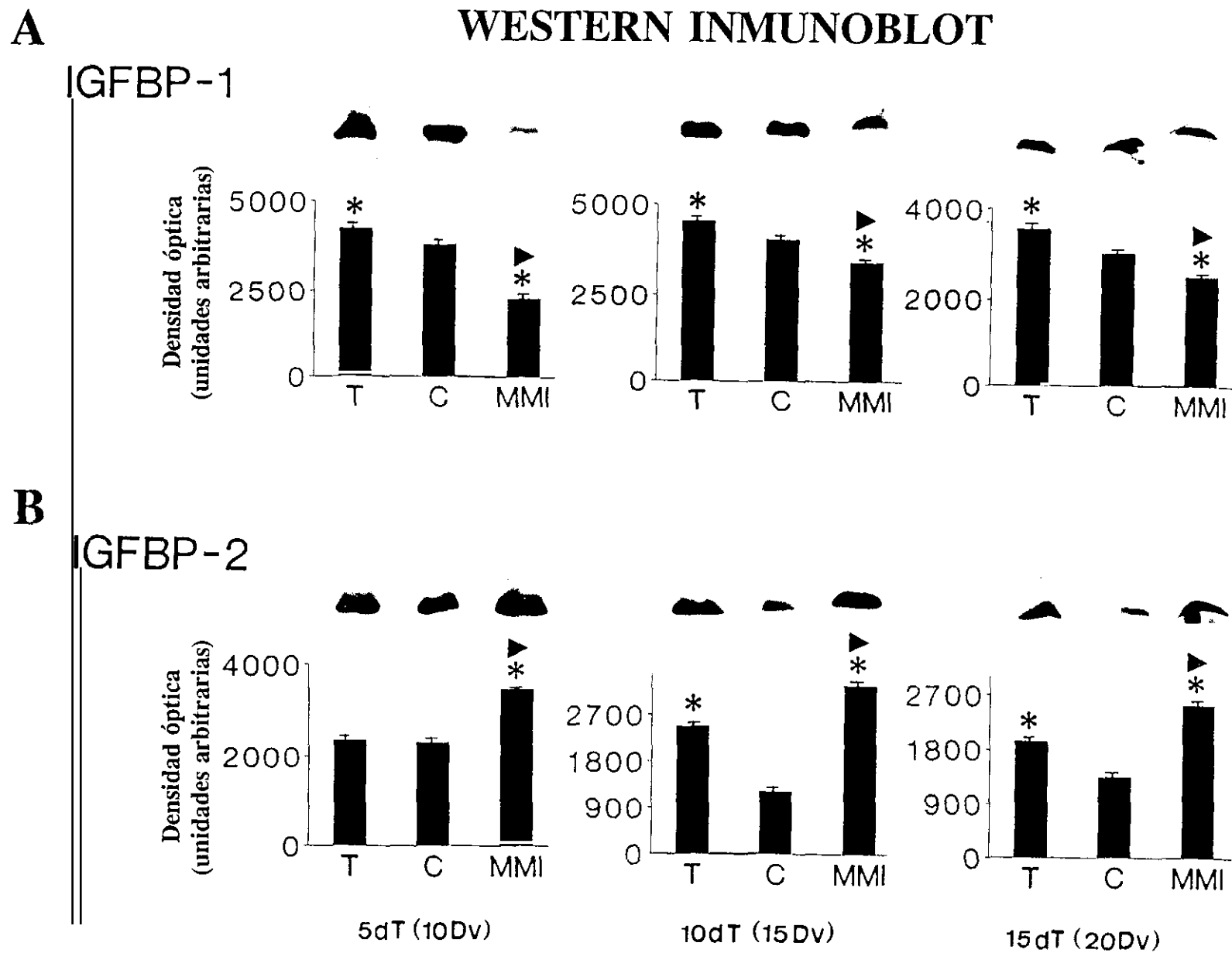
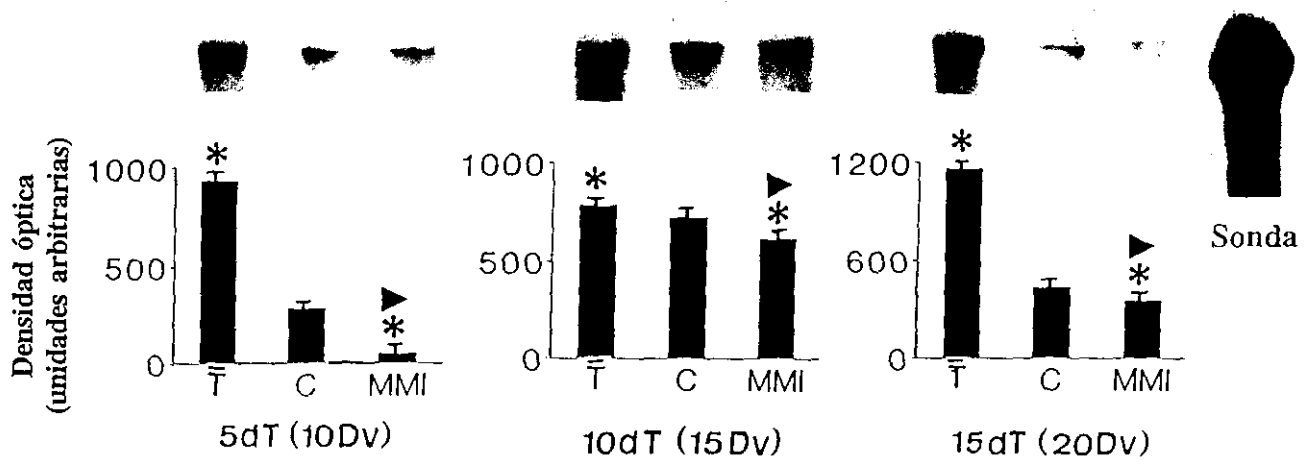


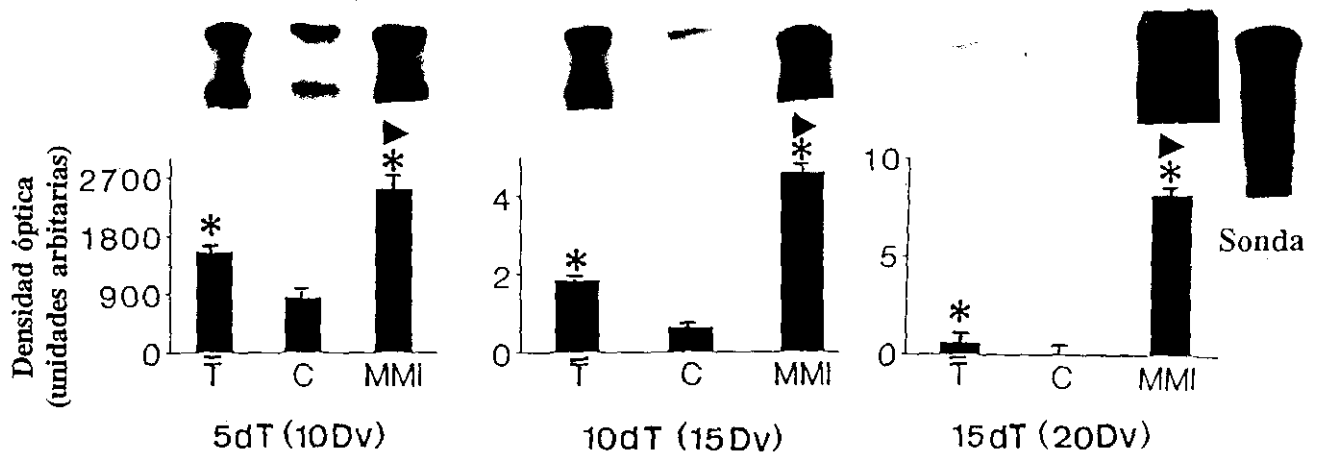
Fig 12 Análisis mediante "Western inmunoblot" y cuantificación densitométrica de los niveles de la IGFBP-1 (A) e IGFBP-2 (B) en 2.5µl de suero de ratas neonatales tiroidectomizadas (T), controles (C) y tratadas con MMI (MMI) de 10, 15 y 20 días de edad (5, 10 y 15 días después de la tiroidectomía). Media ± DS de 4 análisis diferentes. * Significación estadística respecto a la población control. ▶ Significación estadística respecto a los animales tiroidectomizados.

EXPRESION DEL ARNm HEPATICO (IGFBPs)

IGFBP-1



IGFBP-2



IGFBP-3

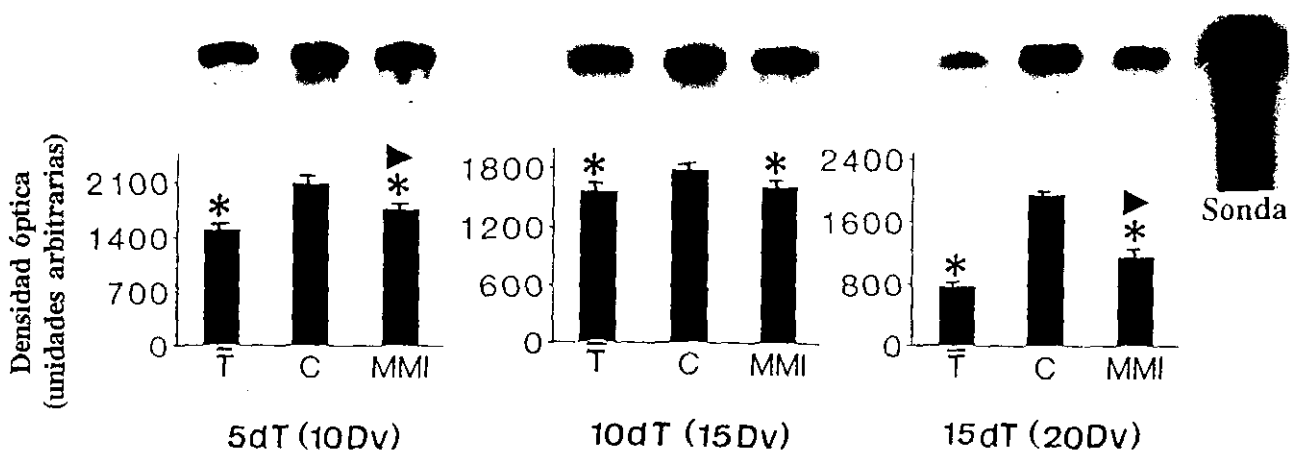


Fig 13 Expresión hepática del ARNm y cuantificación densitométrica de IGFBP-1, 2 y 3 en ratas neonatales tiroidectomizadas (T), controles (C) y tratadas con metimazol (MMI) de 10, 15 y 20 días (5, 10 y 15 días después de la operación). El análisis se llevó a cabo mediante el ensayo de protección de la RNasa. Media \pm DS de 5-6 análisis diferentes.
* Significación estadística respecto a los animales control. ▶ Significación estadística respecto a la población tiroidectomizada.

con MMI como en los tiroidectomizados respecto a los controles (Figura 13); en la población de ratas operadas quirúrgicamente, el aumento en los niveles de ARNm de IGFBP-2 se produjo a los 10 días de vida (5 días después de la tiroidectomía), y aunque, también se observó a los 10 días de edad, fue más pronunciado en los tratados con MMI, lo que está igualmente de acuerdo con los valores circulantes encontrados por inmunoblot (Figura 12).

La IGFBP-3 disminuyó su expresión hepática en ambas poblaciones neonatales hipotiroideas (tiroidectomizadas y tratadas con MMI) respecto a la control desde los 10 días de vida, aunque esta disminución pareció ser más acusada en el caso de los animales tiroidectomizados y se observó con mayor claridad a los 15 días después de la operación (Figura 13).

A la vista de todos estos resultados, se observa la existencia de un paralelismo entre los niveles circulantes de las IGFbps y su expresión en hígado, lo que vuelve a sugerir una posible regulación de estas proteínas a nivel transcripcional por parte de las hormonas tiroideas.

3.2. TRATAMIENTO CON ESTREPTOZOTOCINA (STZ) DE RATAS NEONATALES TIROIDECTOMIZADAS.

Para profundizar en el papel de la insulina sobre la secreción de los IGFs en situaciones de hipotiroidismo neonatal, se realizó el siguiente experimento. Las ratas neonatales tiroidectomizadas, que presentaban altos niveles de insulina, fueron tratadas con STZ a los 15 días de edad (10 días de vida) para bloquear la liberación de esta hormona después de la tiroidectomía.

3.2.1. Evolución del peso corporal.

Las ratas neonatales operadas tratadas con STZ mantuvieron el peso de cuerpo por debajo de los valores de los animales control, si bien presentaron un ligero aumento respecto a los tiroidectomizados (Tabla 5).

3.2.2. Niveles séricos de T_3 y T_4 y plasmáticos e hipofisarios de GH.

Los neonatos tiroidectomizados tratados con STZ el día 15 de edad presentaron unos niveles circulantes de hormonas tiroideas inferiores a los de sus controles en un 86.00% para la T_3 y en un 94.95% para la T_4 (Tabla 5); de esta manera, la concentración sérica de las hormonas tiroideas de estos animales resultó ser también inferior a la de los controles como en las ratas neonatales tiroidectomizadas no sometidas al tratamiento.

Tabla 5.- Peso corporal, niveles circulantes de glucosa, T₃, T₄, GH y contenido hipofisario de GH de ratas neonatales tiroidectomizadas (T), tratadas con STZ (T + STZ) y controles de 20 días de vida (15 días después de la tiroidectomía). Media 8-10 animales ± DS.

| | Peso corporal (g) | T ₃ sérica (ng/dl) | T ₄ sérica (μg/dl) | GH plasmática (ng/ml) | GH hipofisaria (ng/mg) | Glucemia (ng/100ml) |
|-----------|-----------------------------|----------------------------------|----------------------------------|---------------------------|-----------------------------|------------------------------|
| NEONATOS | | | | | | |
| T | 24.84 ± 0.83 ^a | 7.38 ± 0.28 ^a | 1.08 ± 0.04 ^a | 11.75 ± 1.62 ^a | 12.22 ± 1.38 ^a | 105.92 ± 4.85 ^a |
| Controles | 41.55 ± 0.71 | 95.58 ± 21.25 | 5.15 ± 0.11 | 3.42 ± 1.71 | 11.76 ± 0.35 | 131.62 ± 1.69 |
| T + STZ | 34.93 ± 0.95 ^{a,b} | 10.91 ± 0.55 ^a | 0.25 ± 0.05 ^a | 3.99 ± 1.73 ^b | 10.24 ± 0.11 ^{a,b} | 198.79 ± 4.76 ^{a,b} |

^ap < 0.05 respecto a las ratas C

^bp < 0.05 respecto a las ratas T

El bloqueo de la secreción de insulina provocó un descenso en los valores plasmáticos de GH superior al 65% respecto a la población de animales tiroidectomizados, lo que igualó la concentración de GH circulante de estas ratas sometidas al tratamiento a los niveles de los animales control. Por otra parte, en estos animales inyectados con STZ, también disminuyó, incluso por debajo de los valores control (19.57%), el contenido hipofisario de esta hormona, con lo que este parámetro fue muy inferior en estas ratas respecto a los animales neonatales tiroidectomizados no sometidos al tratamiento (Tablas 4 y 5), mostrando un paralelismo entre el descenso de la insulinemia y dichos parámetros como sucedía en los animales diabéticos.

3.2.3. Glucemia e insulinemia.

La administración de STZ causó, como era de esperar, un gran aumento en los niveles circulantes de glucosa de los animales sometidos al tratamiento (Tabla 5), y, de manera paralela, un descenso en su insulinemia del 70.44% respecto a los valores control (Figura 14) debido al bloqueo de la secreción de insulina por la droga.

3.2.4. IGFs: niveles séricos y expresión del ARNm hepático.

3.2.4.1. Niveles séricos.

Los niveles de IGF-I, como sucedió con las ratas neonatales tiroidectomizadas sin STZ, mostraron un perfil similar al ofrecido por la insulina, esto es, los valores circulantes del péptido de las ratas tratadas con STZ disminuyeron en un 76.32% respecto a la población tiroidectomizada y mostraron unos niveles similares a los de los animales control (Figura 14).

La concentración de IGF-II en suero aumentó después de la administración de STZ respecto a la población control (Figura 14), e incluso, estos valores superaron a los alcanzados por los animales tiroidectomizados, cuyos niveles aparecían ya muy incrementados respecto a las ratas control.

3.2.4.2. Expresión del ARNm hepático.

La expresión del ARNm hepático de los transcritos de IGF-I (Figura 14), que estaba aumentada en los neonatos tiroidectomizados, disminuyó, de forma paralela a lo que ocurría en el suero, respecto a esta población y a la control tras someter a los animales al tratamiento con STZ. Sin embargo, en estas ratas neonatales, después de la administración de STZ, los niveles de ARNm de IGF-II aumentaron aún más que en las tiroidectomizadas respecto a la población control (Figura 14), igual que

Fig 14 *A) Niveles circulantes de IGF-I, insulina e IGF-II de ratas neonatales tiroidectomizadas (T), controles (C) y tiroidectomizadas tratadas con STZ (T + STZ) de 20 días (15 días después de la operación). Media \pm DS de 8-10 animales.*

B) Expresión hepática del ARNm y cuantificación densitométrica del IGF-I y II en ratas tiroidectomizadas (T), controles (C) y tiroidectomizadas tratadas con STZ (T + STZ) de 20 días. El análisis se efectuó mediante el ensayo de protección de ribonucleasas. Media \pm DS de 4 análisis distintos.

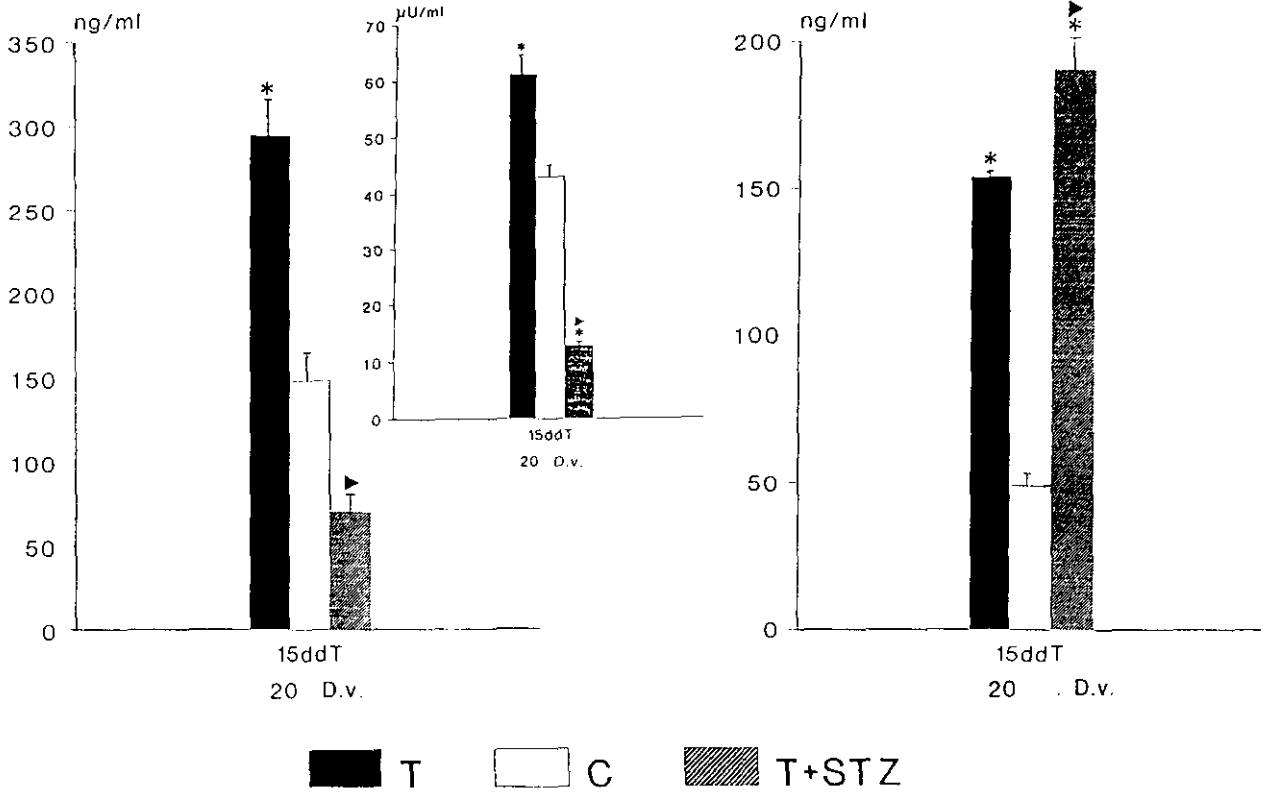
** Significación estadística respecto a los animales control. \blacktriangleright Significación estadística respecto a la población operada.*

A

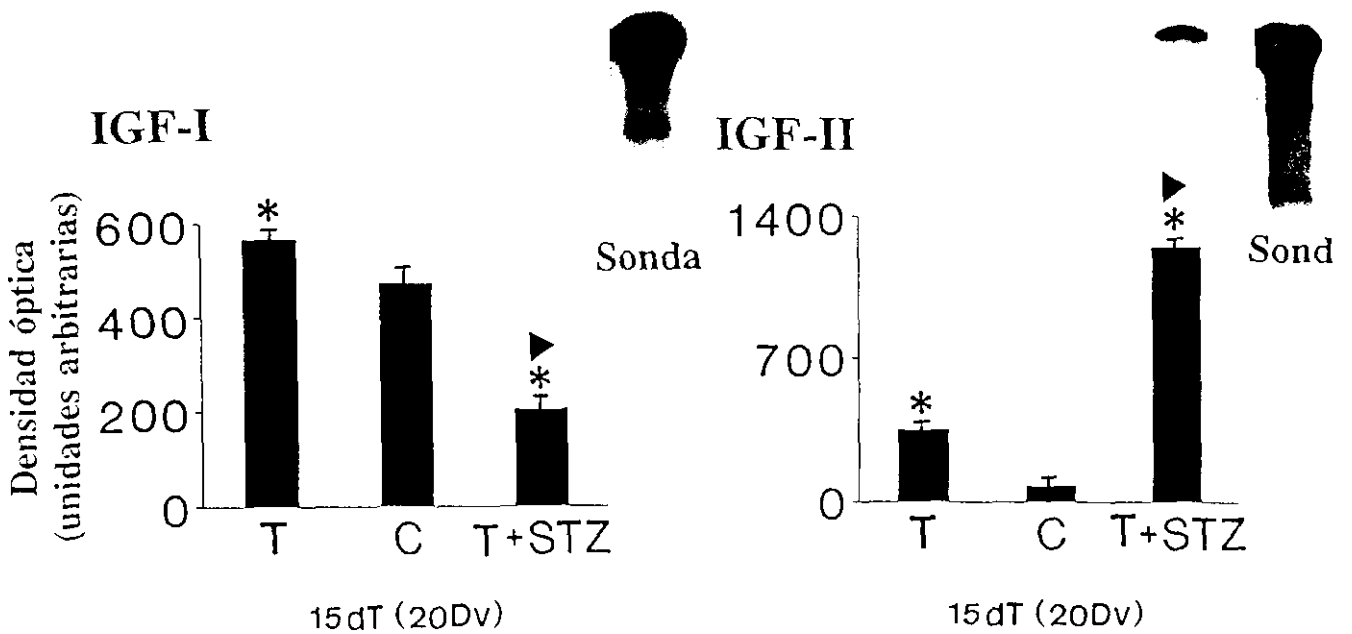
IGF-I

INSULINA

IGF-II

**B**

EXPRESION DEL ARNm HEPATICO (IGFs)



sucedía a nivel circulante.

3.2.5. Estudio de regresión lineal y correlación.

La Figura 15 resume los resultados del análisis de regresión de algunos de los parámetros estudiados en este experimento con STZ que se acaba de describir. Para el análisis se recogieron los datos obtenidos para las tres poblaciones.

La correlación entre IGF-I e insulinemia fue alta y positiva ($r = 0.97$, $p < 0.05$), mientras que el IGF-I se correlacionó de forma negativa con los niveles de GH en plasma ($r = -0.83$).

3.2.6. IGFBPs: niveles séricos y expresión del ARNm hepático.

3.2.6.1. Niveles séricos.

3.2.6.1.1. Western ligand blot.

El hipotiroidismo provocó, como ya se ha mencionado con anterioridad, un aumento de las proteínas transportadoras circulantes de bajo peso molecular (IGFBP-1 y 2) respecto a la población control, y dicho incremento no fue corregido tras el tratamiento de las ratas tiroidectomizadas con STZ (Figura 16).

Los niveles séricos de IGFBP-3, que disminuyeron en aquellos animales que fueron operados, aumentaron significativamente después de la administración de STZ e incluso, alcanzaron unos valores similares a los de la población control, como había ocurrido con los niveles de GH (Figura 16).

3.2.6.1.2. Western inmunoblot.

El análisis efectuado con el anticuerpo específico de rata anti-IGFBP-1 nos mostró que los niveles de esta proteína transportadora se incrementaban, respecto a los de las ratas control, tanto en animales que fueron tiroidectomizados como en los que fueron sometidos al tratamiento (Figura 16).

La IGFBP-2 presentó un perfil análogo al ofrecido por IGFBP-1, esto es, sus niveles séricos aumentaron en las ratas operadas y en las que se les administró STZ cuando se compararon con los mostrados por los animales control, y la STZ no los varió (Figura 16).

3.2.6.2. Expresión del ARNm hepático.

La Figura 17 muestra la expresión hepática de IGFBP-1, 2 y 3 en los animales neonatales antes y después de ser tratados con STZ. En estas condiciones, se observó un mantenimiento en los niveles del ARNm de IGFBP-1 en los animales a los que se les administró STZ respecto a los tiroidectomizados, lo que parece motivado por el bloqueo de la secreción de insulina en estas ratas, dado que esta proteína ligadora

NEONATOS

TIROIDECTOMIZADOS (T + STZ)

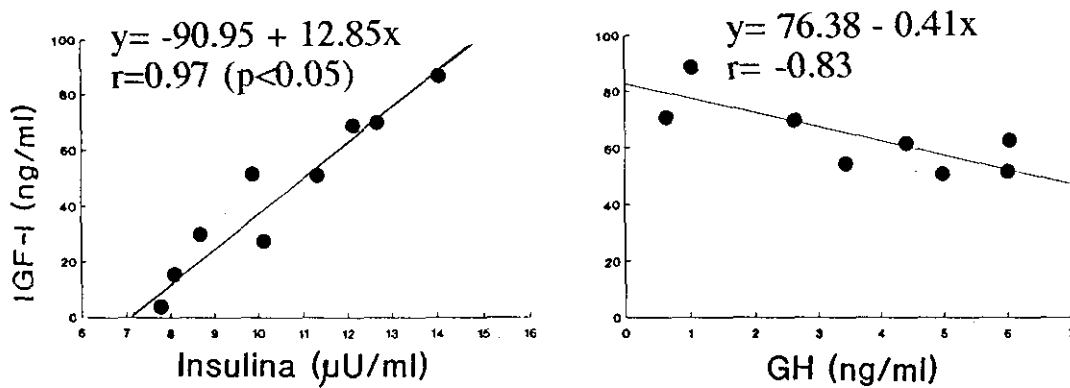
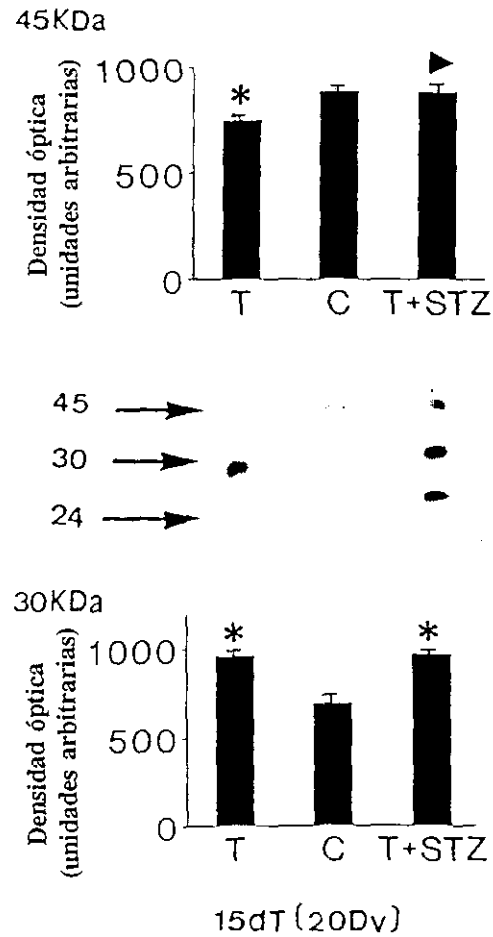


Fig 15 *Análisis de correlación lineal y coeficiente de correlación de los niveles circulantes de IGF-I e insulina y GH en ratas neonatales de 20 días de edad tiroidectomizadas (T), controles (C) y operadas tratadas con STZ (T + STZ). Se muestran las diferencias estadísticas.*

A WESTERN LIGAND BLOT



B WESTERN INMUNOBLOT

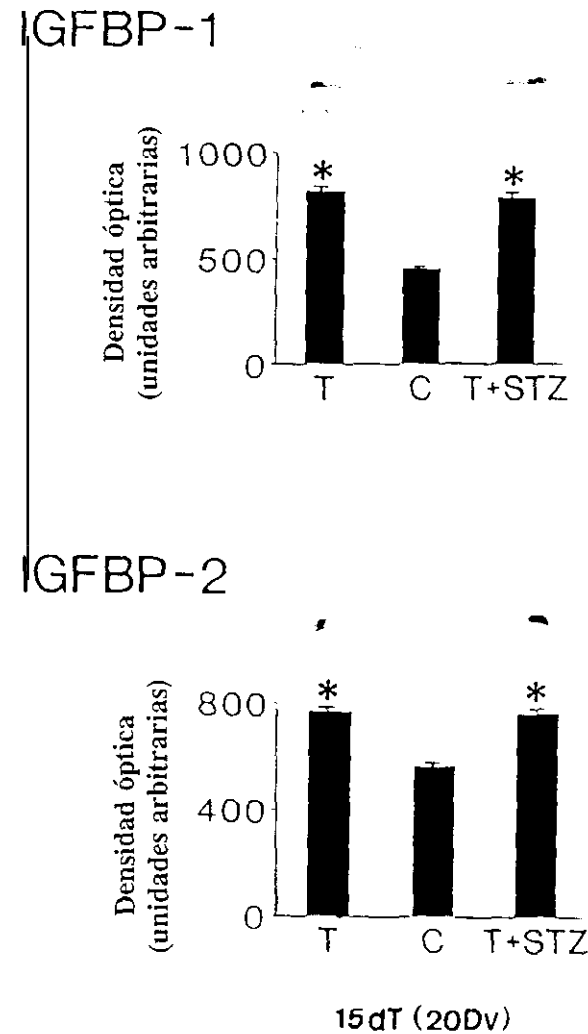


Fig 16 Niveles séricos de las IGFBPs en ratas neonatales tiroidectomizadas (T), controles (C) y tiroidectomizadas tratadas con STZ (T + STZ) de 20 días de vida (15 días después de la operación). Los análisis se efectuaron con 2.5µl de suero, por medio de "Western ligand blot" (A) y "Western inmunoblot" (B). Se muestra la cuantificación densitométrica de las concentraciones de las IGFBPs de las mismas poblaciones. Media ± DS de 4 análisis diferentes. * Significación estadística respecto a los animales control. ▶ Significación estadística respecto a las ratas tiroidectomizadas.

EXPRESION DEL ARNm HEPATICO (IGFBPs)

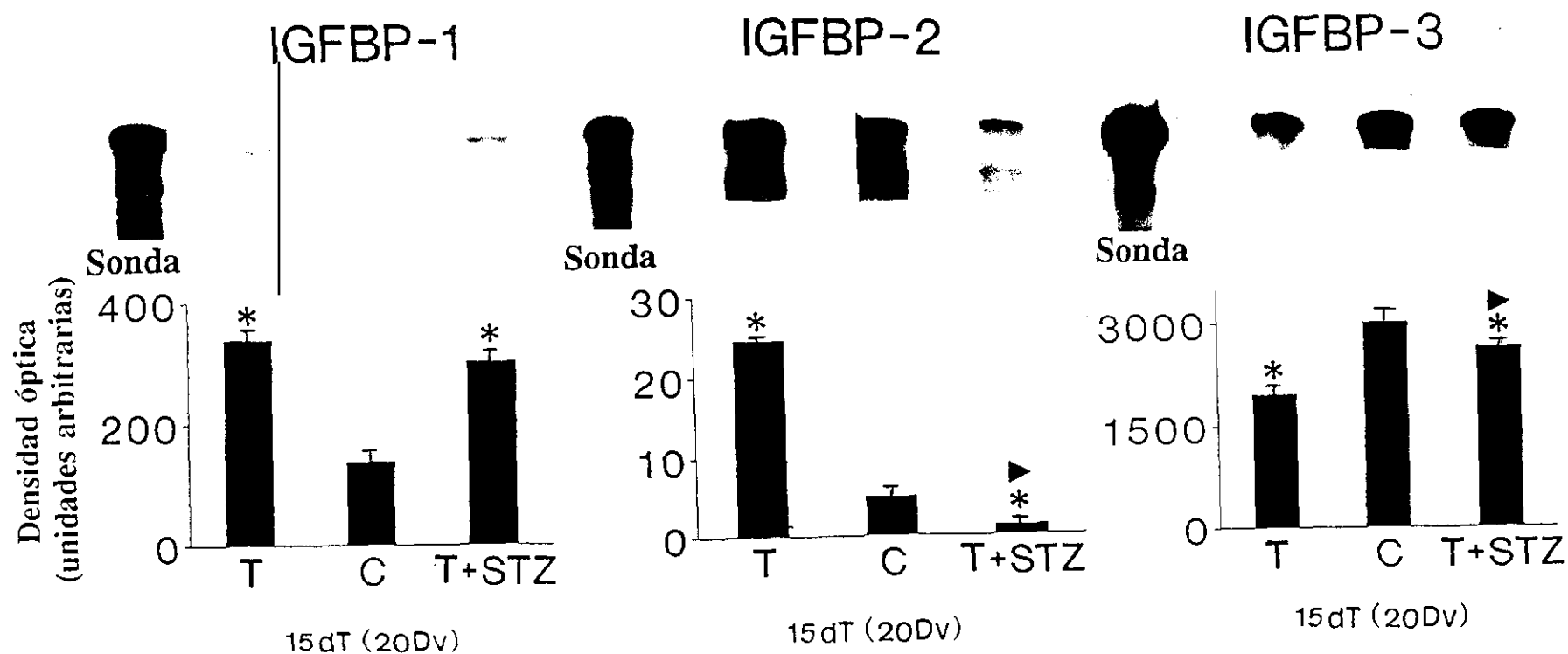


Fig 17 *Análisis mediante ensayo de protección de la RNasa de los transcritos hepáticos de IGFBP-1, 2 y 3 de ratas en periodo neonatal tiroidectomizadas (T), controles (C) y tiroidectomizadas tratadas con STZ (T + STZ) de 20 días de edad (15 días después de la tiroidectomía). Media \pm DS de 5-6 análisis diferentes. * Significación estadística respecto a la población control. ► Significación estadística respecto a los animales tiroidectomizados.*

muestra una dependencia, ya descrita, de esta hormona: un descenso en la insulina provoca una subida de los niveles de IGFBP-1.

Por otro lado, la expresión de IGFBP-2, que estaba aumentada en los neonatos tiroidectomizados, se vió disminuida en estas ratas neonatales por el tratamiento con STZ incluso hasta unos valores inferiores a los control (Figura 17).

La expresión del ARNm de IGFBP-3 sufrió un aumento significativo tras el tratamiento de las ratas operadas con STZ respecto a la población tiroidectomizada, aunque este no fue tan grande como para equipararlos a los de los animales control (Figura 17).

El perfil de los transcritos de las IGFbps es similar al observado a nivel circulante: IGFBP-1 disminuyó e IGFBP-3 aumentó; sin embargo, IGFBP-2 ofreció un comportamiento diferente en el caso de los animales tiroidectomizados y posteriormente tratados con STZ, y así, se encontró un aumento en los niveles séricos, mientras que su expresión hepática disminuía.

3.2.7. Resumen de los resultados del estudio de la tiroidectomía y la administración de MMI en ratas neonatales y de las ratas neonatales tiroidectomizadas tratadas con STZ.

Los neonatos tiroidectomizados presentaron unos altos niveles circulantes de insulina y GH plasmática e hipofisaria, así como unos valores séricos y de expresión hepática de IGF-I aumentados respecto a las ratas control. Por otro lado, las cifras circulantes de IGF-II y los niveles de su ARNm en hígado aparecieron disminuidos en estos animales tiroidectomizados, excepto a 20 días en que estos valores aumentaron respecto a los animales control. Por el contrario, los neonatos tratados con MMI presentaron una baja insulinemia junto con unos valores plasmáticos e hipofisarios de GH, y unos niveles séricos y de ARNm hepático de IGF-I disminuidos, mientras que los valores de IGF-II aumentaron respecto a las ratas control. En ambas poblaciones hipotiroideas (tiroidectomizada y tratada con MMI), se encontró una correlación positiva por análisis de correlación lineal entre los niveles circulantes de IGF-I e insulina.

Los valores séricos de IGFBP-3 disminuyeron en las dos poblaciones hipotiroideas, al igual que la expresión de su ARNm hepático; por el contrario, en los neonatos tiroidectomizados, las IGFbps de bajo peso molecular aumentaron sus niveles en suero y de expresión en hígado, mientras que aquellas ratas que sólo fueron tratadas con MMI mostraron un aumento en los valores circulantes y de

expresión de los transcritos hepáticos de la IGFBP-2, aunque la IGFBP-1 disminuía a ambos niveles. Parece que el aumento en los animales tiroidectomizados en el complejo de 30kDa fue debido a IGFBP-1 y 2, mientras que en el caso de los animales hipotiroideos por tratamiento con MMI, pareció deberse al aumento sólo de IGFBP-2.

Los animales tiroidectomizados y tratados con STZ presentaron valores bajos de insulinemia, GH plasmática e hipofisaria e IGF-I circulante, así como de su ARNm hepático (Cuadro 1). El IGF-II circulante y su ARNm aumentan al igual que la glucemia; aumentan IGFBP-1 y 2, tanto circulante como ARNm hepático y la IGFBP-3 circulante no varía y disminuye su ARNm hepático (Cuadro 1). Todos los valores se compararon con los animales controles eutiroideos.

El resumen de estos resultados está refejado en el Cuadro 1.

Se estableció una correlación positiva entre los niveles circulantes de insulina e IGF-I.

Cuadro 1.- Resumen de los resultados de los estudios de tiroidectomía (T), administración de MMI (MMI) y tratamiento con STZ (T + STZ) en ratas neonatales respecto a la población de animales control.

| | T | MMI | T + STZ |
|--------------------|---|-----|---------|
| GLUCEMIA | ↓ | = | ↑ |
| INSULINEMIA | ↑ | ↓ | ↓ |
| GH CIRCULANTE | ↑ | ↓ | = |
| GH HIPOFISARIA | ↑ | ↓ | ↓ |
| IGF-I CIRCULANTE | ↑ | ↓ | = |
| ARNm IGF-I | ↑ | ↓ | ↓ |
| IGF-II CIRCULANTE | ↑ | ↑ | ↑ |
| ARNm IGF-II | ↑ | ↑ | ↑ |
| IGFBP-1 CIRCULANTE | ↑ | ↓ | ↑ |
| ARNm IGFBP-1 | ↑ | ↓ | ↑ |
| IGFBP-2 CIRCULANTE | ↑ | ↑ | ↑ |
| ARNm IGFBP-2 | ↑ | ↑ | ↓ |
| IGFBP-3 CIRCULANTE | ↓ | ↓ | = |
| ARNm IGFBP-3 | ↓ | ↓ | ↓ |

3.3. TIROIDECTOMIA EN PERIODO DE DESTETE Y ADULTO.

En las ratas en periodo de destete y adulto, se llevó a cabo un estudio análogo al efectuado en la etapa neonatal. Se sacrificaron a los 5, 10 y 15 días después de la operación (27, 32 y 37 días de vida para los animales destetados y 77, 82 y 87 días de vida, para los adultos).

3.3.1. Evolución del peso corporal.

En las Tablas 6 y 7 se recogen los resultados del peso corporal de las ratas destetadas y adultas. Se observó en las dos poblaciones de animales tiroidectomizados un descenso en los valores de este parámetro, que llegó a ser de un 34.37% para las ratas destetadas a los 32 días y de un 14.20% para las adultas a los 87 días, respecto a los animales control.

Los tres estadios de edades considerados para estos animales tiroidectomizados y en ambas poblaciones (destetada y adulta) presentaban el peso disminuido respecto a los controles.

3.3.2. Niveles séricos de T_3 y T_4 y plasmáticos e hipofisarios de GH.

Las ratas tiroidectomizadas, tanto destetadas como adultas, mostraron unos niveles circulantes de T_3 y T_4 disminuidos después de la operación (Figura 18). Esta disminución fue más acusada a los 15 días después de la tiroidectomía que a los 5 días, y así, en el caso de los animales destetados, se produjo una caída desde un 86.70% (27 días de vida, 5 días después de la operación) a un 94.89% (37 días de edad, 15 días después de la tiroidectomía) para T_3 y desde un 90.81% a un 93.09% para T_4 ; para las ratas adultas, dicho descenso osciló entre un 91.49% (5 días después de la tiroidectomía, 77 días de edad) y un 92.24% (15 días después de la operación, 87 días de vida) para T_3 , y desde un 85.63% (77 días) a un 92.02% (87 días) para T_4 .

Los niveles plasmáticos de GH, de manera paralela a lo que sucedía con el peso corporal y los valores circulantes de T_3 y T_4 , experimentaron un descenso en los animales tiroidectomizados destetados y adultos (Figura 18 y Tablas 6 y 7). Sin embargo, esta disminución de GH en sangre se produjo en las ratas destetadas a los 15 días después de la tiroidectomía (37 días), mientras que en las adultas se manifestó ya a los 5 días después de la operación (77 días de vida).

El descenso de GH en pituitaria a los 5 días después de la tiroidectomía fue de un 35.00% en las ratas destetadas y de un 53.00% en las adultas, aunque esta diferencia superó el 65.00% en ambos grupos 15 días después de la operación (Tablas

Tabla 6.- Peso corporal, niveles circulantes de glucosa, insulina, GH y contenido hipofisario de GH de ratas destetadas tiroidectomizadas (T) y controles sacrificadas a los 27, 32 y 37 días de vida (5, 10 y 15 días después de la tiroidectomía) (ddT). Media de 8-10 animales \pm DS.

| | | DIAS DESPUES T (ddT) | | |
|------------------------------|-----------|--------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| | | Días de vida () | | |
| | | 5 ddT (27) | 10 ddT (32) | 15 ddT (37) |
| Peso corporal (g) | T | 47.07 \pm 1.48 ^a | 63.24 \pm 4.06 ^a | 77.55 \pm 2.40 ^a |
| | Controles | 66.53 \pm 2.14 | 73.16 \pm 2.87 | 118.17 \pm 2.21 |
| GH plasmática (ng/ml) | T | 19.49 \pm 4.21 | 2.82 \pm 0.16 | 3.76 \pm 0.60 ^a |
| | Controles | 2.29 \pm 0.77 | 4.16 \pm 0.59 | 6.65 \pm 0.91 |
| GH hipofisaria (μ g/mg) | T | 8.09 \pm 0.04 ^a | 18.21 \pm 0.09 | 6.06 \pm 0.04 ^a |
| | Controles | 12.40 \pm 0.12 | 20.60 \pm 0.03 | 30.57 \pm 0.03 |
| Glucemia (mg/100ml) | T | 102.30 \pm 1.98 ^a | 120.09 \pm 1.98 | 117.30 \pm 4.90 |
| | Controles | 123.17 \pm 1.00 | 124.96 \pm 5.09 | 121.72 \pm 1.17 |
| Insulinemia (μ U/ml) | T | 12.79 \pm 0.33 ^a | 43.47 \pm 0.37 | 41.23 \pm 0.46 |
| | Controles | 45.68 \pm 1.10 | 48.29 \pm 0.36 | 50.48 \pm 0.56 |

^ap < 0.05 respecto a las ratas C

Tabla 7.- Peso corporal, niveles circulantes de glucosa, insulina, GH y contenido hipofisario de GH de ratas adultas tirodectomizadas (T) y controles a los 77, 82 y 87 días de vida (5, 10 y 15 días después de la tirodectomía) (ddT) . Media de 8-10 animales \pm DS.

| | | DIAS DESPUES T (ddT) | | |
|------------------------------|-----------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| | | Días de vida () | | |
| | | 5 ddT (77) | 10 ddT (82) | 15 ddT (87) |
| Peso corporal (g) | T | 159.70 \pm 3.42 ^a | 163.25 \pm 4.57 ^a | 166.20 \pm 3.59 ^a |
| | Controles | 162.83 \pm 3.23 | 187.48 \pm 3.73 | 193.72 \pm 4.92 |
| GH plasmática (ng/ml) | T | 28.80 \pm 4.71 ^a | 25.42 \pm 3.52 ^a | 15.56 \pm 1.52 ^a |
| | Controles | 51.03 \pm 10.03 | 71.13 \pm 16.41 | 98.21 \pm 7.63 |
| GH hipofisaria (μ g/mg) | T | 32.96 \pm 0.19 ^a | 49.81 \pm 0.14 ^a | 10.56 \pm 0.10 ^a |
| | Controles | 69.91 \pm 0.74 | 52.24 \pm 0.04 | 32.47 \pm 0.16 |
| Glucemia (ng/100ml) | T | 110.65 \pm 1.58 | 108.96 \pm 2.28 ^a | 120.63 \pm 1.71 |
| | Controles | 118.64 \pm 2.86 | 123.86 \pm 4.57 | 123.05 \pm 1.90 |
| Insulinemia (μ U/ml) | T | 47.35 \pm 3.34 ^a | 36.95 \pm 4.43 ^a | 32.42 \pm 2.62 ^a |
| | Controles | 64.31 \pm 5.50 | 63.39 \pm 4.03 | 66.95 \pm 2.41 |

^ap < 0.05 respecto a las ratas C

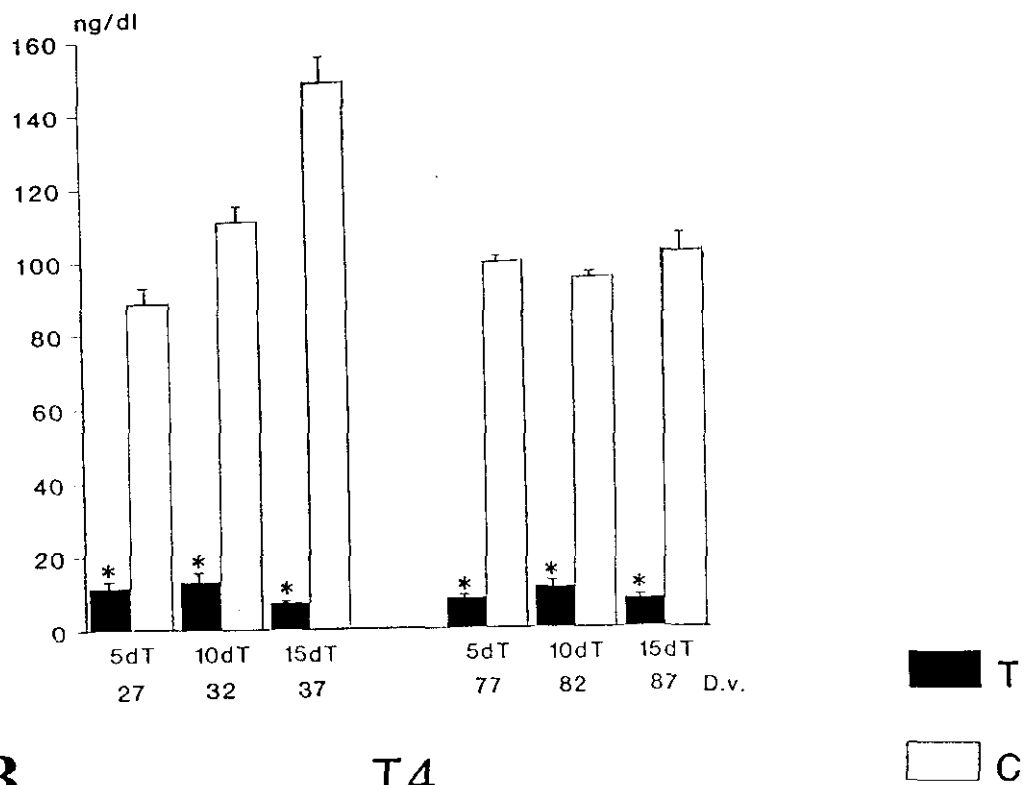
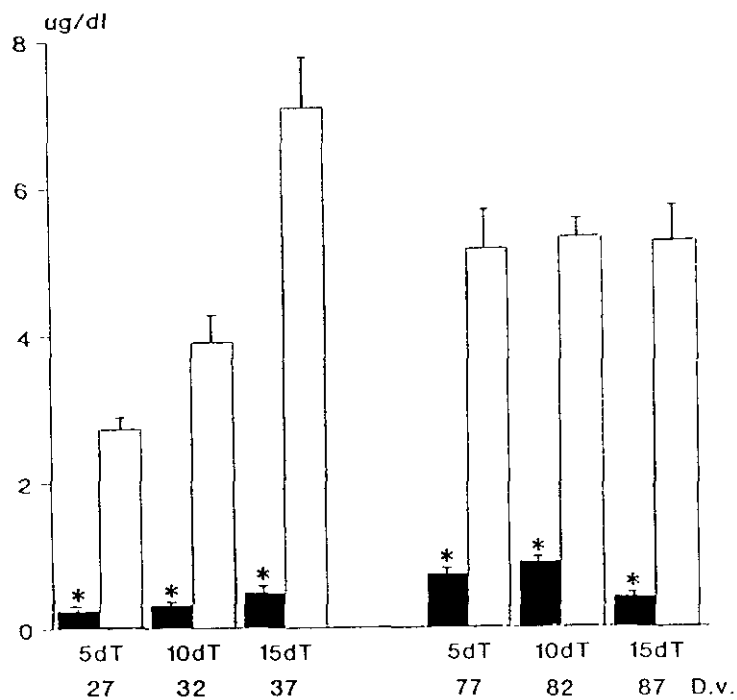
A**T₃****B****T₄**

Fig 18 Niveles circulantes de T₃ (A) y T₄ (B) en ratas destetadas y adultas tiroidectomizadas (T) y controles (C) determinados por RIA. Los animales se sacrificaron a los 5, 10 y 15 días después de la tiroidectomía, que corresponden a 27, 32 y 37 días de vida en el caso de la población destetada, y a 77, 82 y 87 días en el de la adulta. Media \pm DS de 8-10 animales. * Significación estadística respecto a las ratas control.

6 y 7).

3.3.3. Glucemia e insulinemia.

Los niveles de insulina disminuyeron en los animales destetados a los 5 días después de la tiroidectomía, pero no a los 10 ni a los 15 días después de la operación; las ratas adultas hipotiroideas, sin embargo, presentaron valores plasmáticos de esta hormona inferiores a los de sus respectivos controles desde los 5 días después de la operación (Tablas 6 y 7).

La glucemia descendió respecto a las ratas control, en los animales destetados a los 5 días después de la operación y en los adultos a los 10 días, mientras que en los otros estadios analizados, los niveles circulantes de glucosa mostraron unas cifras similares a los de la población control (Tablas 6 y 7).

3.3.4. IGFs: niveles séricos y expresión del ARNm hepático.

3.3.4.1. Niveles séricos.

Los niveles de IGF-I en suero fueron más bajos en los animales operados respecto a los controles tanto a los 10 días después de la tiroidectomía (40.46% a 32 días de vida y 82.55% a 72 días) como a los 15 días (45.52% a 37 días y 32.09% a 87 días) (Figura 19). Sin embargo, sólo los animales destetados mostraron una diferencia significativa en cuanto a los valores circulantes de IGF-I respecto a sus controles a los 5 días después de la operación, quizás por falta de población en adultas.

El IGF-II sólo fue dosificado en los animales neonatales, ya que sus niveles en las ratas destetadas y adultas son despreciables, se sitúan por debajo de la sensibilidad del método.

3.3.4.2. Expresión del ARNm hepático.

La expresión del IGF-I en hígado fue inferior para las dos poblaciones de ratas destetadas y adultas tiroidectomizadas en los tres estadios analizados siempre respecto a los animales control (Figura 19); este hecho, correlacionado con los niveles séricos anteriormente mostrados, nos hace sugerir una posible regulación a nivel transcripcional en la secreción de los IGFs por la falta de hormonas tiroideas.

3.3.5. Estudio de regresión lineal y correlación.

La Figura 20 resume los resultados del análisis de la regresión de alguno de los parámetros estudiados en estos experimentos. Para los cálculos se reunieron los datos obtenidos de los tres estadios de las poblaciones destetada y adulta.

Las ratas destetadas y adultas presentaron una alta correlación entre los niveles

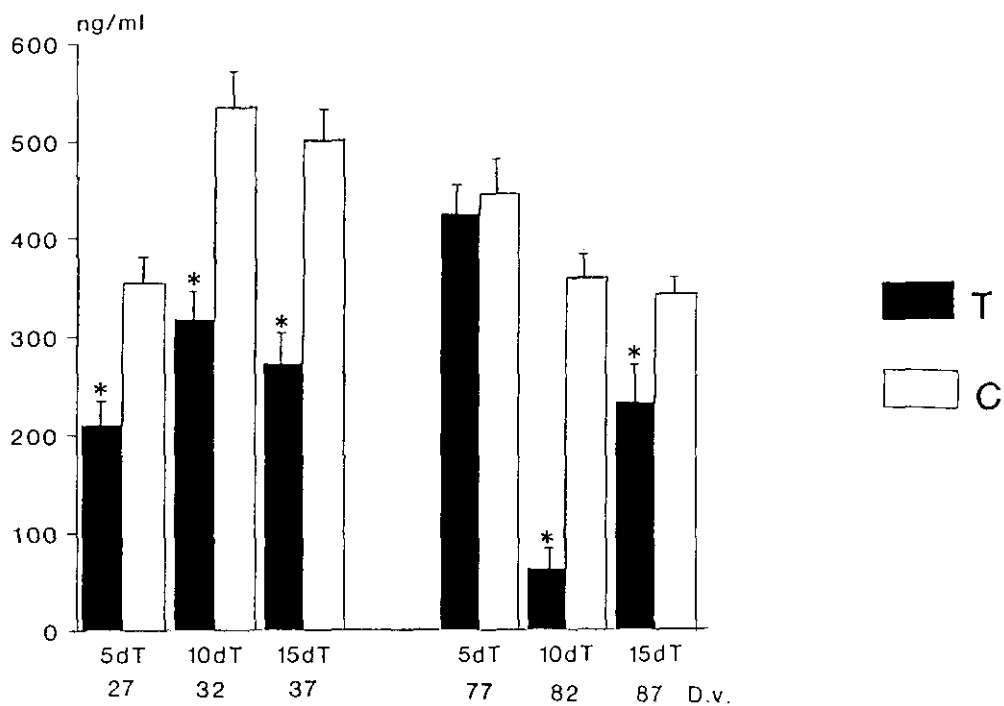
Fig 19 Niveles séricos (A) y expresión hepática del ARNm (B) de IGF-1 en ratas destetadas y adultas tiroidectomizadas (T) y controles (C) a los 5, 10 y 15 días después de la operación (27, 32 y 37 ó 77, 82 y 87 días, respectivamente).

A) Media \pm DS de 8 animales.

B) Ensayo de protección de la RNasa y cuantificación densitométrica (5 análisis diferentes).

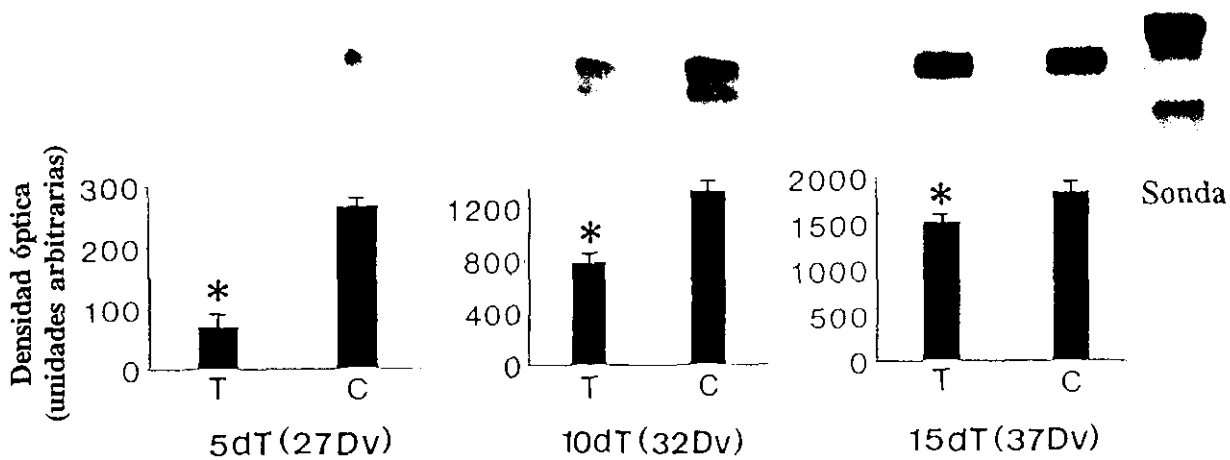
* Significación estadística respecto a la población de animales control.

A IGF-I

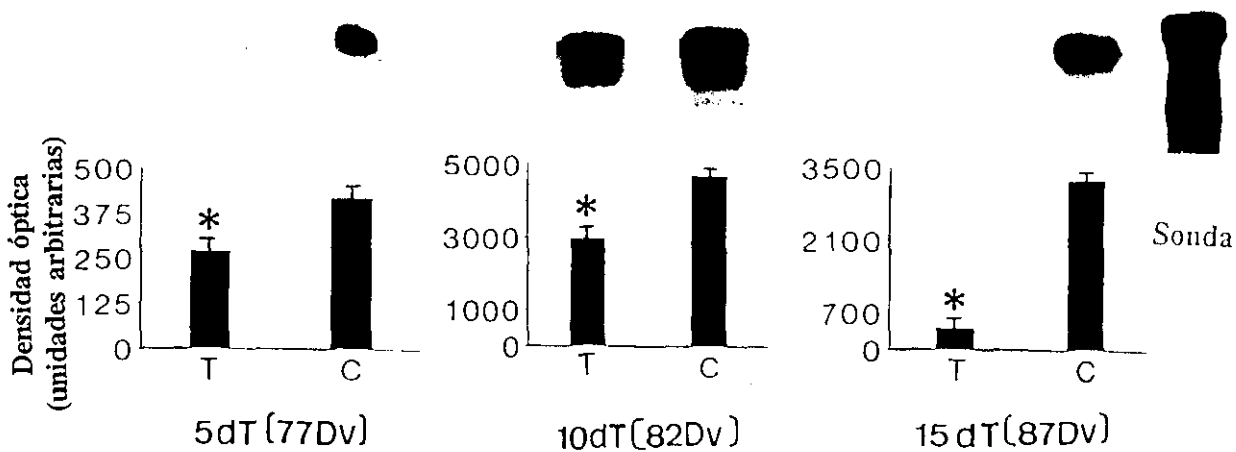


B EXPRESION DEL ARNm HEPATICO (IGF-I)

Destetadas



Adultas



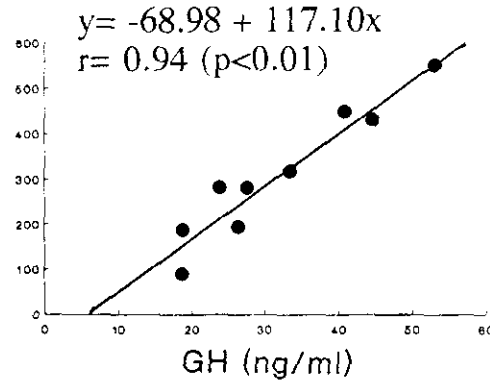
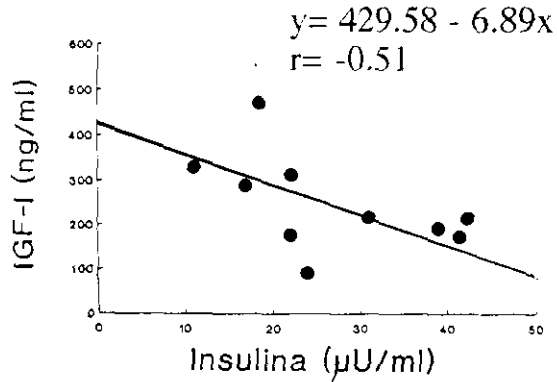
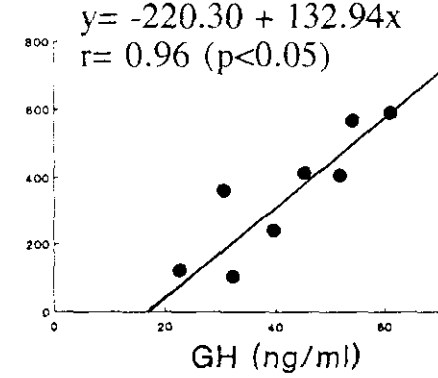
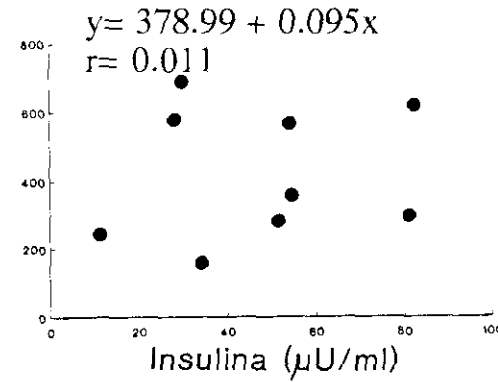
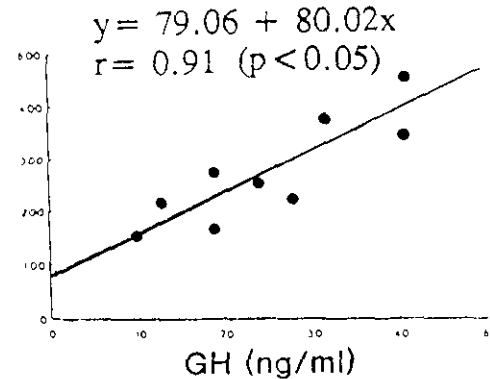
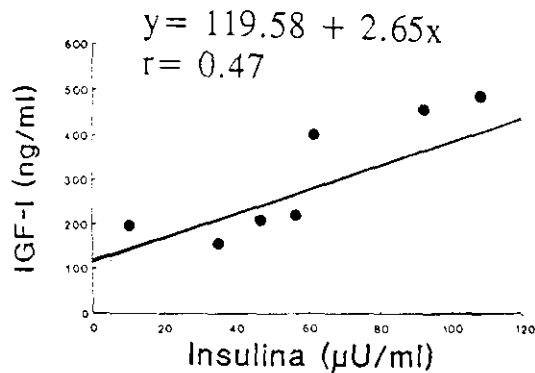
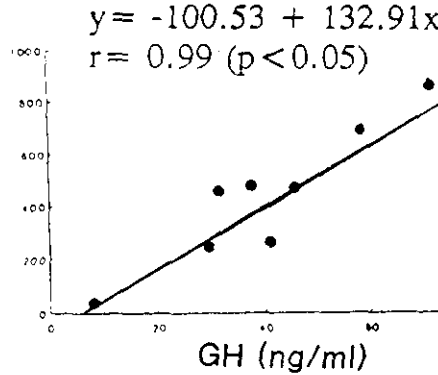
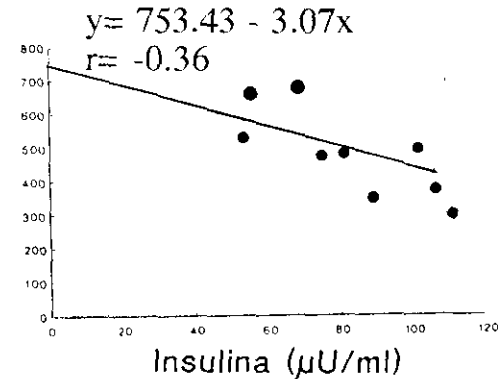
A**DESTETADAS****TIROIDECTOMIZADAS (T)****CONTROLES (C)****B****ADULTAS****TIROIDECTOMIZADAS (T)****CONTROLES (C)**

Fig 20 Análisis de regresión lineal y coeficiente de correlación de los niveles de IGF-I en suero y las concentraciones plasmáticas de insulina y GH en ratas destetadas (A) y adultas (B) tiroidectomizadas (T) y control (C). Este análisis se efectuó reuniendo los datos de los tres estadios de cada población (27, 32, 37 y 77, 82 y 87 días de vida, respectivamente). Se muestran las diferencias estadísticas.

de GH en plasma y los de IGF-I en suero tanto en los animales tiroidectomizados ($r=0.94$, $p<0.01$ y $r=0.91$, $p<0.05$, respectivamente) como en los controles ($r=0.96$, $p<0.05$ y $r=0.99$, $p<0.05$) (Figura 20). Por el contrario, la correlación encontrada entre la insulinemia y los valores circulantes de IGF-I en las ratas destetadas tiroidectomizadas y controles fue muy baja e incluso, negativa ($r=-0.51$ y $r=0.011$, respectivamente), e igual ocurrió en el caso de los animales adultos ($r=0.47$ y $r=-0.36$, respectivamente) (Figura 20).

3.3.6. IGFBPs: niveles séricos y expresión del ARNm hepático.

3.3.6.1. Niveles séricos.

Las IGFBPs del suero se analizaron por "Western ligand blot", y posteriormente se hizo un estudio comparativo empleando "Western ligand blot" y "Western inmunoblot" para identificar IGFBP-2, dado que el antisuero anti-bIGFBP-2 fue el único de los ensayados que dió reacción cruzada con las IGFBPs circulantes.

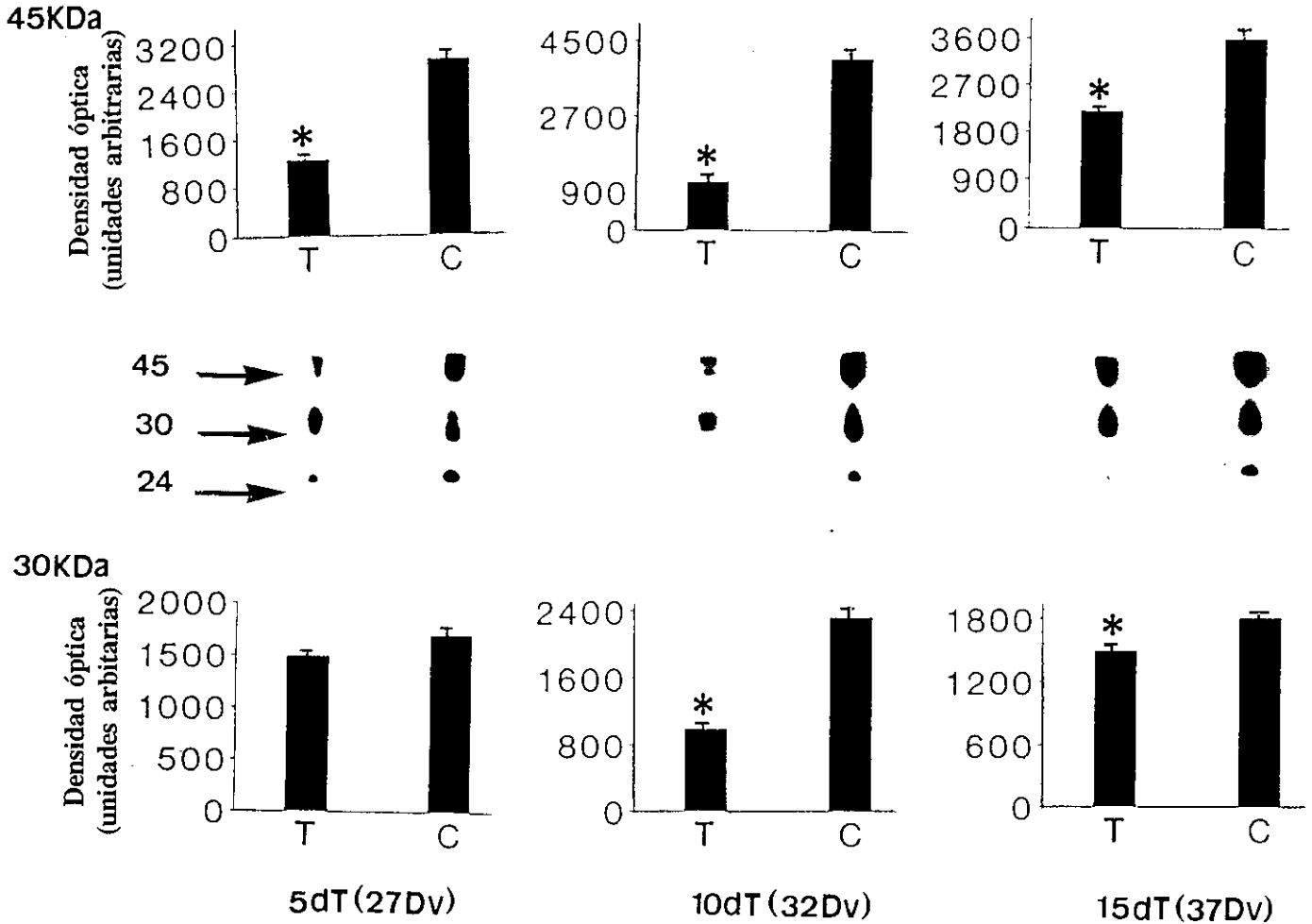
3.3.6.1.1. Western ligand blot.

Los niveles en suero de las proteínas ligadoras de bajo peso molecular (IGFBP-1 y 2) fueron inferiores en los animales tiroidectomizados respecto a sus controles en las dos poblaciones de ratas (destetadas y adultas) para todas las edades analizadas a los 10 y 15 días después de la operación, y sólo a los 5 días después de la tiroidectomía para los animales adultos (Figuras 21 y 22). También se encontró una disminución en la intensidad de las bandas de IGFBP-3 para todos los animales destetados y adultos tiroidectomizados respecto a los controles (5, 10 y 15 días después de la operación) (Figuras 21 y 22).

3.3.6.1.2. Western inmunoblot.

El análisis mediante "Western inmunoblot" mostró que, tanto los animales destetados como los adultos tiroidectomizados, y en todas las etapas consideradas, presentaban un ligero aumento en la intensidad de la banda correspondiente a IGFBP-2 respecto a la población control (Figuras 21 y 22). Así pues, por la comparación de estos resultados con los obtenidos mediante "Western ligand blot", se podría decir que en estas ratas (destetadas y adultas) se produjo un incremento en los niveles de IGFBP-2 circulante, y que este aumento fue menos marcado que el descenso provocado por el hipotiroidismo sobre los valores séricos de IGFBP-1, puesto que el "ligand blot", que muestra los niveles circulantes conjuntos correspondientes al complejo constituido por las proteínas de bajo peso molecular (IGFBP-1 y 2), nos reveló una disminución en la intensidad de estas bandas de 30kDa (Figuras 21 y 22).

A WESTERN LIGAND BLOT (Destetadas)



B WESTERN INMUNOBLOT

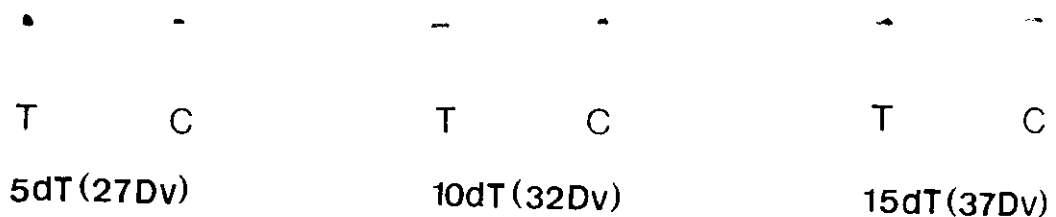
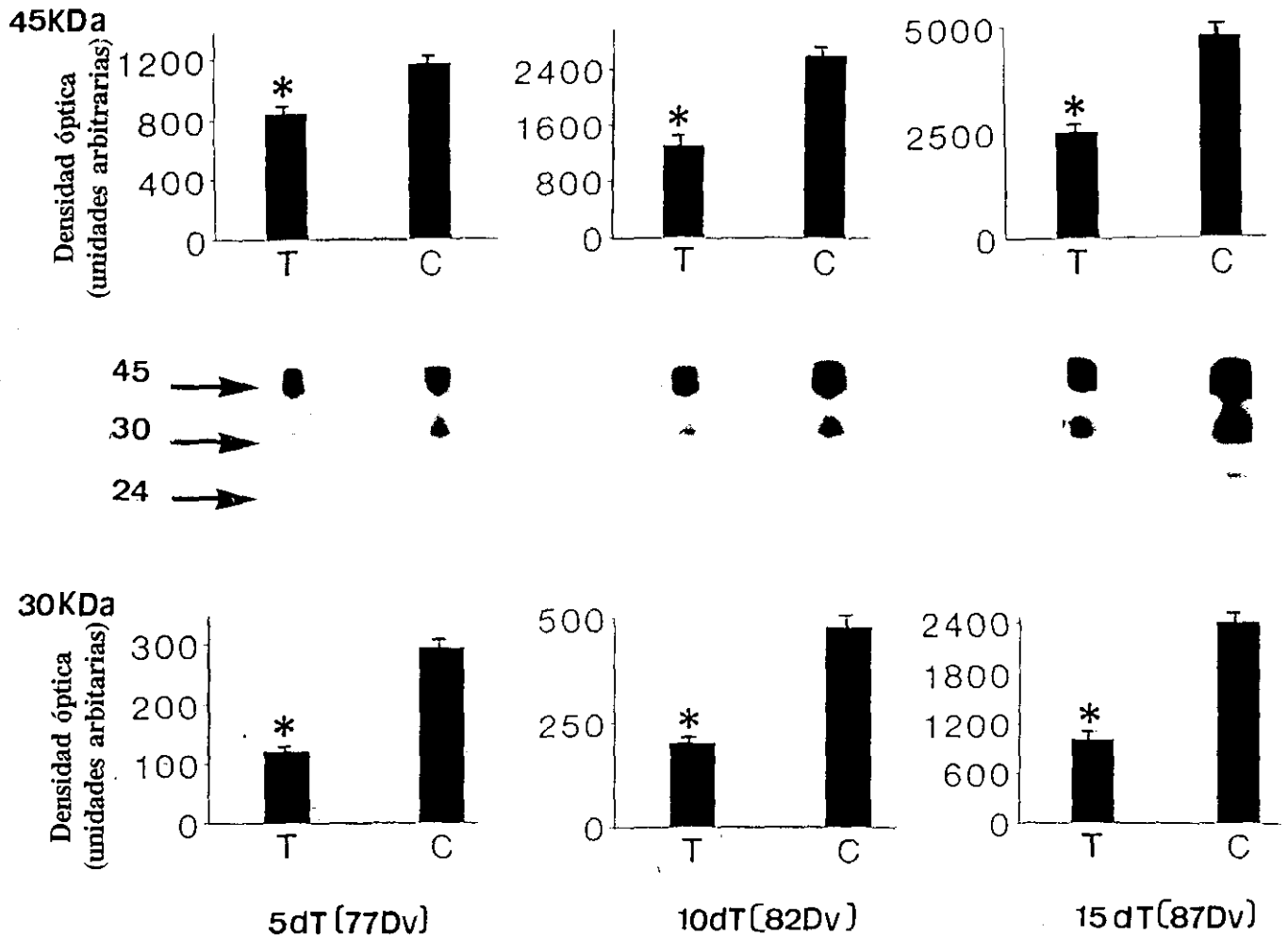


Fig 21 A) Análisis mediante "Western ligand blot" de los niveles de las IGFbps en ratas destetadas tiroidectomizadas (T) y controles (C) de 27, 32 y 37 días (5, 10 y 15 días después de la tiroidectomía). Se analizaron 2.5µl de suero. Se muestra la cuantificación densitométrica de las concentraciones de las IGFbps de las mismas poblaciones. Media ± DS de 4 análisis diferentes. * Significación estadística respecto a la población control.

B) Contenido de IGFBP-2 del suero de ratas destetadas tiroidectomizadas (T) y controles (C) de 27, 32 y 37 días de edad (5, 10 y 15 días después de la operación). El análisis se efectuó mediante "Western inmunoblot".

A WESTERN LIGAND BLOT (Adultas)



B WESTERN INMUNOBLOT

T C T C T C

5dT (77Dv) 10dT (82Dv) 15dT (87Dv)

Fig 22 A) Contenido de IGFbps en el suero de ratas adultas tiroidectomizadas (T) y controles (C) de 77, 82 y 87 días (5, 10 y 15 días después de la tiroidectomía). Se analizaron 2.5µl de suero mediante "Western ligand blot". Se muestra la cuantificación densitométrica de los niveles de las IGFbps de dichos animales. Media ± DS de 4 análisis diferentes. * Significación estadística respecto a la población control.

B) Análisis mediante "Western inmunoblot" de los niveles de IGFBP-2 en suero de ratas adultas tiroidectomizadas (T) y controles (C) de 77, 82 y 87 días de edad (5, 10 y 15 días después de la operación).

3.3.6.2. Expresión del ARNm hepático.

Los niveles de ARNm hepático de IGFBP-1 disminuyeron en las ratas destetadas hipotiroideas a los 5, 10 y 15 días después de la tiroidectomía (Figura 23). Sin embargo, la población adulta tiroidectomizada mostró un descenso en la expresión de esta proteína de bajo peso molecular a los 5 y 10 días después de la operación, pero a los 15 días después de la tiroidectomía aumentó, siempre respecto a las ratas control (Figura 24). Así mismo, se observó también como a medida que aumentaba la edad del animal control disminuían los niveles de ARNm de esta proteína, dado que esta IGFBP es constitutiva de etapas inmaduras.

Al igual que sucedía con los niveles de ARNm de IGFBP-1 en el hígado de las ratas control, la expresión hepática de IGFBP-2 disminuía conforme aumentaba la edad del animal, y este descenso se observó muy claramente en la población adulta (Figura 24). Además, la expresión de IGFBP-2 se vió incrementada a 5, 10 y 15 días después de la tiroidectomía en las ratas destetadas y a los 10 y 15 días después de la operación en las adultas (Figuras 23 y 24).

Finalmente, la expresión hepática de la proteína transportadora de alto peso molecular (IGFBP-3), característica de la edad adulta, disminuyó en los animales destetados tiroidectomizados a los 10 y 15 días después de la operación (Figura 23), mientras que en las ratas adultas, este descenso se observó ya a los 5 días después de la intervención quirúrgica (Figura 24).

De nuevo, y al igual que ocurrió con los IGFs, encontramos la existencia de un paralelismo entre las fluctuaciones de los niveles séricos de las IGFBPs y las del ARNm hepático de las proteínas transportadoras.

3.4. TRATAMIENTO CON INSULINA DE RATAS TIROIDECTOMIZADAS DESTETADAS Y ADULTAS.

Para profundizar en el papel que desempeña la insulina en la secreción de los IGFs, e intentar restaurar los bajos valores circulantes de dicha hormona que presentaban los animales destetados y adultos después de tiroidectomizarlos, se les inyectó insulina a los 10 días después de la operación (32 y 82 días de vida, respectivamente).

3.4.1. Evolución del peso corporal.

El peso corporal, que disminuyó en las ratas tiroidectomizadas, aumentó tras el tratamiento de estos animales con insulina en un 22.95% para los destetados y en

EXPRESION DEL ARNm HEPATICO (IGFBPs)

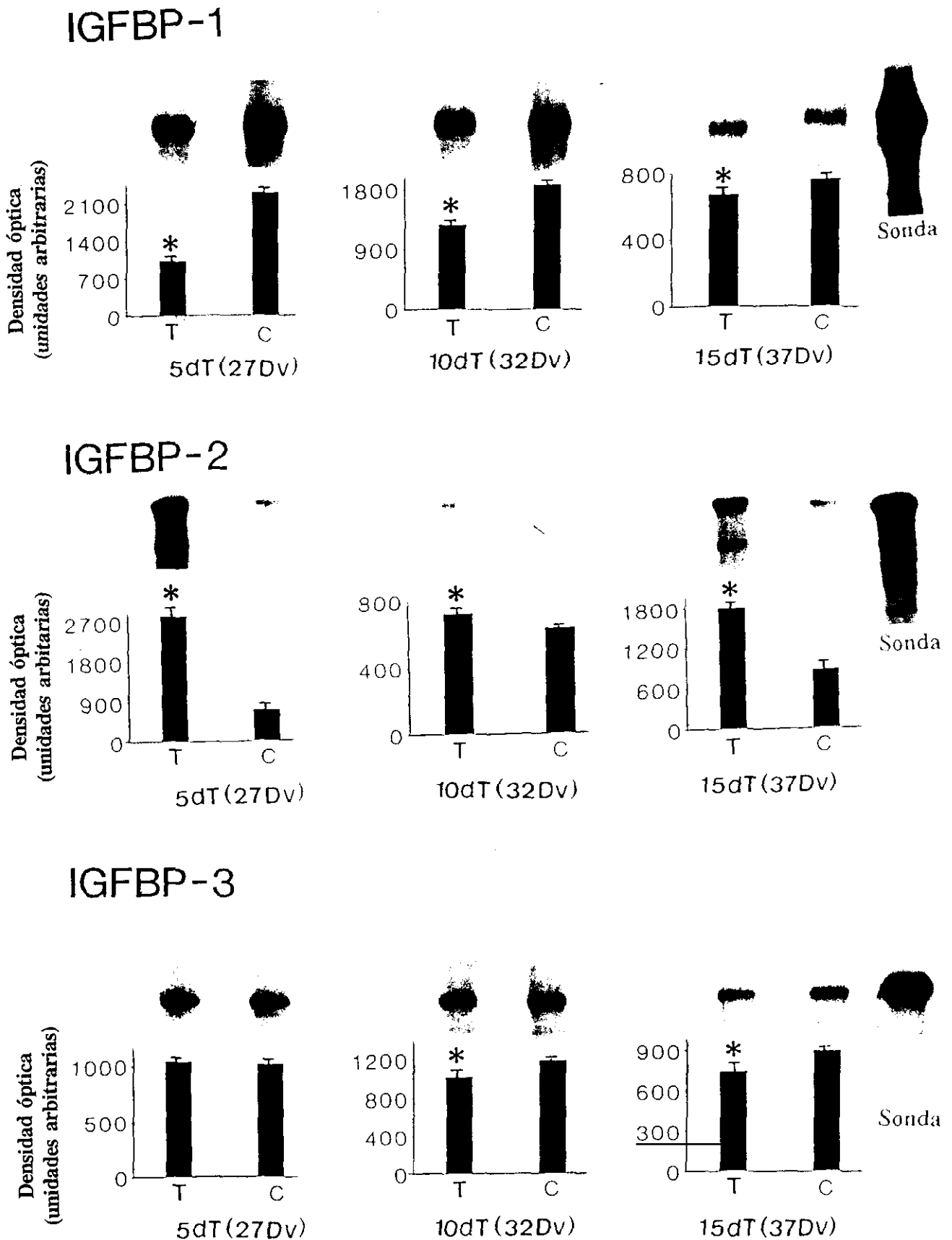
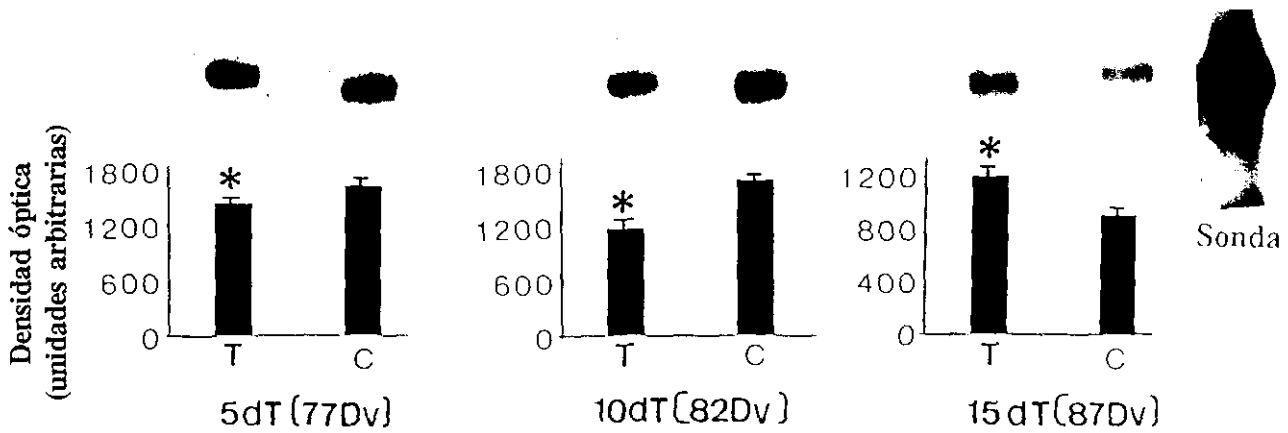


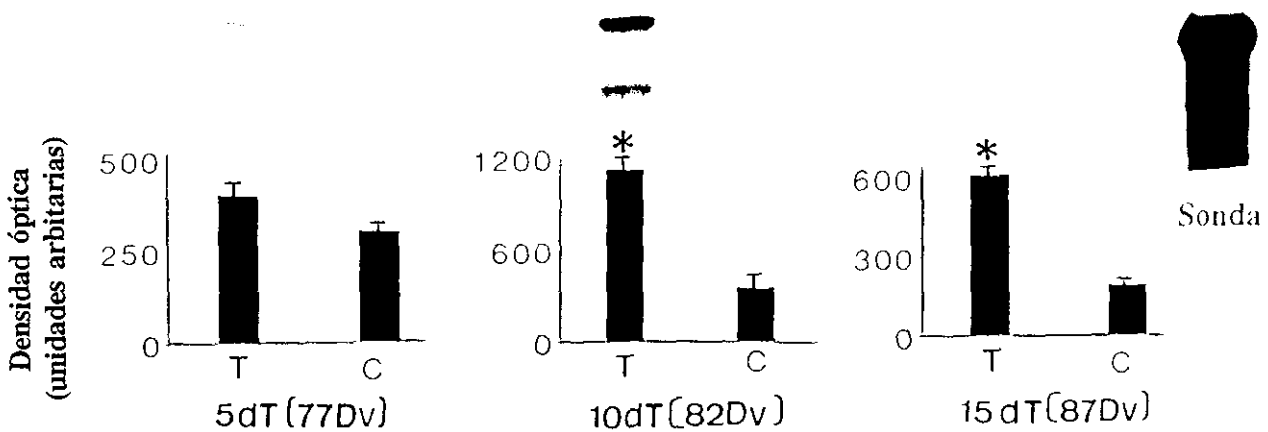
Fig 23 Expresión hepática del ARNm y cuantificación densitométrica de IGFBP-1, 2 y 3 de ratas destetadas tiroidectomizadas (T) y controles (C) de 27, 32 y 37 días de vida (5, 10 y 15 días después la tiroidectomía). El análisis se efectuó mediante la técnica del ensayo de protección de la RNasa. Media \pm DS de 5 análisis diferentes. * Significación estadística respecto a los animales control.

EXPRESION DEL ARNm HEPATICO (IGFBPs)

IGFBP-1



IGFBP-2



IGFBP-3

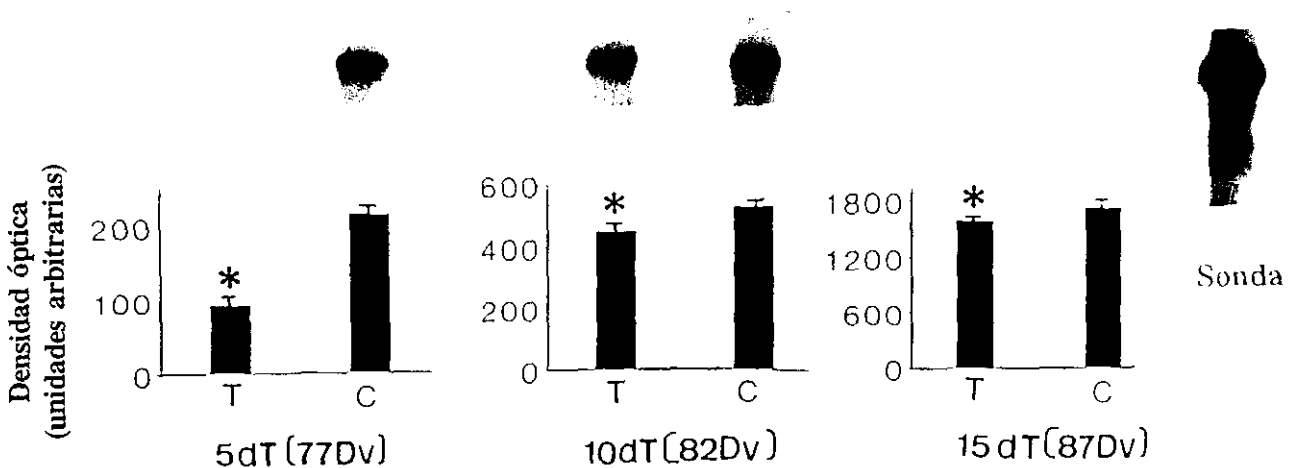


Fig 24 *Análisis mediante ensayo de protección de la RNasa de los transcritos hepáticos de IGFBP-1, 2 y 3 de ratas adultas tiroidectomizadas (T) y control (C) de 77, 82 y 87 días (5, 10 y 15 días después de la tiroidectomía). Media ± DS de 5 análisis diferentes. * Significación estadística respecto a la población control.*

un porcentaje menor para los adultos (8.71%). No obstante, tanto a los 37 como a los 87 días de vida (ratas destetadas y adultas, respectivamente) el peso de estas poblaciones tratadas fue inferior al de sus respectivos controles (Tabla 8).

3.4.2. Niveles séricos de T_3 y T_4 y plasmáticos e hipofisarios de GH.

Los valores circulantes de las hormonas tiroideas de las ratas tratadas con insulina permanecieron por debajo de los niveles de la población control (Tabla 8). La concentración sérica de T_3 aumentó respecto a los animales tiroidectomizados, tanto en el caso de las ratas destetadas (57.41%) como en el de las adultas (27.55%), sin embargo, los niveles de T_4 no se modificaron respecto a los de la población operada en destetadas y bajaron en la adulta.

El tratamiento con insulina de las ratas tiroidectomizadas provocó un aumento distinto en porcentaje de los niveles de GH circulante y que difirió según la edad del animal (Tabla 8): 25.43% para las destetadas y 63.56% para las adultas, respecto a las ratas operadas. De un modo similar, el contenido de GH en hipófisis se vio incrementado en un porcentaje superior al 35.00% para ambas poblaciones hipotiroideas inyectadas con insulina respecto a las ratas tiroidectomizadas, aunque, como sucedió en el plasma, los niveles alcanzados continuaron siendo significativamente inferiores a los de los animales control.

3.4.3. Glucemia e insulinemia.

La insulinemia de las ratas tiroidectomizadas sometidas al tratamiento con la hormona, como se esperaba, fue significativamente superior (61.26% en el caso de las destetadas y 48.73% en el de las adultas) a la de la población control (Figura 25). Sin embargo, en el momento del sacrificio, no se encontraron diferencias significativas entre las glucemias de estas ratas hipotiroideas tratadas con insulina y las de las ratas control, quizá por haberse restaurado ya la hipoglucemia producida por la administración de la hormona (Tabla 8).

3.4.4. IGFs: niveles séricos y expresión del ARNm hepático.

3.4.4.1. Niveles séricos.

Los niveles de IGF-I en suero fueron más bajos en los animales tratados con insulina que en los controles, y se mantuvieron iguales a los tiroidectomizados, a 37 y 87 días de vida (Figura 25). Así, y a pesar de que la administración de la insulina aumentó sus propios niveles circulantes, no modificó los bajos valores de IGF-I disminuidos por la tiroidectomía.

Tabla 8.- Peso corporal, niveles circulantes de T₃ y T₄, glucosa, GH plasmática y contenido hipofisario de GH de ratas destetadas y adultas tiroidectomizadas (T) y tratadas con insulina (T + I) y controles a los 15 días después de la tiroidectomía (37 y 87 días de vida). Media de 8-10 animales ± DS.

| | Peso corporal (g) | T ₃ sérica (ng/dl) | T ₄ sérica (μg/dl) | GH plasmática (ng/ml) | GH hipofisaria (ng/mg) | Glucemia (mg/dl) |
|-------------------|------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-----------------------------|---------------------------|----------------------------|
| DESTETADAS | | | | | | |
| T | 72.55 ± 2.40 ^a | 7.02 ± 0.18 ^a | 0.26 ± 0.03 ^a | 37.62 ± 1.06 ^a | 27.24 ± 0.39 ^a | 127.30 ± 4.90 ^a |
| Controles | 118.17 ± 2.21 | 116.00 ± 21.41 | 3.61 ± 0.21 | 66.46 ± 9.12 | 33.48 ± 2.69 | 131.72 ± 1.17 |
| T + I | 91.05 ± 2.55 ^{a,b} | 11.05 ± 0.12 ^{a,b} | 0.36 ± 0.07 ^a | 50.45 ± 6.94 ^{a,b} | 29.29 ± 0.38 ^a | 124.86 ± 8.12 |
| ADULTAS | | | | | | |
| T | 160.20 ± 3.59 ^a | 8.25 ± 0.49 ^a | 0.44 ± 0.08 ^a | 16.05 ± 1.49 ^a | 13.33 ± 0.12 ^a | 130.63 ± 1.71 ^a |
| Controles | 193.70 ± 4.92 | 99.00 ± 16.26 | 5.55 ± 0.59 | 100.37 ± 4.09 | 66.90 ± 1.40 | 133.05 ± 1.90 |
| T + I | 176.83 ± 3.32 ^{a,b} | 10.33 ± 0.09 ^{a,b} | 0.17 ± 0.05 ^{a,b} | 59.87 ± 1.31 ^{a,b} | 17.15 ± 0.87 ^a | 121.32 ± 2.79 |

^ap < 0.05 respecto a las ratas C

A

IGF-I

INSULINA

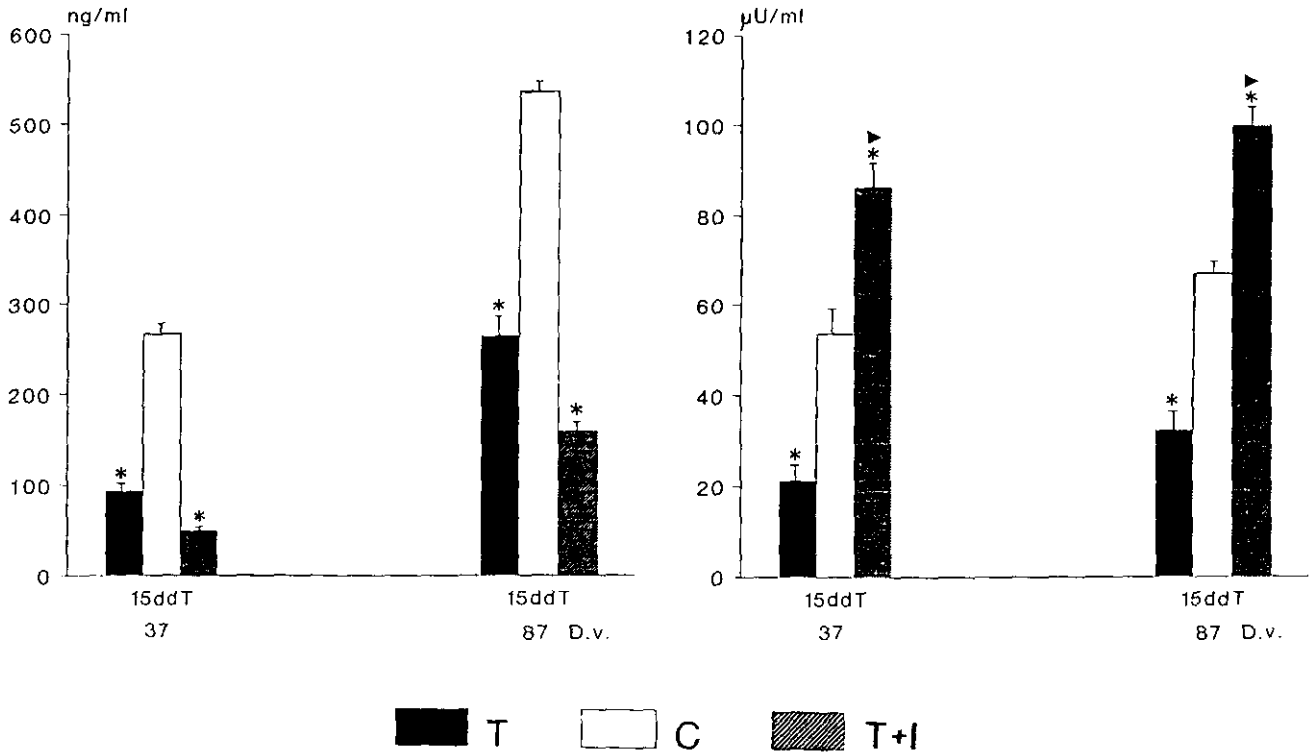
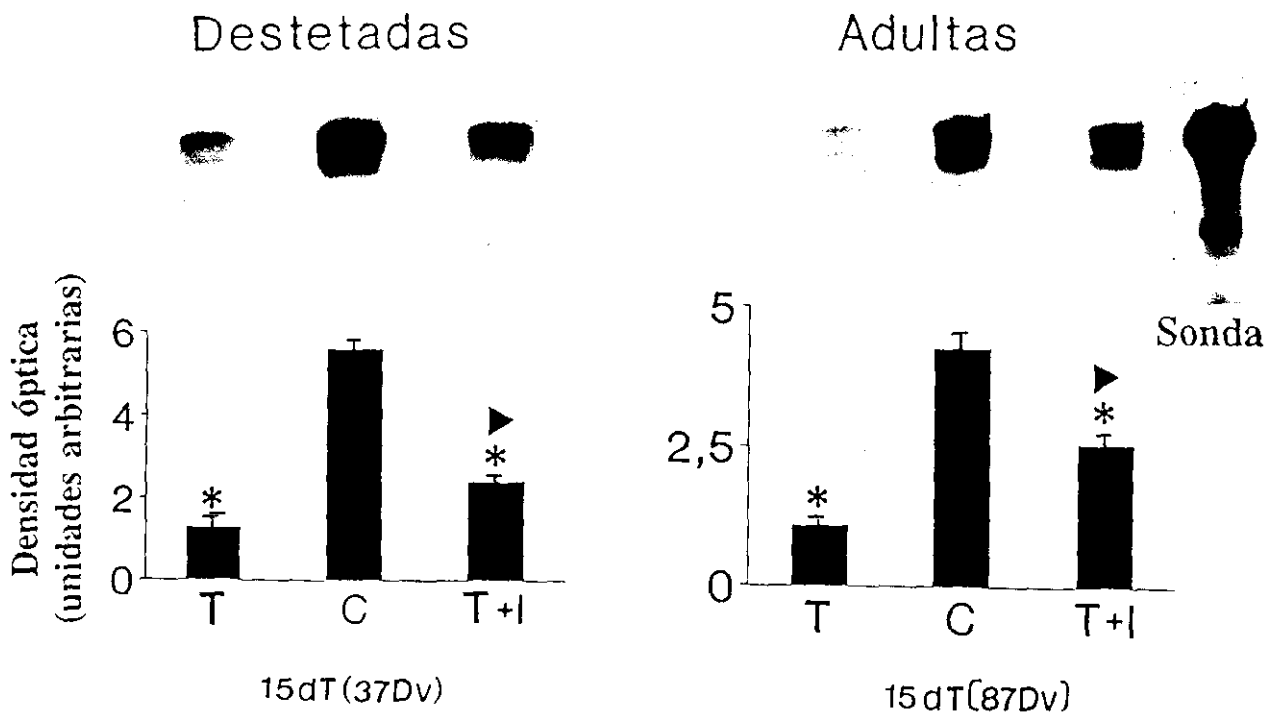
**B****EXPRESION DEL ARNm HEPATICO (IGF-I)**

Fig 25 A) Niveles séricos de IGF-I y plasmáticos de insulina en animales destetados y adultos tiroidectomizados (T), controles (C) y tiroidectomizados tratados con insulina (T + I) de 37 y 87 días de edad, respectivamente. Media \pm DS de 8-10 ratas.
 B) Análisis mediante ensayo de protección de la RNasa del ARNm de IGF-I de las ratas anteriores. Media \pm DS de 4 análisis diferentes.
 * Significación estadística respecto a los animales control. ▶ Significación estadística respecto a la población tiroidectomizada.

3.4.4.2. Expresión del ARNm hepático.

La Figura 25 muestra que, tanto en las ratas tiroidectomizadas destetadas como en las adultas, la administración de insulina provocó un aumento en los niveles del ARNm hepático de IGF-I respecto a la población operada, aunque dichos valores no llegaron a alcanzar los de las ratas control (se situaron por debajo de ellos). De nuevo, como ocurría a nivel circulante, se observó como el tratamiento con insulina no era capaz de normalizar la baja expresión de los transcritos hepáticos de IGF-I causada por la tiroidectomía.

3.4.5. Estudio de regresión lineal y correlación.

Para el análisis de correlación se recogieron todos los datos correspondientes a las dos poblaciones de los dos estadios y se muestran en la Figura 26 .

Al igual que en el caso de las ratas destetadas y adultas tiroidectomizadas y controles, se volvió a encontrar una alta correlación entre los niveles de GH en plasma y los de IGF-I en suero ($r = 0.91$ y $r = 0.98$, $p < 0.05$ para las poblaciones hipotiroideas destetada y adulta inyectadas con insulina, respectivamente). Por el contrario, la correlación hallada para la insulinemia y los niveles séricos de IGF-I fue de nuevo, muy baja e incluso, negativa en los animales destetados y adultos tratados con insulina ($r = -0.038$ y $r = 0.62$, respectivamente) (Figura 26).

3.4.6. IGFBPs: niveles séricos y expresión del ARNm hepático.

3.4.6.1. Niveles séricos.

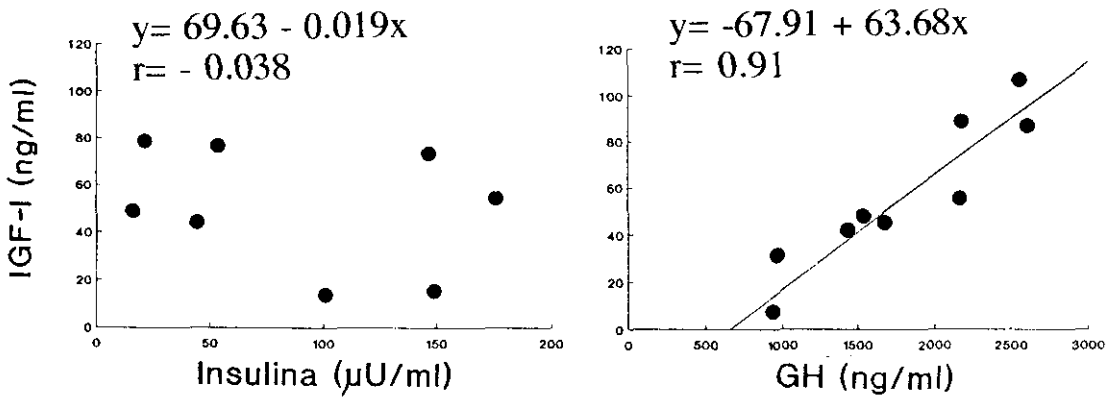
3.4.6.1.1. Western ligand blot.

La tiroidectomía causó un descenso en los niveles séricos de las proteínas transportadoras de 30 (IGFBP-1 y 2) y 45kDa frente a la población control. No obstante, la administración de insulina a estos animales operados produjo un incremento en los valores circulantes del complejo proteico de bajo peso molecular, tanto en las ratas destetadas como en las adultas, aunque en ninguna de estas dos poblaciones se llegaron a alcanzar los valores control (Figura 27).

En cuanto a la IGFBP-3, en los animales más jóvenes (destetados), la insulina sí aumentó sus niveles hasta alcanzar los valores control, aunque en el caso de las ratas adultas, el tratamiento hormonal no alteró las cifras circulantes de esta proteína transportadora (Figura 27), quizás porque la insulina tiene un mayor papel en la regulación del sistema IGFs/IGFBPs en etapas más inmaduras del desarrollo del animal que en el estadio adulto, donde parece ser que la GH pasa a tener una mayor relevancia, o también porque los niveles de GH después de la administración de la

DESTETADAS

TIROIDECTOMIZADAS (T + I)



ADULTAS

TIROIDECTOMIZADAS (T + I)

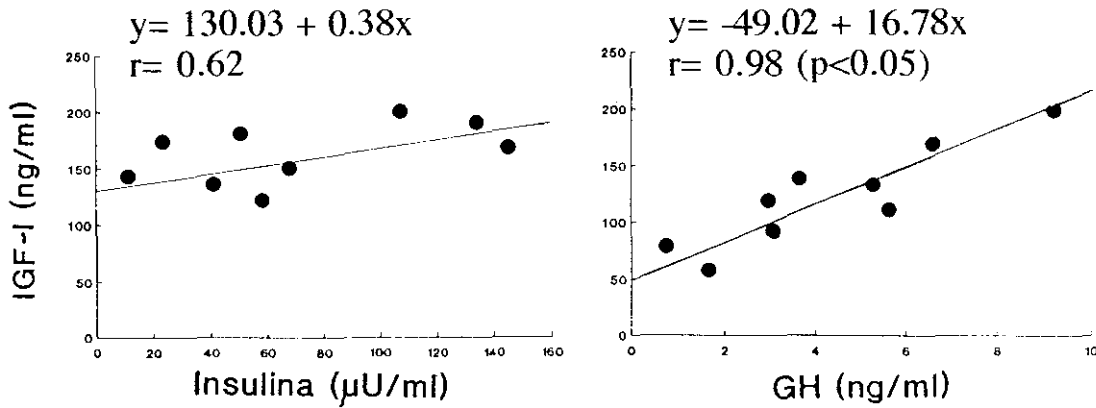


Fig 26 *Análisis de correlación lineal y coeficiente de correlación de los niveles circulantes de IGF-I e insulina y GH en ratas destetadas (37 días) y adultas (87 días) tiroidectomizadas tratadas con insulina (T + I). Se muestran las diferencias estadísticas.*

WESTERN LIGAND BLOT

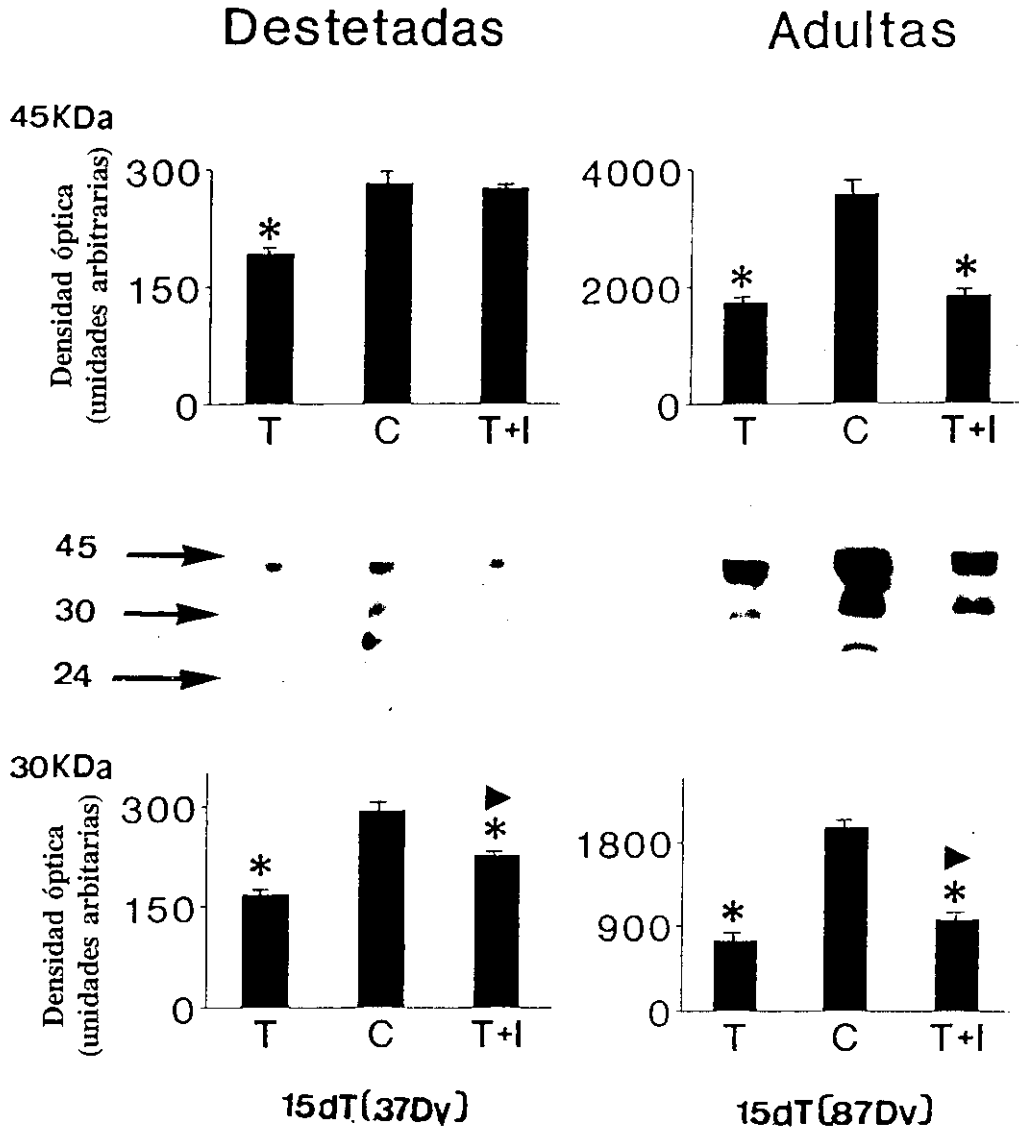


Fig 27 Niveles séricos de las IGFbps en ratas destetadas (37 días de vida) y adultas (87 días) tiroidectomizadas (T), controles (C) y tiroidectomizadas tratadas con insulina (T + I). El análisis se efectuó por medio de "Western ligand blot" y con 2.5µl de suero. Se muestra la cuantificación densitométrica de las concentraciones de las IGFbps de las mismas poblaciones. Media ± DS de 4 análisis diferentes.
 * Significación estadística respecto a los animales control. ▶ Significación estadística respecto a la población tiroidectomizada.

insulina fueron superiores en la población destetada.

3.4.6.2. Expresión del ARNm hepático.

La IGFBP-1, como ya se ha mencionado, se encuentra regulada por la insulina, por ello, no fue extraño el hecho de que las ratas sometidas al tratamiento experimentarían una disminución en la expresión hepática de esta IGFBP-1 respecto a la población control, y que tal descenso fuera incluso significativamente superior al padecido por los animales tiroidectomizados; esta disminución en los niveles de ARNm de IGFBP-1 pareció ser más acusada en el estadio adulto que en el destetado (Figura 28).

Los niveles de ARNm de IGFBP-3 aumentaron y se hicieron comparables a los controles tras el tratamiento con insulina, tanto en el caso de las ratas tiroidectomizadas destetadas como en las adultas, aunque en estas últimas, el incremento fue mayor y superó incluso los valores control quizás por el aumento de la GH (Figura 28).

En cuanto a la expresión hepática de IGFBP-2, en la población tiroidectomizada destetada a la que se le administró la hormona, disminuyó respecto a estos animales operados, de manera similar a lo que sucedía en el caso de los neonatos tiroidectomizados tratados con STZ, mientras que en los animales tiroidectomizados adultos tratados con insulina, los niveles de ARNm de esta proteína aumentaron (Figura 28).

3.4.7. Resumen de los resultados del estudio de tiroidectomía en ratas destetadas y adultas y de animales destetados y adultos operados tratados con insulina.

La tiroidectomía causó un descenso en la insulinemia y los niveles circulantes e hipofisarios de GH de las ratas destetadas y adultas respecto a las control. El déficit de hormonas también produjo un descenso en los valores séricos y de expresión del ARNm hepático de IGF-I, IGFBP-1 y 3, mientras que las cifras circulantes y las de los transcritos de IGFBP-2 aumentaban en estos animales destetados y adultos operados respecto a sus controles (Cuadro 2).

La administración de insulina a las ratas destetadas y adultas tiroidectomizadas se acompañó de un incremento de su insulinemia, de los niveles circulantes de GH y de su contenido en hipófisis respecto a los animales tiroidectomizados (Cuadro 2). No obstante, este tratamiento no modificó la expresión hepática ni los niveles circulantes del IGF-I respecto a las ratas operadas.

Fig 28 *Expresión hepática del ARNm de IGFBP-1, 2 y 3 de ratas destetadas (37 días) y adultas (87 días) tiroidectomizadas (T), controles (C) y tiroidectomizadas tratadas con insulina (T + I). El análisis se efectuó mediante el ensayo de protección de la RNasa. Media \pm DS de 4 análisis diferentes. * Significación estadística respecto a la población control. ► Significación estadística respecto a los animales tiroidectomizados.*

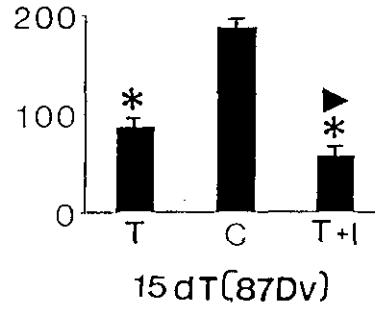
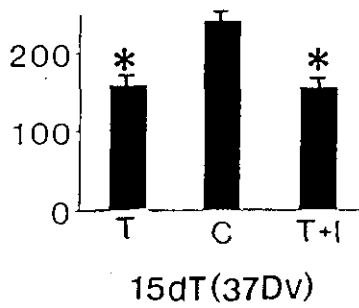
EXPRESION DEL ARNm HEPATICO (IGFBPs)

IGFBP-1

Destetadas

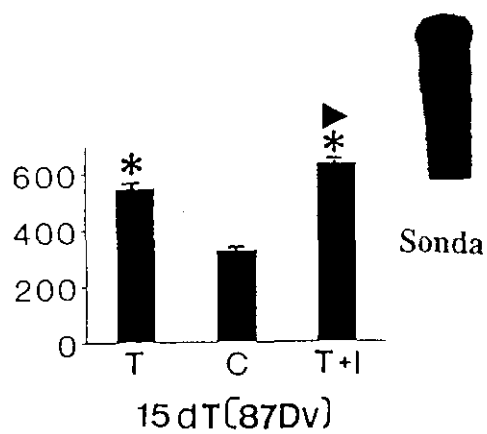
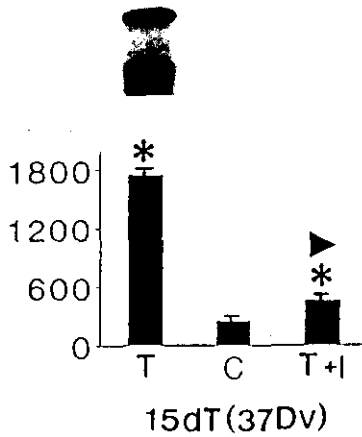
Adultas

Densidad óptica
(unidades arbitrarias)



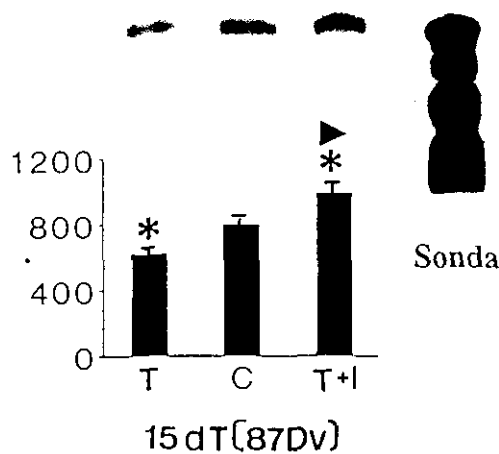
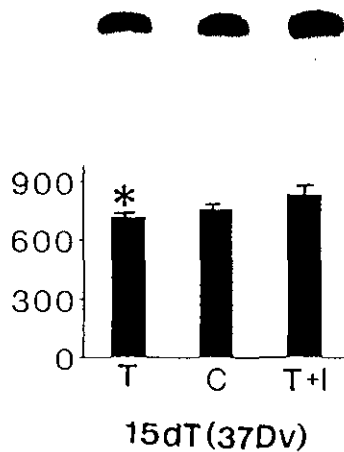
IGFBP-2

Densidad óptica
(unidades arbitrarias)



IGFBP-3

Densidad óptica
(unidades arbitrarias)



En cuanto a las IGFbps, la insulina aumentó los valores séricos de las proteínas de bajo peso molecular y también IGFBP-3 respecto a las ratas operadas, aunque tan solo esta última alcanzó los valores control en las ratas destetadas.

Los transcritos muestran que la IGFBP-1 guardó un paralelismo con respecto a valores circulantes, mientras que la IGFBP-2 disminuye en destetadas y aumenta en adultas.

La expresión hepática del ARNm de IGFBP-3 parece guardar un mayor paralelismo con los valores circulantes, aunque se encuentra aumentada en adultos (Cuadro 2).

Se estableció una correlación positiva entre los niveles circulantes de GH e IGF-I.

Cuadro 2.- Resumen de los resultados de los estudios de tiroidectomía (T) y tratamiento con insulina (T + I) en ratas destetadas y adultas respecto a la población control.

| | T | T + I | |
|-------------------------|---|------------|---------|
| | | DESTETADAS | ADULTAS |
| GLUCEMIA | ↓ | = | = |
| INSULINEMIA | ↓ | ↑ | ↑ |
| GH CIRCULANTE | ↓ | ↓ | ↓ |
| GH HIPOFISARIA | ↓ | ↓ | ↓ |
| IGF-I CIRCULANTE | ↓ | ↓ | ↓ |
| ARNm IGF-I | ↓ | ↓ | ↓ |
| IGFBP-1 y 2 CIRCULANTES | ↓ | ↓ | ↓ |
| ARNm IGFBP-1 | ↓ | ↓ | ↓ |
| ARNm IGFBP-2 | ↑ | ↑ | ↑ |
| IGFBP-3 CIRCULANTE | ↓ | = | ↓ |
| ARNm IGFBP-3 | ↓ | = | ↑ |

3.5. TRATAMIENTO CON T₄ DE RATAS TIROIDECTOMIZADAS NEONATALES, DESTETADAS Y ADULTAS.

Con el objeto de continuar nuestro estudio sobre la influencia del hipotiroidismo en el axis IGFs/IGFBPs, se sometió a los animales tiroidectomizados a una pauta de rehabilitación con T₄. Esta administración se llevó a cabo mediante

la inyección de la hormona o por el implante de pellets para, de esta manera, establecer una comparación entre ambas vías de absorción, dado que con los dispositivos de liberación controlada (pellet) se consigue una forma de administración más fisiológica y continuada. El tratamiento se inició a los 10 días después de la tiroidectomía (15, 32 y 82 días de vida, para las ratas neonatales, destetadas y adultas, respectivamente) y se prolongó durante 5 días. Sin embargo, en el caso de los animales destetados y adultos, se estudió también otra población en la que la duración de la rehabilitación fue de 10 días una vez obtenidos los resultados de 5 días.

3.5.1. Tratamiento con T_4 de las ratas neonatales tiroidectomizadas. Comparación entre dosis inyectadas y pellets.

3.5.1.1. Evolución del peso corporal.

El tratamiento de las ratas tiroidectomizadas con T_4 produjo un aumento de su peso corporal respecto a la población operada (Tabla 9), aunque este incremento fue superior cuando se administró al animal la hormona en forma de pellet (56.64%) y no como inyección (31.28%); además, esto supuso que la rata tratada con pellet igualara su peso al de la rata control frente a la rehabilitada con la inyección (21.52%). Se encontró una diferencia estadística entre los dos tipos de tratamiento.

3.5.1.2. Niveles séricos de T_3 y T_4 y plasmáticos e hipofisarios de GH.

Las hormonas tiroideas séricas, como cabía esperar, disminuyeron en los animales tiroidectomizados, aunque el tratamiento sustitutivo con tiroxina aumentó los niveles circulantes de T_3 y T_4 en estos animales operados (Tabla 9). Así pues, todos los grupos de ratas tratadas con T_4 mostraron un incremento en los niveles de hormonas tiroideas, que fue mayor con la administración de pellets, pero que en ningún caso resultó ser suficiente para alcanzar los valores control, y así, para las ratas tratadas con una inyección diaria de tiroxina, la diferencia respecto a las control se situó en un 84.78% para T_3 y en un 73.74% para T_4 , mientras que para las recuperadas con pellet fue de un 66.30% para la T_3 y de un 57.54% para la T_4 . Este comportamiento se debe a que las ratas neonatales presentan una elevación de hormonas tiroideas durante la etapa inmadura, y por ello, en este estadio, los niveles de estas hormonas son superiores a los de los animales adultos; así pues, en experimentos futuros intentaremos restaurar los niveles de hormonas tiroideas a los valores control mediante la administración de dosis superiores de T_4 .

El tratamiento de los animales tiroidectomizados con pequeñas dosis de

Tabla 9.- Peso corporal, niveles circulantes de glucosa, T₃, T₄, GH y contenido hipofisario de GH de ratas neonatales tiroidectomizadas (T), tratadas con una dosis de 1.5µg/100g de peso de T₄ vía ip o sc (pellet) (T + T₄) y controles de 20 días de vida (15 días después de la tiroidectomía). Media 8-10 animales ± DS.

| | Peso corporal (g) | T ₃ sérica (ng/dl) | T ₄ sérica (µg/dl) | GH plasmática (ng/ml) | GH hipofisaria (ng/mg) | Glucemia (ng/100ml) |
|---|-----------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|------------------------------|
| NEONATOS | | | | | | |
| T ₅ | 24.84 ± 0.83 ^a | 7.68 ± 0.02 ^a | 1.13 ± 0.55 ^a | 7.59 ± 0.62 ^a | 15.49 ± 3.54 ^a | 105.92 ± 4.85 ^a |
| Controles | 41.55 ± 0.71 | 99.52 ± 6.51 | 5.37 ± 0.46 | 2.18 ± 0.18 | 13.85 ± 1.45 | 131.62 ± 1.69 |
| T ₅ + T ₄ (inyección) | 32.61 ± 1.82 ^{a,b} | 15.15 ± 2.43 ^a | 1.41 ± 0.05 ^a | 14.07 ± 2.55 ^{a,b} | 20.15 ± 0.47 ^{a,b} | 114.93 ± 2.95 ^a |
| T ₅ + T ₄ (pellet) | 38.91 ± 1.46 ^{b,c} | 33.54 ± 4.72 ^{a,b} | 2.28 ± 0.79 ^a | 24.24 ± 3.53 ^{a,b,c} | 26.87 ± 3.58 ^{a,b,c} | 133.17 ± 0.35 ^{b,c} |

^ap < 0.05 respecto a las ratas C

^bp < 0.05 respecto a las ratas T

^cp < 0.05 respecto a las ratas T + T₄ (inyección)

tiroxina ($1.5\mu\text{g}/100\text{g}$ de peso) incrementó los niveles plasmáticos de GH, que aparecían ya aumentados en las ratas operadas respecto a la población control, en mayor medida. La pauta de recuperación con pellet superó en un 72.28% el aumento registrado por la administración de la inyección (Tabla 9).

La administración de T_4 aumentó también el contenido de GH en hipófisis de las ratas tiroidectomizadas, incluso por encima de los valores control en un 30.08% para la inyección y en un 73.47% para el pellet, con lo que se encontró una diferencia significativa entre ambas pautas de recuperación (Tabla 9).

3.5.1.3. Glucemia e insulinemia.

Los niveles de glucosa circulante aumentaron respecto a los valores de los animales tiroidectomizados por la administración de tiroxina cuando se llevó a cabo el tratamiento con los pellets (Tabla 9), y mostraron una glucemia cercana a los niveles control ($133.17\text{mg}/\text{dl}$), no así con la misma dosis de T_4 inyectada ($114.93\text{mg}/\text{dl}$). Este diferente aumento en la glucemia de los animales tratados con una u otra pauta resultó ser estadísticamente significativo, lo que de nuevo llama la atención sobre la mayor eficacia del pellet en la rehabilitación de estos animales.

Las dosis de tiroxina ($1.5\mu\text{g}/100\text{g}$ de peso) administradas por vía intraperitoneal (inyección) o subcutánea (pellet) no modificaron los altos niveles circulantes de insulina encontrados para la población tiroidectomizada, con lo que las diferencias respecto a los animales control (Figura 29) se cifraron en un 114.20% para los animales a los que se les inyectó la T_4 y en un 170.96% para aquellos a los que se les administró en forma de pellet.

3.5.1.4. IGFs: niveles séricos y expresión del ARNm hepático.

3.5.1.4.1. Niveles séricos.

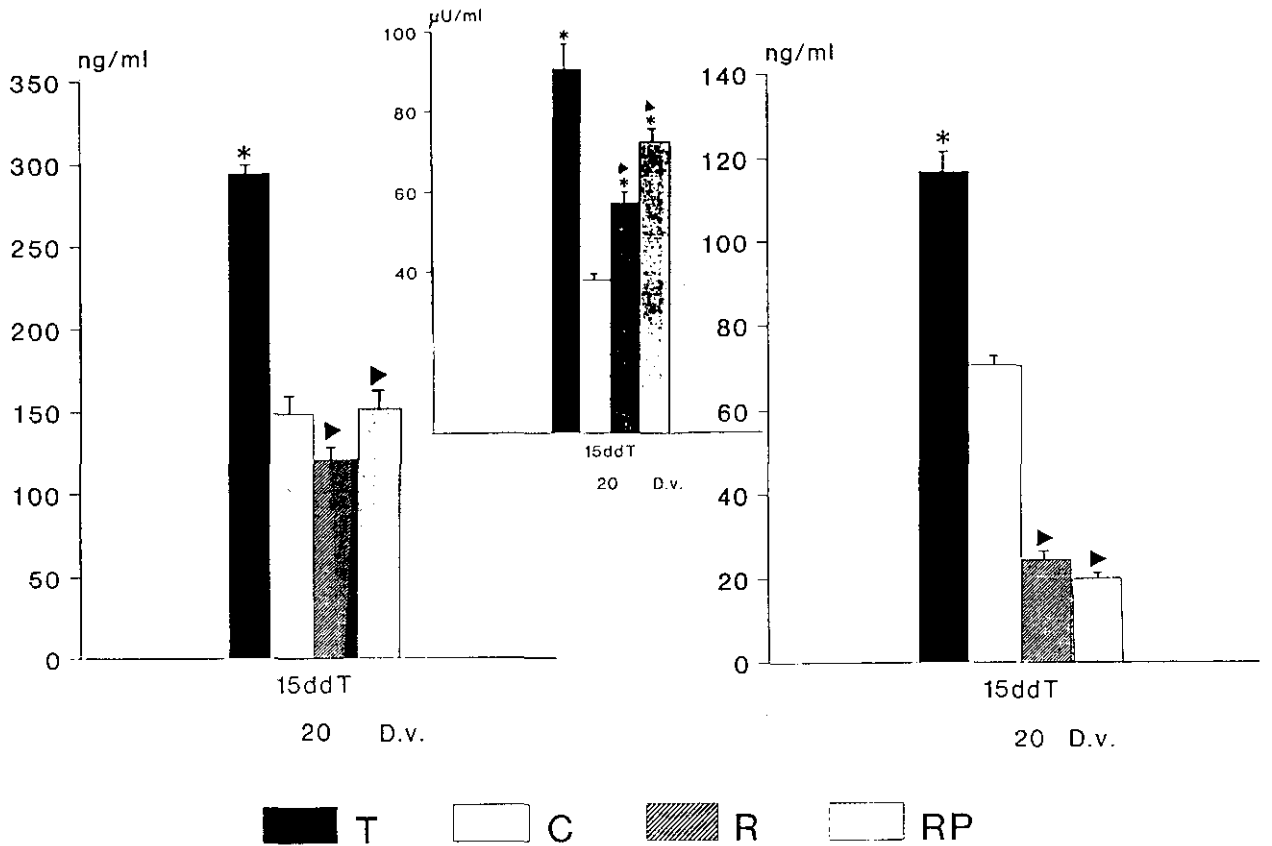
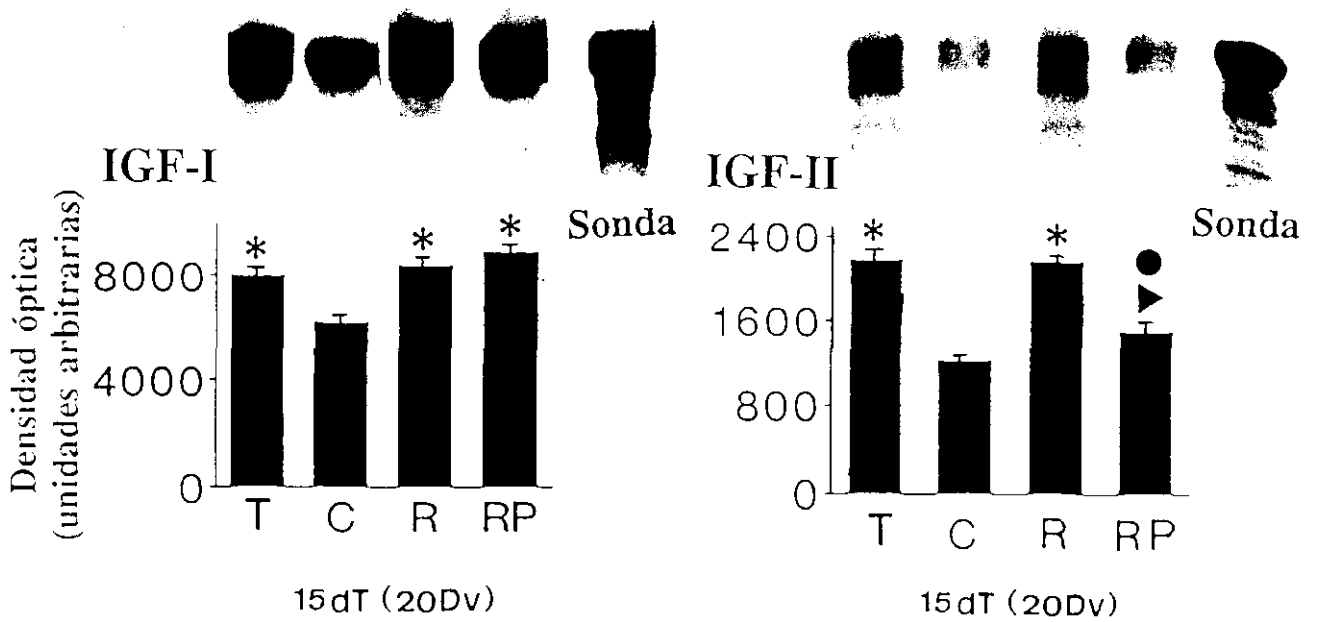
El IGF-I, que aparecía aumentado en las ratas neonatales tiroidectomizadas, disminuyó con la administración de T_4 , y así, ambas pautas ofrecieron unos niveles séricos del péptido iguales a los valores de los animales control (Figura 29). Por tanto, y contrariamente a lo que sucedía con las cifras de insulina circulante, ambos tipos de tratamiento resultaron apropiados para la rehabilitación de este parámetro.

La recuperación con T_4 de los animales hipotiroideos causó un descenso en sus aumentados niveles de IGF-II, y los situó incluso por debajo de los valores control en un 65.08% y un 71.94% para la administración de T_4 con inyección y pellet, respectivamente (Figura 29).

Fig 29 A) Niveles circulantes de IGF-I, insulina e IGF-II en ratas neonatales de 20 días de vida tiroidectomizadas (T), controles (C), tratadas con una dosis de 1.5µg/100g de peso administrada en forma de inyección (R) y tratadas con la misma dosis de T₄, pero en forma de pellet (RP). Media ± DS de 8-10 animales.

B) Expresión hepática del ARNm y cuantificación densitométrica de los IGF-I y II en ratas neonatales tiroidectomizadas (T), controles (C), tiroidectomizadas recuperadas con una inyección de 1.5µg/100g de peso de T₄ (R) y con el pellet de T₄ (RP). El análisis se llevó a cabo mediante el ensayo de protección de la RNasa en animales de 20 días de vida (15 días después de la operación). Media ± DS de 4 análisis diferentes.

* Significación estadística respecto a los animales control. ► Significación estadística respecto a las ratas tiroidectomizadas. ● Significación estadística respecto a la población de neonatos tratados con la inyección de 1.5µg/100g de peso de T₄.

A**IGF-I****INSULINA****IGF-II****B****EXPRESION DEL ARNm HEPATICO (IGFs)**

3.5.1.4.2. Expresión del ARNm hepático.

Los niveles de ARNm hepático de IGF-I fueron, al igual que en los animales tiroidectomizados, significativamente superiores tanto en los neonatos a los que se les administró la T₄ con una inyección como los del pellet, respecto a los de animales control (Figura 29). Sin embargo, la expresión hepática de IGF-II disminuyó tras el tratamiento hormonal con pellet (Figura 29), y no lo hizo con la inyección, siempre respecto a la población de ratas control; se observó así una clara diferencia entre una y otra pauta de reemplazamiento que, de nuevo, evidenció la mayor eficacia del pellet para la rehabilitación de los animales tiroidectomizados.

3.5.1.5. Estudio de regresión lineal y correlación.

Se efectuó el análisis de regresión y correlación de los niveles circulantes de IGF-I frente a los de insulina y GH (Figura 30).

Se encontró una fuerte correlación positiva entre los niveles séricos de IGF-I y los plasmáticos de insulina en estos animales tiroidectomizados tratados con T₄, no obstante, esta correlación fue mayor cuando el tratamiento se llevó a cabo mediante la implantación de pellets ($r=0.83$) frente a la inyección ($r=0.52$). Sin embargo, cuando se representaron los valores circulantes de IGF-I frente a los de GH, estas poblaciones mostraron una correlación baja ($r=0.50$ y $r=0.64$ para las ratas tratadas con T₄ vía intraperitoneal y subcutánea, respectivamente).

3.5.1.6. IGFBPs: niveles séricos y expresión del ARNm hepático.

3.5.1.6.1. Niveles séricos.

3.5.1.6.1.1. Western ligand blot.

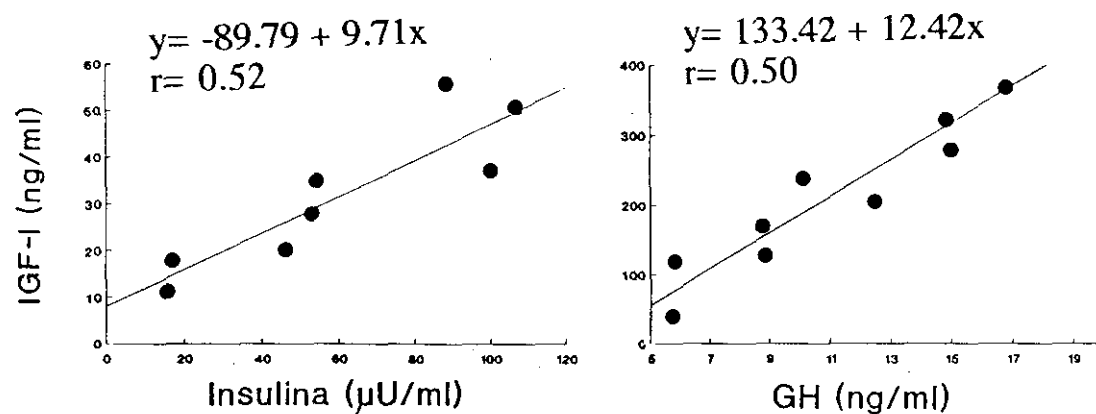
Los animales neonatales tiroidectomizados experimentaron un aumento en los niveles circulantes de las IGFBPs del complejo de 30kDa, aunque los dos tratamientos de recuperación provocaron un descenso, muy similar, en sus valores séricos (Figura 31) respecto a la población operada, esto hizo que ambos grupos de animales tratados alcanzaran unos niveles similares a los de las ratas control.

La IGFBP-3 experimentó un aumento de sus niveles en suero tras la rehabilitación de los neonatos tiroidectomizados con T₄ (Figura 31). Sin embargo, la implantación del pellet, al igual que en otras ocasiones, consiguió restaurar los niveles del péptido de 45kDa a los valores control, mientras que la administración de la inyección no consiguió un aumento en los niveles de esta proteína ligadora respecto a los animales tiroidectomizados. De nuevo, se observó una mayor eficacia en una pauta de tratamiento sustitutivo respecto a la otra.

NEONATOS

A

TIROIDECTOMIZADOS (R)



B

TIROIDECTOMIZADOS (RP)

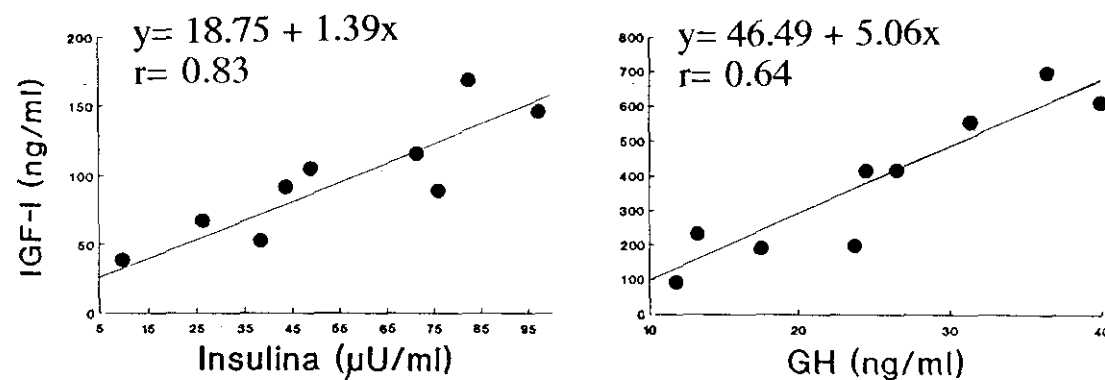
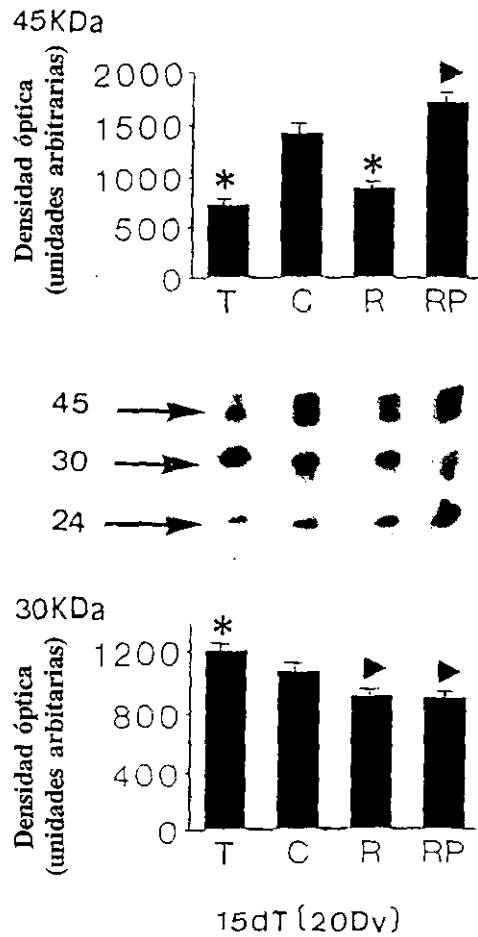


Fig 30 *Análisis de regresión lineal y coeficiente de correlación de los niveles circulantes de IGF-I e insulina y GH de las ratas operadas de 20 días (15 días después de la tiroidectomía) tratadas con diferentes dosis y vías de administración de T_4 :*
A) *Inyección de $1.5\mu\text{g}/100\text{g}$ de peso de T_4 durante 5 días.*
B) *Pellet de $1.5\mu\text{g}/100\text{g}$ de peso de T_4 durante 5 días.*

A WESTERN LIGAND BLOT



B WESTERN INMUNOBLOT

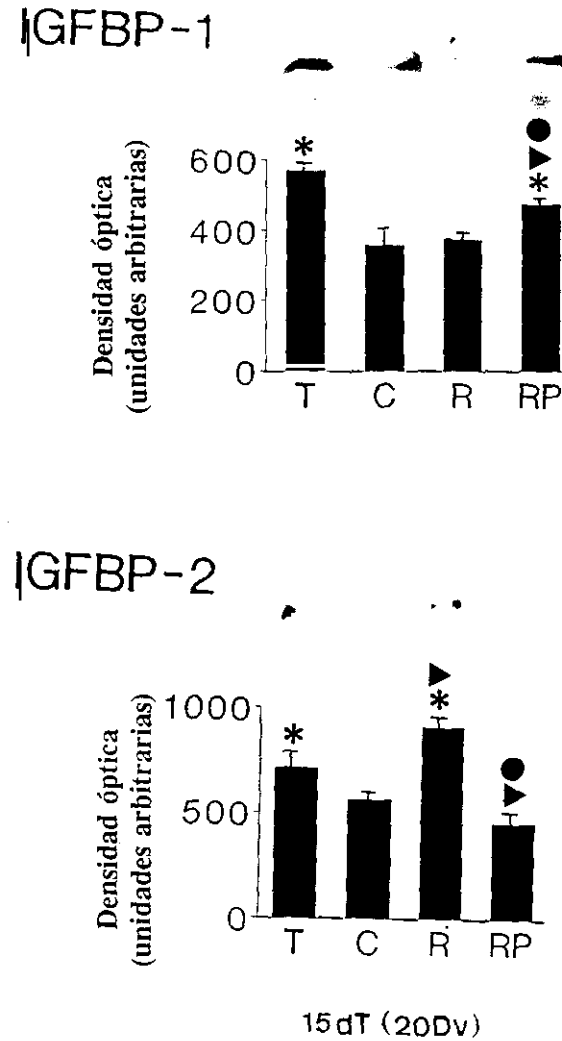


Fig 31 *Análisis de "Western ligand blot" (A) y "Western inmunoblot" (B) de los niveles de las IGFbps en ratas neonatales de 20 días de vida (15 días después de la operación) tiroidectomizadas (T), controles (C), tiroidectomizadas tratadas con inyección de 1.5µg/100g de peso de T₄ (R) y con pellet de igual dosis (RP). El análisis se efectuó con 2.5µl de suero. Media ± DS de 4 análisis diferentes.*

- * *Significación estadística respecto a la población control.*
- ▶ *Significación estadística respecto a los animales operados.*
- *Significación estadística respecto a los animales tratados con una inyección de 1.5µg/100g de peso de T₄.*

3.5.1.6.1.2. Western inmunoblot.

Los niveles séricos de IGFBP-1, que aumentaron después de la tiroidectomía, disminuyeron al tratar a estos animales operados con una dosis de $1.5\mu\text{g}/100\text{g}$ de peso de T_4 (Figura 31). La administración intraperitoneal de la hormona igualó los niveles de esta proteína de bajo peso molecular a los valores control, mientras que el tratamiento con pellet situó las cifras circulantes de IGFBP-1 en unos valores intermedios y distintos a los mostrados por las poblaciones tiroidectomizada y control. Se encontró una diferencia entre los dos tipos de tratamiento, aunque en cualquier caso, con ambas pautas de administración se encontró una disminución respecto a los niveles alcanzados después de la tiroidectomía.

El tratamiento con T_4 mediante la inyección intraperitoneal produjo un aumento aún mayor de los niveles séricos de IGFBP-2 (Figura 31). La implantación de pellets, por el contrario, disminuyó los altos valores circulantes de esta proteína, con lo que se alcanzaron unas cifras similares a las mostradas por los animales control; de nuevo, se puso de manifiesto una diferencia entre los dos tipos de tratamiento.

3.5.1.6.2. Expresión del ARNm hepático.

Los niveles de ARNm hepático de IGFBP-1 disminuyeron al tratar a los animales neonatales tiroidectomizados con T_4 (Figura 32). La inyección de la hormona provocó un gran descenso en la expresión de esta proteína de bajo peso molecular, y resultó ser más acusado que el producido por la implantación de pellet, que mostró unos niveles de ARNm similares a los de la población control; se encontró así una diferencia estadísticamente significativa entre los niveles de expresión de IGFBP-1 de las ratas tratadas con inyección y las control, y entre las dos pautas de reemplazamiento.

La IGFBP-2 mostró una menor expresión hepática después de tratar a los animales tiroidectomizados con el pellet (Figura 32). Por el contrario, la inyección de T_4 no sólo no provocó un descenso en los niveles de ARNm de esta proteína, sino que los aumentó, y los valores alcanzados fueron muy superiores a los de los neonatos control e, incluso, a los de los tiroidectomizados que los presentaban ya aumentados. El análisis estadístico mostró así una diferencia significativa entre los dos tipos de tratamiento. Este anómalo incremento en la expresión en hígado de la IGFBP-2 asociado a la administración intraperitoneal de la T_4 será estudiado oportunamente.

Fig 32 *Análisis mediante ensayo de protección de la RNasa de los transcritos hepáticos de IGFBP-1, 2 y 3 de ratas en periodo:*

Neonatal (20 días): tiroidectomizadas (T), controles (C), tiroidectomizadas tratadas con una inyección de 1.5 μ g/100g de peso (R) y con pellet de igual dosis (RP).

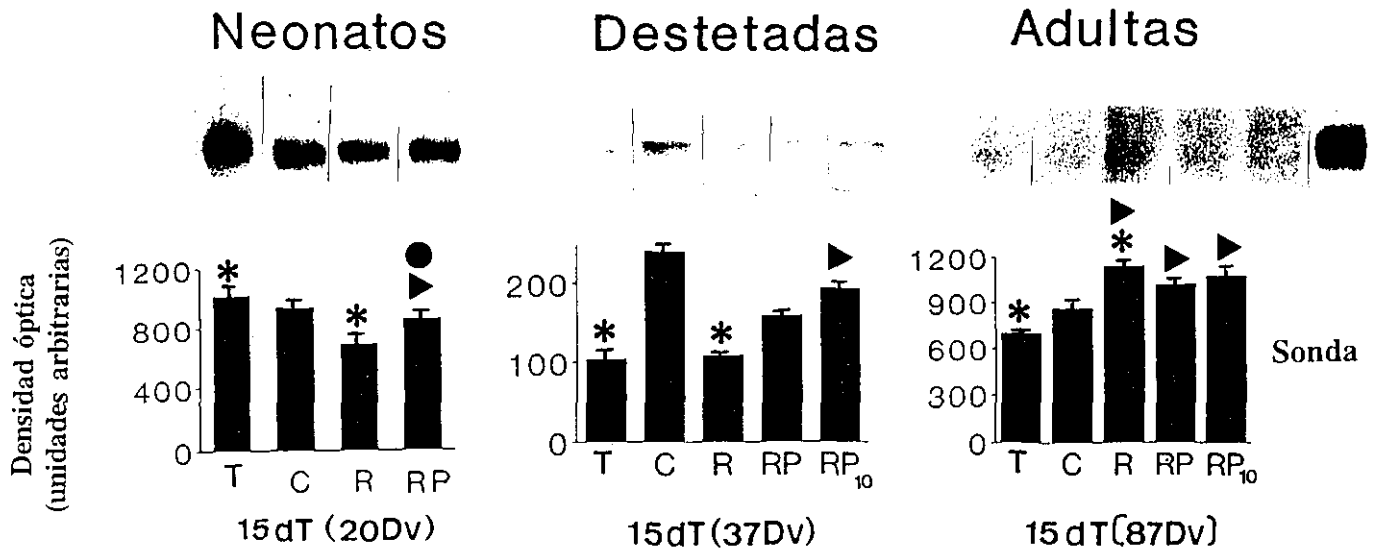
Destetado (37 días) y adulto (87 días): tiroidectomizadas (T), controles (C), tiroidectomizadas con una inyección de 1.75 μ g/100g de peso de T₄ durante 5 días (R), tiroidectomizadas rehabilitadas con pellet de igual dosis durante 5 días (RP₅), tiroidectomizadas recuperadas con pellet de la misma dosificación durante 10 días (RP₁₀).

**Significación estadística respecto a la población control. ► Significación estadística respecto a los animales tiroidectomizados. ● Significación estadística respecto a las ratas rehabilitadas con la inyección de T₄.*

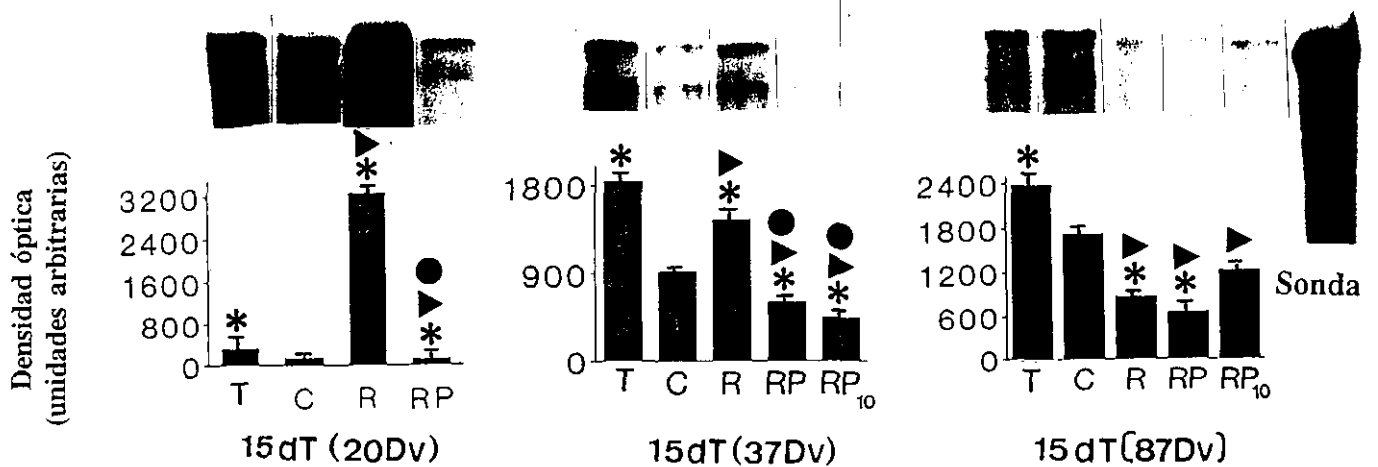
Se muestra el análisis densitométrico. Media \pm DS de 4 análisis diferentes.

EXPRESION DEL ARNm HEPATICO (IGFBPs)

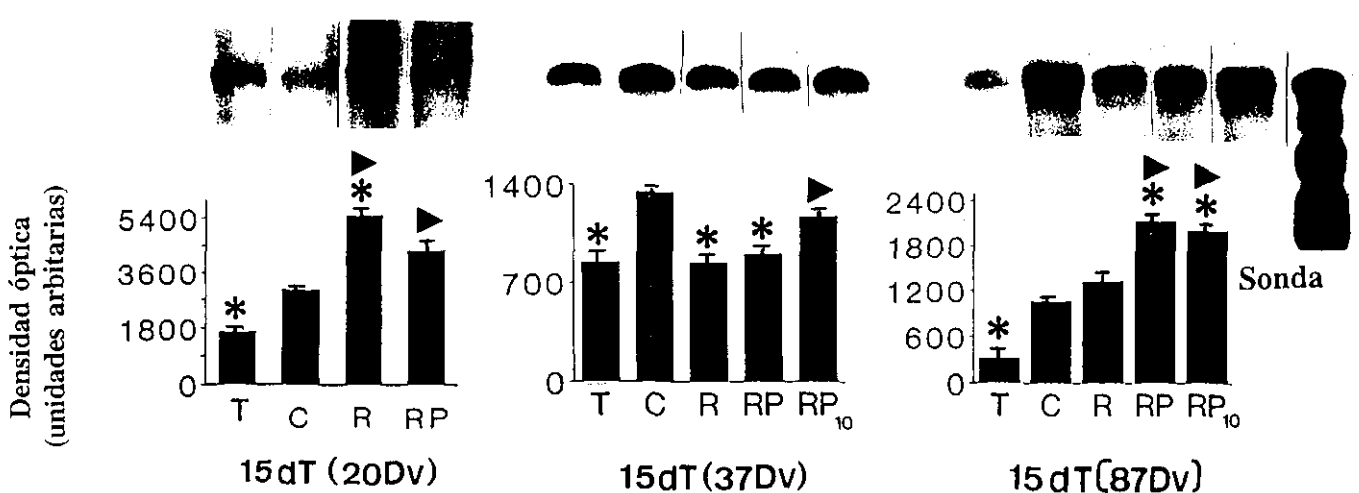
IGFBP-1



IGFBP-2



IGFBP-3



La expresión en hígado de la IGFBP-3 aumentó después de recuperar a las ratas tiroidectomizadas con tiroxina, incluso superó a los valores control cuando se administró la hormona como inyección (Figura 32). A pesar de que no se encontró ninguna diferencia estadística entre las dos pautas de reemplazamiento, los niveles de ARNm de esta proteína de alto peso molecular se aproximaron más a los valores control cuando se llevó a cabo el tratamiento mediante la implantación de pellets.

A la vista de estos resultados, se podría decir que la administración de T_4 a ratas neonatales restaura las alteraciones producidas por la tiroidectomía.

3.5.1.7. Resumen de los resultados del estudio del tratamiento con T_4 en ratas neonatales tiroidectomizadas.

Los valores circulantes de IGF-I y II después de la administración de $1.5\mu\text{g}/100\text{g}$ de peso, tanto por vía intraperitoneal como con pellet, descienden al nivel de los controles e igualmente la expresión de su ARN para IGF-II no para IGF-I. Los valores circulantes de insulina también disminuyen, quedando aún por encima de controles. También desciende a nivel de controles el complejo de 30kDa circulante; por inmunoblot se muestra en los animales tratados con pellet, que esta disminución es mayor en la IGFBP-2 cosa que no se manifiesta con la inyección de $1.5\mu\text{g}/100\text{g}$ de peso.

La IGFBP-3 circulante no se altera con la inyección y remonta a valores control con el pellet de T_4 . La expresión de ARNm de las IGFbps de 30kDa muestra, igual que lo hizo el inmunoblot, que es mayor el descenso en IGFBP-2 después de la implantación del pellet. También aumenta, alcanzando los valores control, el ARNm de IGFBP-3; por tanto después de la implantación del pellet se muestra una recuperación paralela de los valores circulantes y la expresión hepática del ARNm en las tres IGFbps estudiadas, cosa que no sucede con las mismas dosis de T_4 por inyección. Todo ello manifiesta la no conveniencia de esta vía para rehabilitación como ya se ve también en los cambios de los parámetros de la Tabla 9 después de la inyección de T_4 .

En los animales tratados con pellet, la GH plasmática e hipofisaria aumentaron respecto a las ratas controles y tiroidectomizadas, y la glucemia alcanza los valores control, los mismos cambios se producen en los animales inyectados con T_4 pero menos acusados.

Se estableció una correlación positiva entre los niveles circulantes de insulina e IGF-I que es mayor con pellet.

Cuadro 3.- Resumen de los resultados de los estudios de la administración de T_4 en dosis de $1.5 \mu\text{g}/100\text{g}$ de peso por vía ip ($T + T_4$)_{ip} o vía sc (pellet) ($T + T_4$)_{sc} en ratas neonatales respecto a la población de los animales control (20 días de vida).

| | ($T + T_4$) _{ip} | ($T + T_4$) _{sc} |
|--------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| GLUCEMIA | ↓ | = |
| INSULINEMIA | ↑ | ↑ |
| GH CIRCULANTE | ↑ | ↑ |
| GH HIPOFISARIA | ↑ | ↑ |
| IGF-I CIRCULANTE | = | = |
| ARNm IGF-I | ↑ | ↑ |
| IGF-II CIRCULANTE | = | = |
| ARNm IGF-II | ↑ | = |
| IGFBP-1 CIRCULANTE | = | ↑ |
| ARNm IGFBP-1 | ↓ | = |
| IGFBP-2 CIRCULANTE | ↑ | = |
| ARNm IGFBP-2 | ↑ | ↓ |
| IGFBP-3 CIRCULANTE | ↓ | = |
| ARNm IGFBP-3 | ↑ | = |

3.5.2. Tratamiento con T_4 de las ratas destetadas y adultas tiroidectomizadas. Comparación de dosis inyectadas y pellets.

Al igual que en los estudios realizados sobre la población neonatal, en las ratas destetadas y adultas también se llevó a cabo la rehabilitación de estos animales tiroidectomizados mediante la administración ip (inyección) y sc (pellet) de la tiroxina, para de nuevo establecer una comparación entre las dos vías empleadas, pero ahora en estadios más maduros del desarrollo. La recuperación con pellet se realizó durante 5 ó 10 días.

3.5.2.1. Evolución del peso corporal.

Las ratas tiroidectomizadas presentaron, como ya se ha visto, un peso corporal inferior al de las ratas control, sin embargo, la rehabilitación con T_4 aumentó el peso del animal operado. Este incremento fue significativo respecto a la población tiroidectomizada cuando el tratamiento hormonal se realizó con el pellet, puesto que la administración diaria de la inyección no modificó el peso de los animales tratados con T_4 respecto al de los operados, tanto en la etapa destetada como en la adulta (Tabla 10). Cuando la recuperación se prolongó durante 5 días más, el valor del peso se igualó al de las ratas control, por tanto se ve un aumento progresivo del peso

Tabla 10.- Peso corporal, niveles circulantes de glucosa, insulina, GH y contenido hipofisario de GH de ratas destetadas y adultas tiroidectomizadas (T), tratadas con una dosis de 1.75 μ g/100g de peso de T₄ por vía ip o sc (pellet) (T + T₄) y controles a los 15 días después de la tiroidectomía (37 y 87 días de vida). Media de 8-10 animales \pm DS.

| | Peso corporal (g) | GH plasmática (ng/ml) | GH hipofisaria (ng/mg) | Glucemia (mg/100ml) | Insulinemia (μ U/ml) |
|-------------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| DESTETADAS | | | | | |
| T | 72.55 \pm 2.40 ^a | 37.13 \pm 1.63 ^a | 6.18 \pm 0.39 ^a | 127.30 \pm 4.90 | 15.60 \pm 2.77 ^a |
| Controles | 118.17 \pm 2.21 | 66.61 \pm 2.84 | 31.18 \pm 2.68 | 131.72 \pm 1.17 | 55.12 \pm 4.64 |
| T + T ₄ (inyección) | 77.67 \pm 1.41 ^a | 73.70 \pm 3.13 ^b | 14.18 \pm 0.51 ^a | 139.11 \pm 1.95 ^b | 41.30 \pm 2.72 ^a |
| T + T ₄ (pellet 5 días) | 93.60 \pm 2.96 ^{a,b,c} | 99.14 \pm 1.78 ^{a,b,c} | 18.80 \pm 0.53 ^{a,b} | 139.43 \pm 6.48 ^b | 41.56 \pm 14.69 ^b |
| T + T ₄ (pellet 10 días) | 109.63 \pm 2.99 ^{b,c} | 102.31 \pm 3.38 ^{a,b,c} | 20.94 \pm 1.01 ^{a,b} | 128.49 \pm 5.45 ^{c,d} | 67.70 \pm 22.01 ^{b,c} |
| ADULTAS | | | | | |
| T | 166.21 \pm 3.59 ^a | 14.35 \pm 1.32 ^a | 10.77 \pm 0.72 ^a | 130.63 \pm 1.71 | 48.72 \pm 2.62 ^a |
| Controles | 193.70 \pm 4.92 | 96.93 \pm 4.46 | 33.12 \pm 1.16 | 133.05 \pm 1.90 | 66.95 \pm 7.55 |
| T + T ₄ (inyección) | 171.95 \pm 4.05 ^a | 59.67 \pm 5.73 ^{a,b} | 13.49 \pm 0.93 ^a | 140.21 \pm 4.77 ^b | 50.61 \pm 2.59 ^a |
| T + T ₄ (pellet 5 días) | 188.78 \pm 5.48 ^{b,c} | 60.77 \pm 3.46 ^{a,b} | 26.32 \pm 2.64 ^{a,b,c} | 141.45 \pm 3.26 ^b | 55.02 \pm 5.80 ^b |
| T + T ₄ (pellet 10 días) | 189.63 \pm 4.38 ^{b,c} | 70.61 \pm 6.11 ^{a,b} | 33.89 \pm 2.58 ^{b,c,d} | 133.15 \pm 3.01 | 64.43 \pm 4.29 ^{b,c} |

^ap < 0.05 respecto a las ratas C

^bp < 0.05 respecto a las ratas T

^cp < 0.05 respecto a las ratas T + T₄ (inyección)

^dp < 0.05 respecto a las ratas T + T₄ (pellet 5 días)

cuando se rehabilitan con pellet.

3.5.2.2. Niveles séricos de T_3 y T_4 y plasmáticos e hipofisarios de GH.

Los niveles de hormonas tiroideas disminuyeron después de la operación, aunque el tratamiento sustitutivo con T_4 produjo un incremento significativo en las cifras circulantes de estas hormonas en todos los casos estudiados respecto a los animales operados (Figura 33). Este aumento, al igual que sucedía con el peso corporal, fue menor para aquellas ratas a las que se les inyectó la hormona respecto a las que se les implantó el pellet, tanto a los 5 como a los 10 días de tratamiento. El incremento encontrado, que superó incluso los valores de los animales control, en las ratas destetadas tratadas con pellet durante 5 días, fue de un 131.05% para la T_3 y de un 70.00% para la T_4 , mientras que para las adultas este resultó ser más modesto (5.20% para la T_3 y 28.71% para la T_4) e igualó los niveles de las hormonas tiroideas a los de la población control. Estos datos contrastaron con los obtenidos para aquellos animales destetados y adultos inyectados con T_4 diariamente, dado que el incremento fue menor, y en ningún caso superaron los valores control (59.69% para T_3 y 76.02% para T_4 en las ratas destetadas y 72.42% para T_3 y 62.74% para T_4 en las adultas); así pues, parece que en cuanto a la recuperación de las hormonas tiroideas en ratas destetadas, el tratamiento idóneo es el pellet durante 10 días.

En los animales adultos, el tratamiento con pellets de T_4 mantuvo los niveles de hormonas tiroideas igual a los controles tanto a los 5 como a los 10 días después del inicio de la administración hormonal por pellet (Figura 33). Sin embargo, y dado que la dosis fue la misma para los animales adultos y destetados, estos últimos mostraron unos niveles de hormonas tiroideas superiores a los de la población control a 5 días, probablemente debido al menor peso de las ratas más jóvenes. Por tanto, cabe destacar que para los animales adultos, en cuanto a las hormonas tiroideas las dosis de $1.75\mu\text{g}/100\text{g}$ de peso de T_4 es la idónea tanto con 5 como con 10 días de tratamiento.

La GH circulante aumentó al tratar con T_4 a los animales tiroidectomizados respecto a los operados en ambas poblaciones, superando los valores control en destetadas y no llegando a ellos en adultos; igualmente aumentó la GH hipofisaria, no llegando a valores control más que en las adultas de 10 días de tratamiento con pellet (Tabla 10). Al igual que sucedía para el peso corporal y las hormonas tiroideas, la rehabilitación con pellet durante 10 días ofreció los niveles más cercanos a los control.

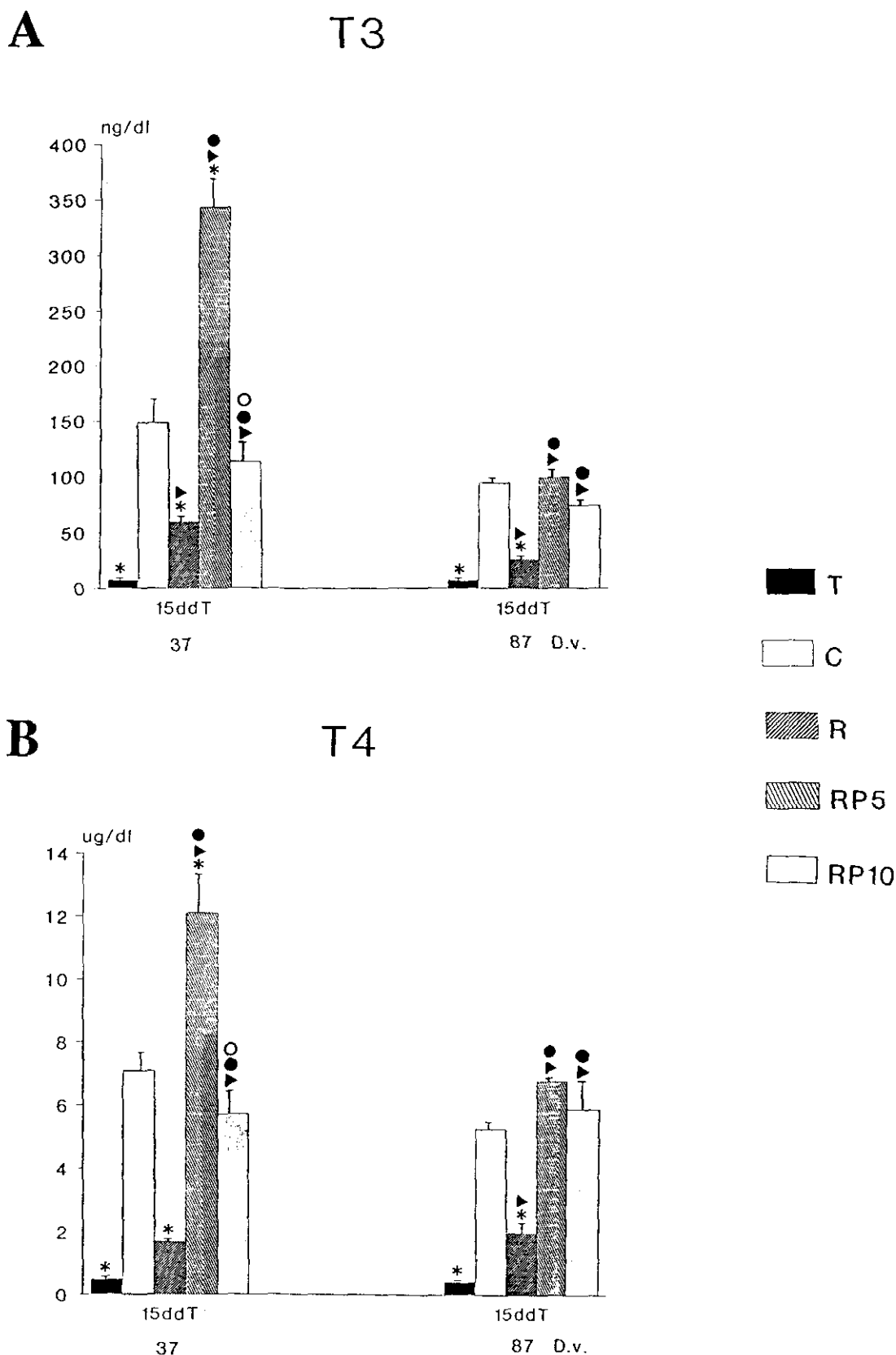


Fig 33 Niveles de T_3 (A) y T_4 (B) en suero de ratas destetadas (37 días) y adultas (87 días de vida) tiroidectomizadas (T), controles (C), tiroidectomizadas rehabilitadas con inyección de $1.75\mu\text{g}/100\text{g}$ de peso de T_4 durante 5 días (R), con pellet de la misma dosis de T_4 durante 5 días (RP_5) y 10 días (RP_{10}). Media \pm DS de 8 animales. * Significación estadística respecto a la población control. > Significación estadística respecto a las ratas operadas. ● Significación estadística respecto a los animales recuperados con la inyección de $1.75\mu\text{g}/100\text{g}$ de peso de T_4 durante 5 días. ○ Significación estadística respecto a las ratas rehabilitadas con pellet de T_4 y una dosis de $1.75\mu\text{g}/100\text{g}$ de peso durante 5 días.

La rehabilitación con pellet a lo largo de 5 días pareció ser más efectiva que la inyección, que no modificó el contenido en GH de este tejido respecto a las poblaciones tiroidectomizadas destetada y adulta. A la vista de los resultados se debe destacar que la respuesta al tratamiento difirió según la edad del animal; las ratas destetadas rehabilitadas con pellet presentaron unos niveles de GH en plasma superiores a los de los animales control, pero su contenido hipofisario fue inferior al de dichos controles, sin embargo, las ratas adultas a las que se les implantó el pellet o se les inyectó la hormona, mostraron unos valores de GH en plasma e hipófisis inferiores o iguales respecto a las ratas control; estas diferencias pueden ser debidas a la distinta madurez del axis de la GH, dado que en las ratas destetadas pueden no haberse establecido las conexiones neuroendocrinas completamente.

3.5.2.3. Glucemia e insulinemia.

Los niveles plasmáticos de insulina aumentaron al administrar T_4 a las ratas tiroidectomizadas (Tabla 10) por ambas vías en destetadas y adultas, pero alcanzaron valores control sólo con el implante de pellets a 5 o a 10 días en ambas poblaciones destetadas y adultas. A pesar de todo, y al igual que en casos anteriores, los valores que fueron similares y más cercanos a los niveles control resultaron ser los de aquellas ratas tratadas con pellet y cuyo tratamiento se prolongó durante 10 días (22.82 y 3.76% para las ratas destetadas y adultas, respectivamente).

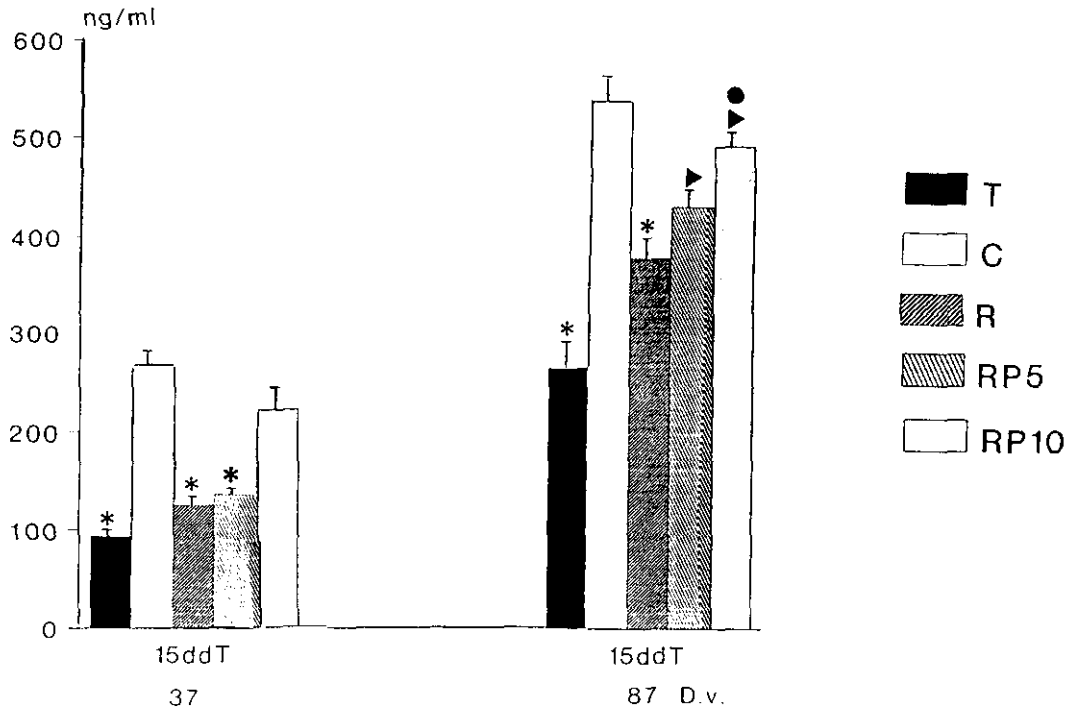
El tratamiento con tiroxina aumentó los niveles sanguíneos de glucosa de los animales tiroidectomizados (Tabla 10), y se observó de nuevo, un mayor acercamiento a los valores control en aquellas ratas tratadas con T_4 durante 10 días.

3.5.2.4. IGFs: niveles séricos y expresión del ARNm hepático.

La recuperación de los animales tiroidectomizados con T_4 produjo un aumento en los niveles circulantes de IGF-I (Figura 34). Este incremento en los valores del péptido fue mayor al tratar con pellets durante 10 días a ambas poblaciones destetadas y adultas. El tratamiento con pellets durante 5 días se mostró más efectivo en la restauración de los niveles de IGF-I que la inyección de T_4 (Figura 34).

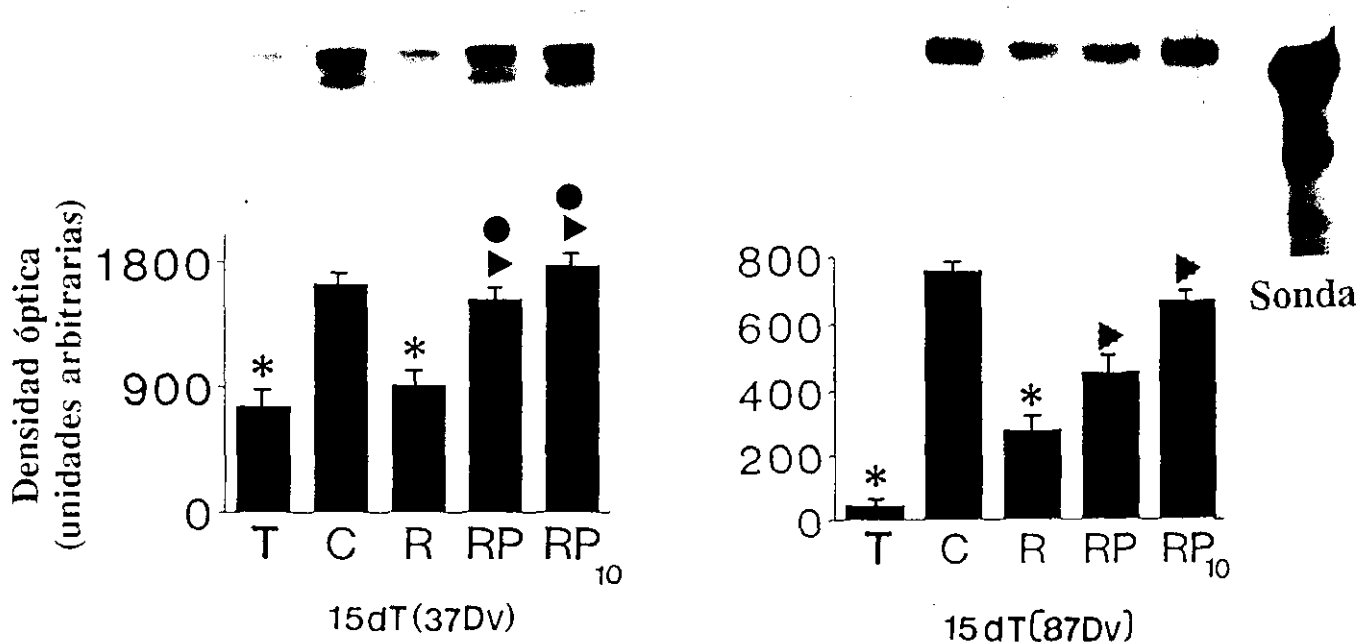
En los animales destetados tan solo el tratamiento con pellet durante 10 días rehabilitó los niveles de IGF-I a los controles, cosa que se logró a los 5 días en los adultos. Sin embargo, el tratamiento con pellet ya a los 5 días rehabilitó a niveles control el ARNm hepático de IGF-I en las poblaciones destetada y adulta, aunque las inyecciones de igual dosis no tuvieron efecto (Figura 34).

Se observó pues un gran paralelismo entre los niveles séricos de IGF-I y los

A**IGF-I****B****EXPRESION DEL ARNm HEPATICO (IGF-I)**

Destetadas

Adultas

**Fig 34**

Niveles séricos (A) y expresión hepática del ARNm (B) de IGF-I en ratas destetadas (37 días) y adultas (87 días) tiroidectomizadas (T), controles (C), tiroidectomizadas tratadas con una inyección de $1.75\mu\text{g}/100\text{g}$ de peso de T_4 durante 5 días (R), operadas recuperadas con pellet y una dosis de $1.75\mu\text{g}/100\text{g}$ de peso durante 5 días (RP_5) y tiroidectomizadas tratadas con un pellet y la misma dosis de T_4 durante 10 días (RP_{10}).

A) Media \pm DS de 8 animales.

B) Ensayo de protección de ribonucleasas y cuantificación densitométrica.

* Significación estadística respecto a la población control. \blacktriangleright Significación estadística respecto a los animales tiroidectomizados. \bullet Significación estadística respecto a las ratas tiroidectomizadas tratadas con una inyección diaria de $1.75\mu\text{g}/100\text{g}$ de peso de T_4 durante 5 días.

de su expresión en hígado, lo que nos lleva una vez más a sugerir que las hormonas tiroideas parecen actuar sobre el IGF-I a nivel transcripcional. Así mismo, se encontró una recuperación más inmediata de la expresión del ARNm hepático de IGF-I respecto a sus niveles séricos, ya que tanto a los 5 como a los 10 días después del inicio del tratamiento con el pellet, las poblaciones destetada y adulta igualaron sus niveles de ARNm a los valores control.

3.5.2.5. Estudio de regresión lineal y correlación.

Las Figuras 35 y 36 resumen los resultados del análisis de regresión de los niveles séricos de IGF-I frente a los plasmáticos de insulina o GH.

Las ratas destetadas y adultas presentaron una alta correlación entre los valores circulantes de GH e IGF-I, tanto en las tratadas con inyección de T_4 ($r=0.78$, para las detetadas y $r=0.97$, $p<0.05$, para las adultas) como en aquellos animales a los que se les trató con el pellet durante 5 días ($r=0.99$, $p<0.05$, para los destetados y $r=0.97$, $p<0.05$, para los adultos) como 10 días ($r=0.83$ para los más jóvenes, y $r=0.99$, $p<0.01$, para los adultos). Por el contrario, la correlación encontrada entre la insulinemia y los niveles séricos de IGF-I en las ratas destetadas tiroidectomizadas y tratadas con T_4 fue muy baja, e incluso negativa ($r=0.048$, $r=-0.60$ y $r=-0.85$, para la administración de la hormona como inyección, pellet durante 5 días y pellet durante 10 días, respectivamente), e igual ocurrió en el caso de los animales adultos ($r=-0.62$, $r=-0.21$ y $r=-0.28$, para el tratamiento intraperitoneal de T_4 y subcutáneo de 5 y 10 días de duración, respectivamente) (Figuras 35 y 36).

3.5.2.6. IGFBPs: niveles séricos y expresión del ARNm hepático.

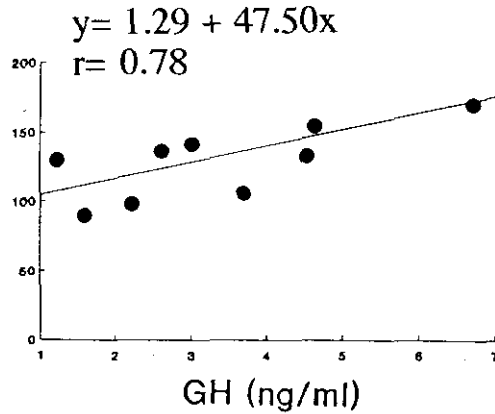
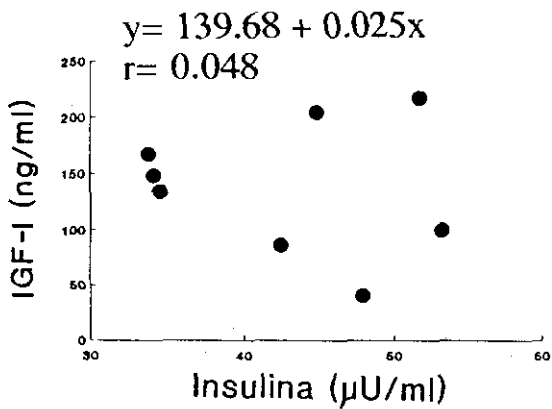
3.5.2.6.1. Niveles séricos.

3.5.2.6.1.1. Western ligand blot.

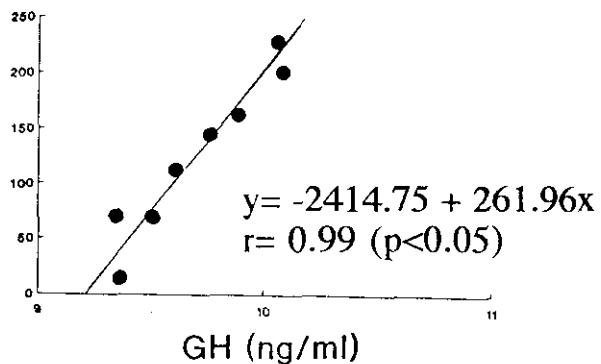
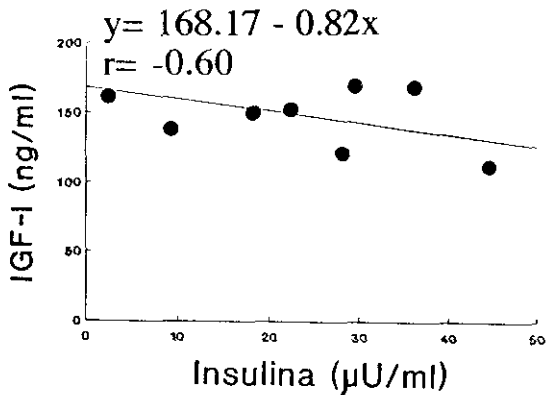
El hipotiroidismo, como se ha visto en la primera parte, provocó un descenso en los niveles circulantes de las proteínas ligadoras de alto y bajo peso molecular, sin embargo, la recuperación de los animales tiroidectomizados mediante la administración de T_4 aumentó los valores séricos de las IGFBPs de 30 y 45kDa (Figura 37). Este incremento fue superior y supuso una rehabilitación completa de los animales destetados y adultos tratados con el pellet durante 10 días, en cuanto a los niveles de las IGFBPs de alto y bajo peso molecular. La administración de tiroxina mediante la inyección de la hormona o por el implante del pellet durante 5 días no restauró los niveles de la proteína de 45kDa (IGFBP-3) en la población

DESTETADAS

TIROIDECTOMIZADAS (R)



TIROIDECTOMIZADAS (RP)



TIROIDECTOMIZADAS (RP)

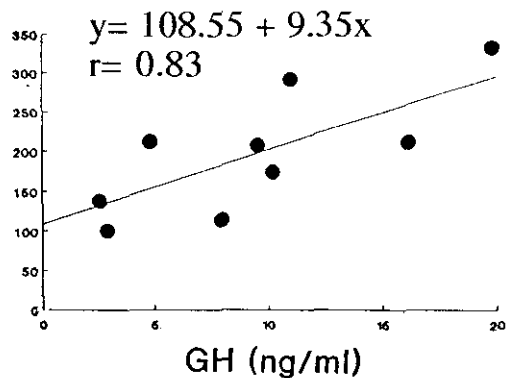
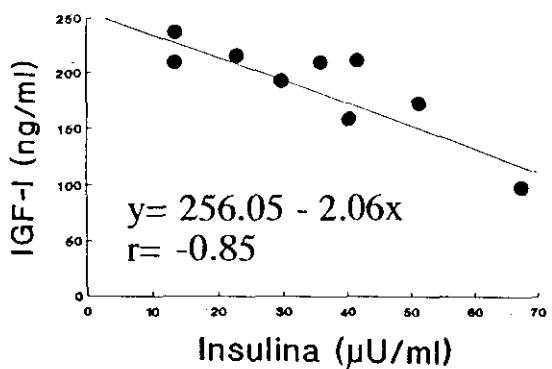
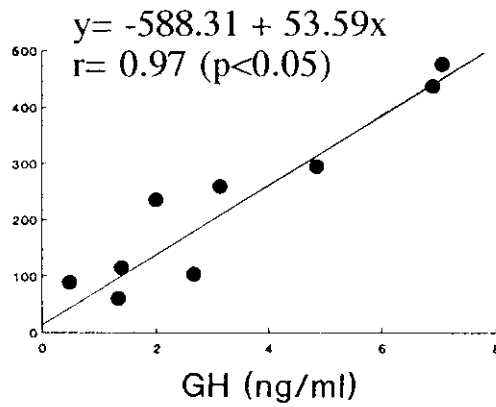
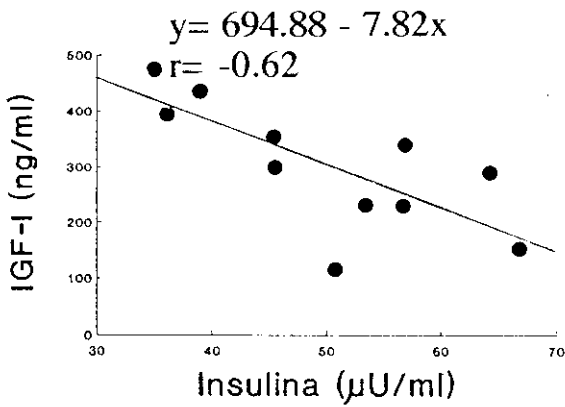


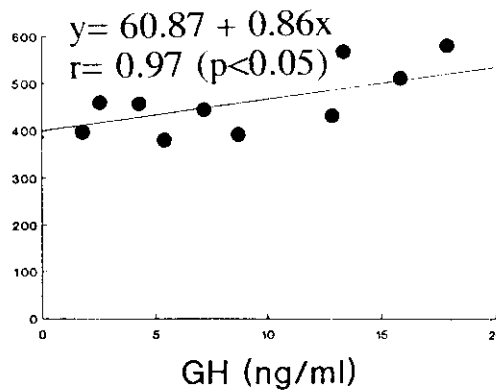
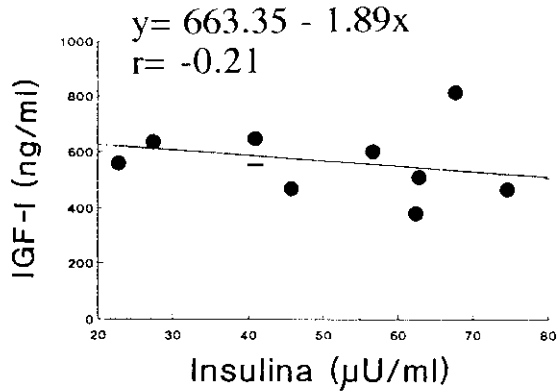
Fig 35 Análisis de regresión lineal y coeficiente de correlación de los niveles de IGF-I en suero y las concentraciones plasmáticas de insulina y GH en ratas destetadas (37 días) tiroidectomizadas tratadas con $1.75\mu\text{g}/100\text{g}$ de peso de T_4 en forma de inyección durante 5 días (R), con pellet de la misma dosis a lo largo de 5 días (RP_5) y con pellet durante 10 días (RP_{10}). Se muestran las diferencias estadísticas.

ADULTAS

TIROIDECTOMIZADAS (R)



TIROIDECTOMIZADAS (RP)



TIROIDECTOMIZADAS (RP)

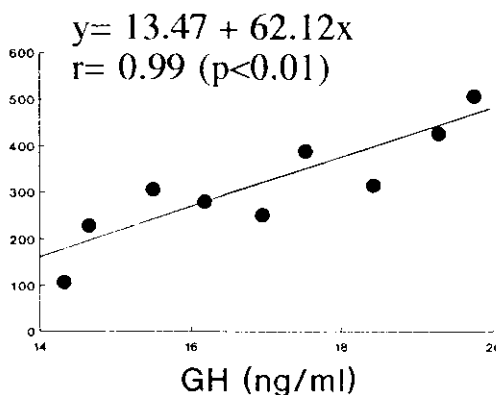
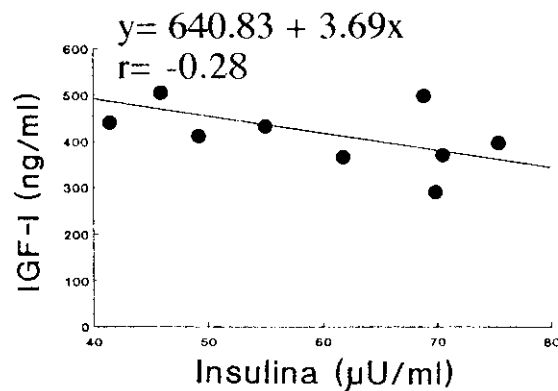


Fig 36 Análisis de regresión lineal y coeficiente de correlación de los niveles circulantes de IGF-I e insulina y GH en ratas adultas (87 días) tiroidectomizadas recuperadas con dosis de $1.75\mu\text{g}/100\text{g}$ de peso en forma de inyección durante 5 días (R) y con pellets de la misma dosis durante 5 días (RP_5) y 10 días (RP_{10}). Se muestran las diferencias estadísticas.

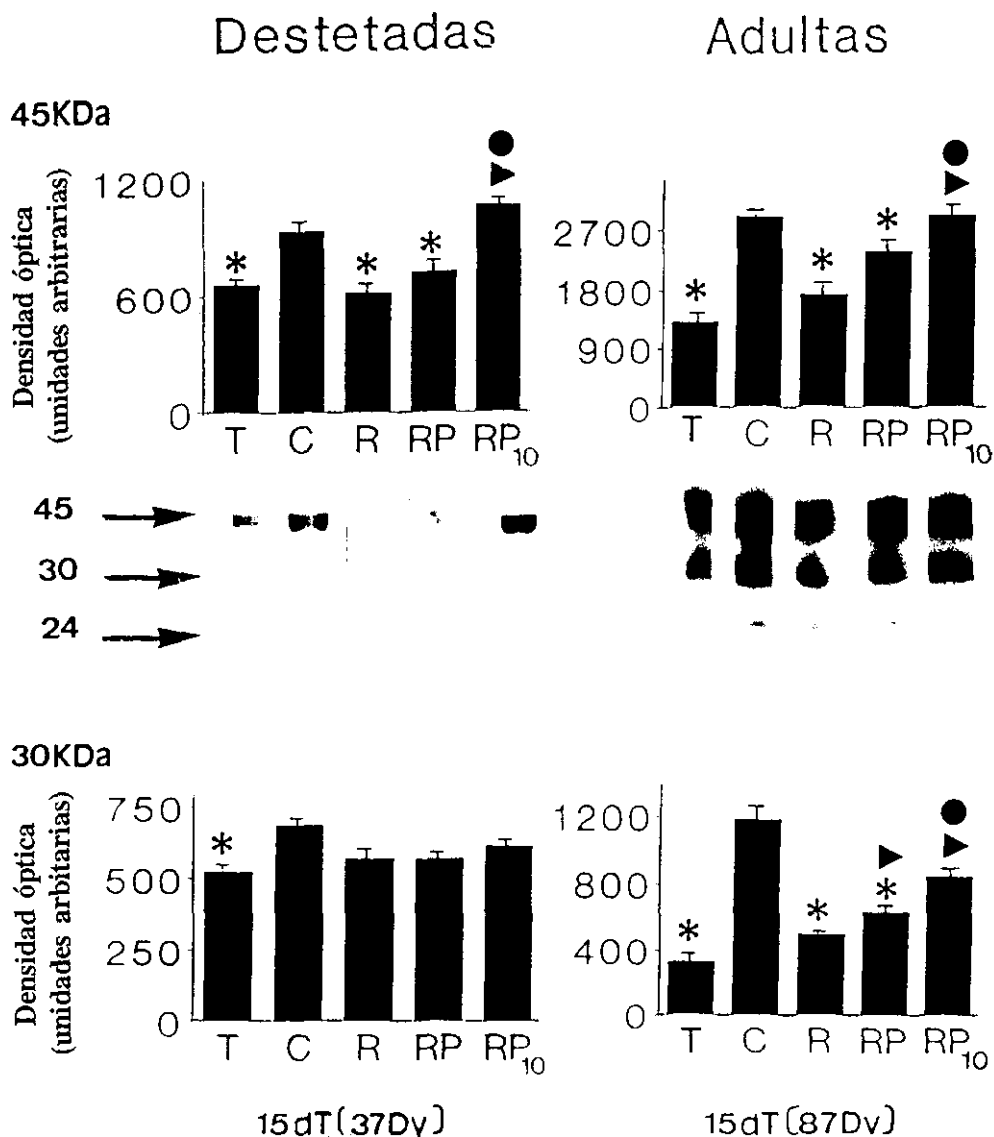
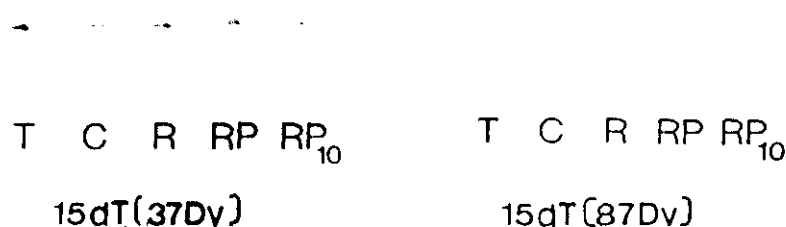
A**WESTERN LIGAND BLOT****B****WESTERN INMUNOBLOT**

Fig 37 A) Análisis mediante "Western ligand blot" de los niveles de las IGFbps en ratas destetadas (37 días) y adultas (87 días) tiroidectomizadas (T), controles (C) tiroidectomizadas tratadas con $1.75\mu\text{g}/100\text{g}$ de peso de T_4 ip (R) y sc durante 5 días: (RP_5) y 10 días (RP_{10}). Se analizaron $2.5\mu\text{l}$ de suero. Se muestra la cuantificación densitométrica de las concentraciones de las IGFbps de las mismas poblaciones. Media \pm DS de 4 análisis diferentes. * Significación estadística respecto a las ratas control. \blacktriangleright Significación estadística respecto a los animales operados. \bullet Significación estadística respecto a la población recuperada con una inyección diaria de $1.75\mu\text{g}/100\text{g}$ de peso de T_4 durante 5 días.

B) Contenido de IGFBP-2 del suero de ratas destetadas y adultas (37 y 87 días, respectivamente) perteneciente a las poblaciones de animales anteriores (T, C, R, RP_5 y RP_{10}). El análisis se efectuó mediante "Western inmunoblot".

destetada ni en la adulta. En estas condiciones, tampoco se recuperaron los valores del complejo de 30kDa (IGFBP-1 y 2) en las ratas adultas, aunque este sí se rehabilitó con los tres tratamientos hormonales en la población destetada.

3.5.2.6.1.2. Western inmunoblot.

La administración de T_4 a los animales destetados y adultos tiroidectomizados provocó un descenso en los niveles séricos de IGFBP-2 (Figura 37). Esta disminución en la intensidad de las bandas pareció ser mayor en el tratamiento de 5 días de duración frente al de 10, que se aproximó más a los valores control. Así pues, y por comparación de estos resultados con los obtenidos mediante el "Western ligand blot", se podría sugerir que el descenso en la intensidad de las bandas de 30kDa registrado mediante el "Western inmunoblot" se debió a la disminución de la IGFBP-2 circulante, puesto que el "Western ligand blot" mostró un aumento en la cantidad de complejo de proteínas de bajo peso molecular (IGFBP-1 y 2).

3.5.2.6.2. Expresión del ARNm hepático.

La expresión hepática de IGFBP-1 disminuyó en las ratas destetadas y adultas tiroidectomizadas respecto a sus controles, sin embargo, la administración de T_4 a los animales operados provocó una restauración en los niveles de su ARNm (Figura 38); esta rehabilitación se produjo ya con la inyección en las ratas adultas y no en las destetadas. La rehabilitación fue igual a los controles con 10 días de tratamiento en ambas poblaciones.

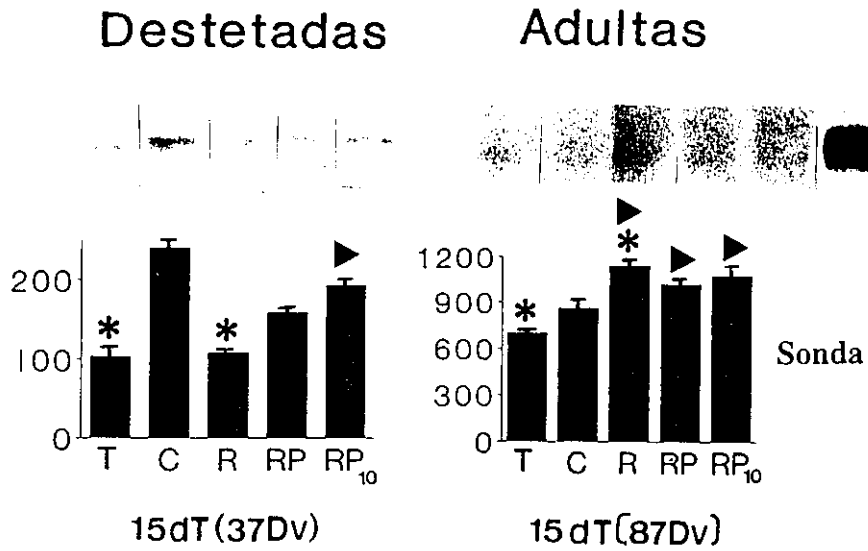
Los niveles de IGFBP-2, que aparecieron aumentados en los animales tiroidectomizados, disminuyeron tras el tratamiento con T_4 (Figura 38). En las ratas destetadas, el descenso de la expresión fue más acusado al administrar a los animales los pellets, e incluso, los niveles de los transcritos de esta proteína fueron inferiores a los mostrados por la población control. En los animales adultos, sin embargo, y quizás debido a los bajos niveles de IGFBP-2 que existen en ellos, los tres tratamientos ensayados se mostraron efectivos para disminuir la expresión hepática de la proteína, e incluso, como sucedía en las ratas destetadas, estos valores resultaron ser inferiores a los mostrados por los controles. En ninguno de los dos grupos de animales (destetados y adultos) se encontraron diferencias significativas entre las dos pautas de rehabilitación llevadas a cabo con pellets y sí respecto a los de la inyección (destetadas).

En cuanto a la IGFBP-3, el tratamiento con pellet durante 10 días fue capaz de restaurar los niveles de ARNm de esta proteína en ratas tiroidectomizadas a

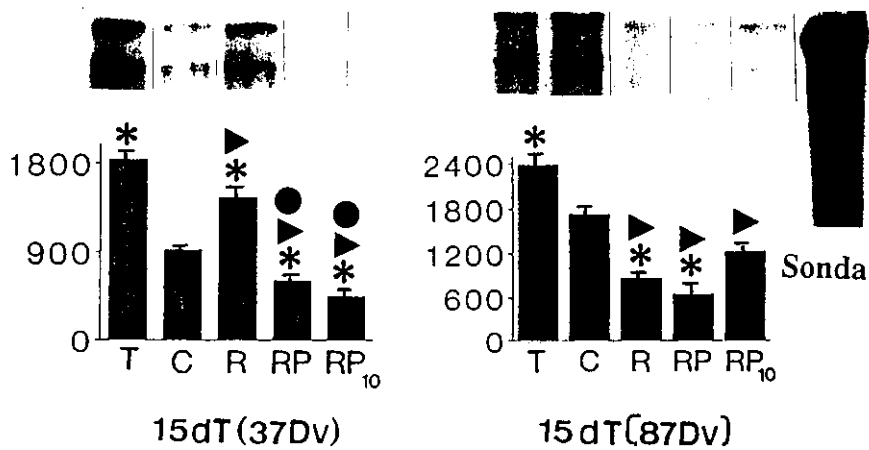
Fig 38 *Análisis mediante ensayo de protección de la RNasa de los transcritos hepáticos de IGFBP-1, 2 y 3 de ratas en periodo destetado (37 días) y adulto (87 días): ratas tiroidectomizadas (T), controles (C), tiroidectomizadas y tratadas con una inyección de 1.75µg/100g de peso de T₄ durante 5 días (R), tiroidectomizadas rehabilitadas con pellet de igual dosis durante 5 días (RP₅), tiroidectomizadas recuperadas con pellet de la misma dosificación durante 10 días (RP₁₀). * Significación estadística respecto a la población control. ► Significación estadística respecto a los animales tiroidectomizados. ● Significación estadística respecto a las ratas rehabilitadas con la inyección de T₄ (1.75µg/100g de peso). Se muestra el análisis densitométrico. Media ± DS de 4 análisis diferentes.*

EXPRESION DEL ARNm HEPATICO (IGFBPs)

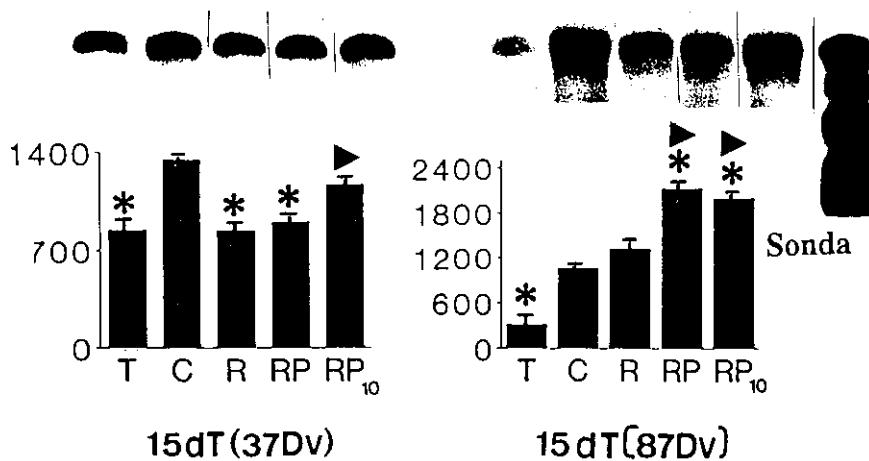
IGFBP-1



IGFBP-2



IGFBP-3



valores control (destetadas) o incluso superiores (adultas) (Figura 38). En los animales adultos, los tres tratamientos ensayados aumentaron la expresión hepática de la IGFBP-3, y aunque los pellets lo hicieron incluso por encima de los valores control, la inyección mostró unos niveles similares a la población control. En las ratas destetadas, sin embargo, sólo la pauta llevada a cabo mediante la implantación del pellet durante 10 días, fue capaz de aumentar la expresión hepática de esta proteína de alto peso molecular hasta valores control, y a pesar de ello, no se encontraron diferencias estadísticas entre ninguno de los tres distintos tratamientos.

3.5.2.7. Resumen de los resultados del estudio del tratamiento con T₄ en ratas destetadas y adultas tiroidectomizadas.

El IGF-I circulante en animales destetados se restaura igual a controles con pellet durante 10 días y en adultas por igual vía de administración tanto a 5 como 10 días. La expresión del ARNm hepático es rehabilitada igual a controles con pellet tanto a 5 como 10 días en ambas poblaciones. El peso corporal y la GH plasmática e hipofisaria muestran una mejor restauración, a pesar de que no alcanzan valores control más que en el contenido en pituitaria de adultas a los 10 días de tratamiento con pellet, mientras la insulina es restaurada igual a controles con pellet a 5 ó 10 días en ambas poblaciones.

La glucemia alcanza niveles controles con cualquier tratamiento de T₄. En estas condiciones, las bandas proteicas de bajo peso molecular circulantes se restauraron tan solo con pellet 10 días en destetadas y adultas y la IGFBP-3 mejor con 10 días de pellet en adultas. La expresión de su ARN muestra que dicha restauración podría ser debida a IGFBP-1, ya que la expresión de IGFBP-2 disminuía con T₄ por cualquier tratamiento tanto en destetadas como adultas. El ARN de IGFBP-3 se rehabilitó con pellet durante 10 días subiendo por encima de los controles en adultas.

Cuadro 4.- Resumen de los resultados de los estudios de la administración de T_4 en dosis de $1.75\mu\text{g}/100\text{g}$ de peso por vía ip ($T + T_4$) durante 5 días o vía sc a lo largo de 5 ($(T + T_4)_5$) o 10 días ($(T + T_4)_{10}$) en ratas destetadas (37 días) y adultas (87 días) respecto a la población control.

| | $T + T_4$ | | $(T + T_4)_5$ | | $(T + T_4)_{10}$ | |
|-------------------------|------------|---------|---------------|---------|------------------|---------|
| | DESTETADAS | ADULTAS | DESTETADAS | ADULTAS | DESTETADAS | ADULTAS |
| INSULINEMIA | ↓ | ↓ | = | = | = | = |
| GLUCEMIA | = | = | = | = | = | = |
| GH CIRCULANTE | = | ↓ | ↑ | ↓ | ↑ | ↓ |
| GH HIPOFISARIA | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ | = |
| IGF-I CIRCULANTE | ↓ | ↓ | ↓ | = | = | = |
| ARNm IGF-I | ↓ | ↓ | = | = | = | = |
| IGFBP-1 y 2 CIRCULANTES | = | ↓ | = | ↓ | = | = |
| ARNm IGFBP-1 | ↓ | ↑ | = | = | = | = |
| ARNm IGFBP-2 | ↑ | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ | = |
| IGFBP-3 CIRCULANTE | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ | = | = |
| ARNm IGFBP-3 | ↓ | = | ↓ | ↑ | = | ↑ |

3.6. DIABETES EN PERIODO NEONATAL Y ADULTO Y REHABILITACION CON T_4 .

El modelo de diabetes por STZ se provocó por inyección intraperitoneal de esta sustancia a los 10 días de vida (neonatos) o a los 72 días de vida (adultos). Los animales fueron divididos en dos grupos y sacrificados a los 20 y 87 días de edad: el primer grupo fue sometido durante 5 días a un tratamiento con unas dosis de T_4 de 1.5 y $1.75\mu\text{g}/100\text{g}$ de peso para las ratas neonatales y adultas, respectivamente, y el segundo actuó de control.

3.6.1. Evolución del peso corporal.

Las ratas diabéticas presentaron un peso inferior al de sus controles tanto en la etapa neonatal (25.45%) como en la adulta (31.56%) (Tabla 11).

En la etapa neonatal, el tratamiento con T_4 aumentó el peso corporal de estos animales diabéticos a los que se les implantó el pellet (12.13%) frente a los no tratados, aunque persistió la diferencia respecto a la población control. Por el contrario, las ratas adultas no modificaron su peso tras la administración de T_4 respecto a los animales control.

Tabla 11.- Peso corporal, niveles circulantes de glucosa, T₃, T₄, GH y contenido hipofisario de GH de ratas neonatales (20 días) y adultas (87 días) controles, diabéticas (D), neonatos diabéticos tratados con 1.5 µg/100g de peso T₄ y adultos diabéticos tratados con 1.75µg/100g de peso (D + T₄). Media 8-10 animales ± DS.

| | Peso corporal (g) | T ₃ sérica (ng/dl) | T ₄ sérica (µg/dl) | GH plasmática (ng/ml) | GH hipofisaria (ng/mg) | Glucemia (ng/100ml) |
|--------------------|-----------------------------|-------------------------------|-------------------------------|------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| NEONATOS | | | | | | |
| Controles | 52.66 ± 0.86 | 90.50 ± 1.84 | 5.85 ± 0.58 | 3.42 ± 0.71 | 12.47 ± 0.39 | 133.58 ± 2.38 |
| Diabéticas (D) | 39.26 ± 1.72 ^a | 59.26 ± 30.8 ^a | 4.16 ± 0.62 ^a | 3.37 ± 0.14 | 8.86 ± 0.92 ^a | 270.29 ± 10.45 ^a |
| D + T ₄ | 46.27 ± 0.65 ^{a,b} | 98.10 ± 6.89 ^b | 6.61 ± 1.32 ^b | 89.67 ± 15.04 ^{a,b} | 15.97 ± 2.09 ^{a,b} | 199.12 ± 11.64 ^a |
| ADULTOS | | | | | | |
| Controles | 213.47 ± 3.33 | 94.53 ± 4.46 | 5.25 ± 0.63 | 95.31 ± 4.09 | 29.01 ± 1.61 | 133.05 ± 1.89 |
| Diabéticas (D) | 146.10 ± 6.03 ^a | 11.93 ± 0.21 ^a | 1.03 ± 0.15 ^a | 23.70 ± 3.52 ^a | 10.83 ± 1.26 ^a | 490.47 ± 4.81 ^a |
| D + T ₄ | 156.13 ± 10.36 ^a | 51.89 ± 8.58 ^{a,b} | 3.71 ± 0.91 ^{a,b} | 42.46 ± 6.12 ^{a,b} | 13.89 ± 0.98 ^a | 454.82 ± 4.49 ^a |

^ap < 0.05 respecto a las ratas C

^bp < 0.05 respecto a las ratas D

3.6.2. Niveles séricos de T₃ y T₄ y plasmáticos e hipofisarios de GH.

La diabetes provocó un descenso en los niveles circulantes de las hormonas tiroideas (Tabla 11). Esta disminución fue más acusada para los animales adultos (85.57% para T₃ y 82.16% para T₄) que para los neonatos (34.52% para T₃ y 28.89% para T₄) respecto a los controles.

La administración de T₄ provocó el esperado aumento en los niveles circulantes de las hormonas tiroideas (Tabla 11). En el caso de los animales diabéticos neonatales tratados con 1.5µg/100g peso de tiroxina, el incremento fue de un 65.54% para T₃ y un 58.65% para T₄ respecto a las ratas diabéticas no tratadas, lo que situó las concentraciones séricas de las hormonas en unos valores iguales a los de las ratas control. Al igual que sucedía con las ratas neonatales que recibían T₄, los animales adultos diabéticos sometidos al tratamiento hormonal experimentaron un aumento en los valores circulantes de las hormonas tiroideas (262.84% y 271.72% para T₃ y T₄, respectivamente) frente a las ratas diabéticas, pero no se alcanzaron los valores de la población control.

Los niveles plasmáticos de GH disminuyeron con el estado de diabetes en los animales adultos (75.13%) respecto a los control (Tabla 11). Sin embargo, las ratas neonatales diabéticas experimentaron un ligero descenso (no significativo) en los valores circulantes de esta hormona respecto a los de la población control.

El contenido hipofisario de GH, al igual que los niveles circulantes, disminuyó en mayor medida en los animales adultos diabéticos (62.67%) que en los neonatos (28.95%) respecto a las ratas control (Tabla 11).

El tratamiento de los animales diabéticos con T₄ provocó un aumento en la concentración circulante de GH y en su contenido hipofisario (Tabla 11). Los niveles plasmáticos de GH en las ratas neonatales tratadas con la hormona sufrieron un aumento espectacular, e incluso sobrepasaron los valores de la población control, mientras que en los animales adultos diabéticos, a los que también se les administró la tiroxina, este incremento fue más discreto y situó los niveles de estas ratas en unas cifras intermedias a las de las poblaciones control y diabética. A nivel hipofisario, el aumento provocado en el contenido de GH por la administración de T₄ en las dos poblaciones de animales no redujo la diferencia existente respecto a los animales control, aunque este incremento resultó ser ligeramente superior en el caso de las ratas adultas (28.25%) respecto a las neonatales (28.07%).

3.6.3. Glucemia e insulinemia.

La glucemia de las ratas diabéticas fue de 2 a 4 veces superior a la de los animales control (Tabla 11). No obstante, el tratamiento con T_4 disminuyó significativamente los niveles sanguíneos de glucosa de los neonatos diabéticos que recibieron una dosis de tiroxina de $1.5\mu\text{g}/100\text{g}$ de peso, aunque no se alcanzaron los valores de la población control.

Los niveles de insulina en plasma de los animales diabéticos neonatales y adultos, como era de esperar, fueron muy inferiores a los de sus controles (55.63 y 84.81%, respectivamente) (Figura 39). Estas diferencias respecto a las poblaciones control se mantuvieron a pesar del tratamiento hormonal con T_4 de estos animales diabéticos neonatales y adultos (Figura 39).

3.6.4. IGFs: niveles séricos y expresión del ARNm hepático.

3.6.4.1. Niveles séricos.

La concentración circulante de IGF-I disminuyó en los animales diabéticos neonatales y adultos respecto a los control en una proporción cercana al 50% en ambas poblaciones (Figura 39).

Las ratas neonatales diabéticas que recibieron la tiroxina aumentaron significativamente los niveles séricos de IGF-I respecto a los animales diabéticos, de modo que la concentración del péptido fue igual a la de la población control. En cuanto a los animales adultos, la implantación del pellet a los animales diabéticos no pareció tener ningún efecto sobre los niveles séricos de IGF-I.

Los valores de IGF-II en el suero de las ratas diabéticas neonatales disminuyeron frente a los de la población control (43.57%) (Figura 39), y el tratamiento con $1.5\mu\text{g}/100\text{g}$ de peso de T_4 , que tan eficaz se mostró en la restauración de los niveles de IGF-I, no tuvo ningún efecto en la recuperación de la concentración circulante de IGF-II.

3.6.4.2. Expresión del ARNm hepático.

Los valores de ARNm de IGF-I en hígado de las ratas neonatales diabéticas disminuyeron respecto a la población control, al igual que sucedía a nivel circulante (Figura 39). La administración de T_4 a estos animales diabéticos aumentó la expresión del péptido (Figura 39), pero no se alcanzaron los niveles control.

En la etapa adulta, como sucedía en la neonatal, los niveles de ARNm de IGF-I disminuyeron en las ratas diabéticas, pero en este caso, el tratamiento llevado a cabo con T_4 no tuvo ningún efecto sobre la expresión hepática del péptido (Figura

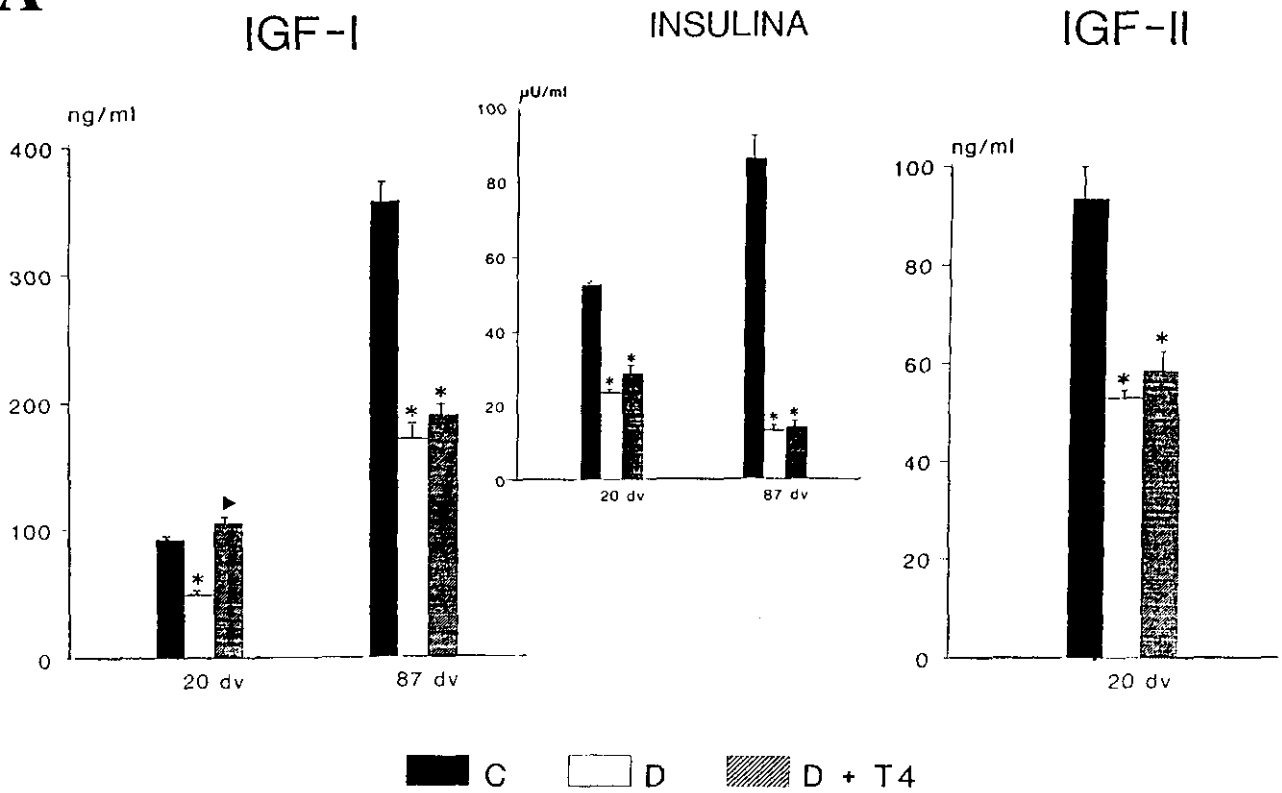
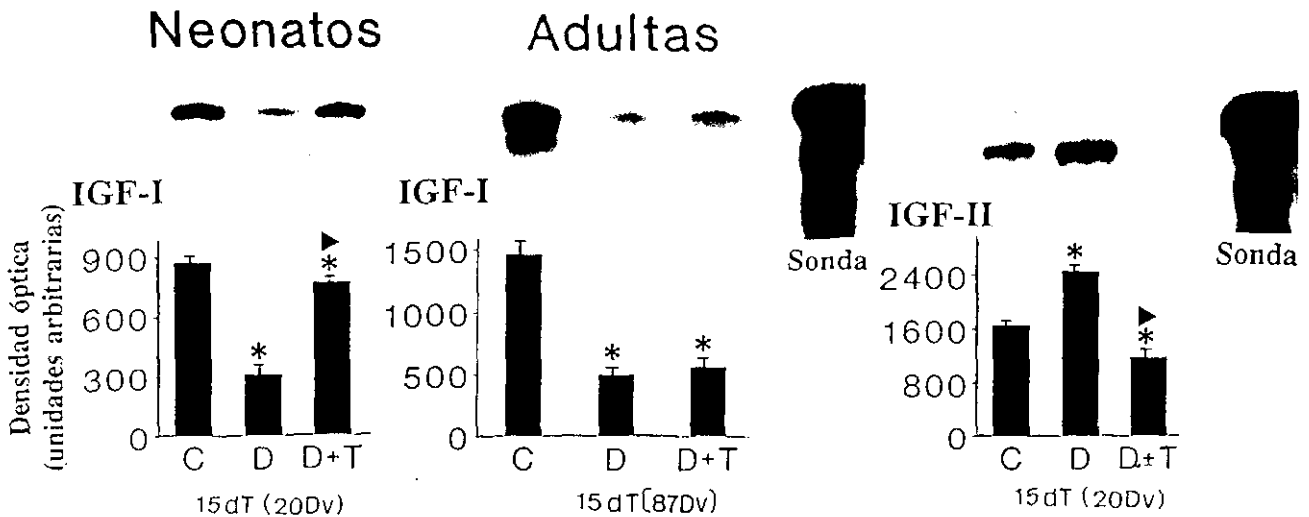
A**B****EXPRESION DEL ARNm HEPATICO (IGFs)**

Fig 39 A) Niveles circulantes de IGF-I, insulina e IGF-II en ratas neonatales (20 días) y adultas (87 días) diabéticas (D), diabéticas tratadas con pellets de T_4 de $1.5\mu\text{g}/100\text{g}$ de peso en el caso de los animales neonatales y $1.75\mu\text{g}/100\text{g}$ de peso para las adultas (D + T_4), controles (C). Media \pm DS de 8-10 animales.

B) Expresión hepática del ARNm y cuantificación densitométrica de los IGF-I y II en ratas neonatales (20 días de vida) y adultas (87 días) diabéticas (D), diabéticas tratadas con pellets de T_4 de $1.5\mu\text{g}/100\text{g}$ de peso en el caso de los animales neonatales y $1.75\mu\text{g}/100\text{g}$ de peso de T_4 para las adultas (D + T_4), controles (C). El análisis se realizó mediante el ensayo de protección de ribonucleasas. Media \pm DS de 4 análisis diferentes. * Significación estadística respecto a las ratas control. ► Significación estadística respecto a la población diabética.

39).

Los niveles de ARNm hepático de IGF-II de las ratas neonatales aumentaron en una situación de diabetes respecto a la población control (Figura 39). No obstante, la administración de T_4 produjo un descenso en la expresión de dicho péptido, e incluso, fueron inferiores a los mostrados por la población control.

3.6.5. IGFBPs: niveles séricos y expresión del ARNm hepático.

3.6.5.1. Niveles séricos.

3.6.5.1.1. Western ligand blot.

En la etapa neonatal, la diabetes produjo un descenso en los niveles circulantes de las proteínas ligadoras de IGFs, tanto en el complejo de 30kDa (IGFBP-1 y 2) como en el de 45kDa (IGFBP-3), de los animales (Figura 40). Sin embargo, el tratamiento hormonal llevado a cabo con T_4 no modificó los niveles séricos de dichas proteínas, con lo que los valores circulantes de estos péptidos se mantuvieron iguales a los de la población neonatal diabética (Figura 40).

Los animales diabéticos adultos, por su parte, también mostraron un descenso en los niveles circulantes de los dos complejos (30 y 45kDa), y tampoco en este caso el tratamiento efectuado con T_4 aumentó los niveles circulantes de estas proteínas respecto a la población diabética (Figura 40).

3.6.5.1.2. Western inmunoblot.

La población de ratas neonatales diabéticas mostró un aumento en los niveles circulantes de IGFBP-1 respecto a los animales control (Figura 40), mientras que los valores de IGFBP-2 no se vieron afectados.

La administración de T_4 a las ratas neonatales diabéticas provocó un descenso en los niveles séricos de IGFBP-1 respecto a la población de animales diabéticos (Figura 40). Esta disminución igualó los valores de las poblaciones tratadas con la hormona a los de la control. Los niveles circulantes de IGFBP-2 no se modificaron por la administración de T_4 a los animales diabéticos (Figura 40).

3.6.5.2. Expresión del ARNm hepático.

De manera análoga a lo que sucedía a nivel circulante, la diabetes provocó un gran aumento en la expresión hepática de la IGFBP-1 en las ratas neonatales y adultas respecto a sus poblaciones de animales control (Figura 41).

El tratamiento con T_4 de los animales neonatales diabéticos disminuyó los niveles de ARNm hepático de IGFBP-1 (Figura 41) y, aunque los valores descendieron respecto a los de las ratas diabéticas, no se llegaron a alcanzar las cifras

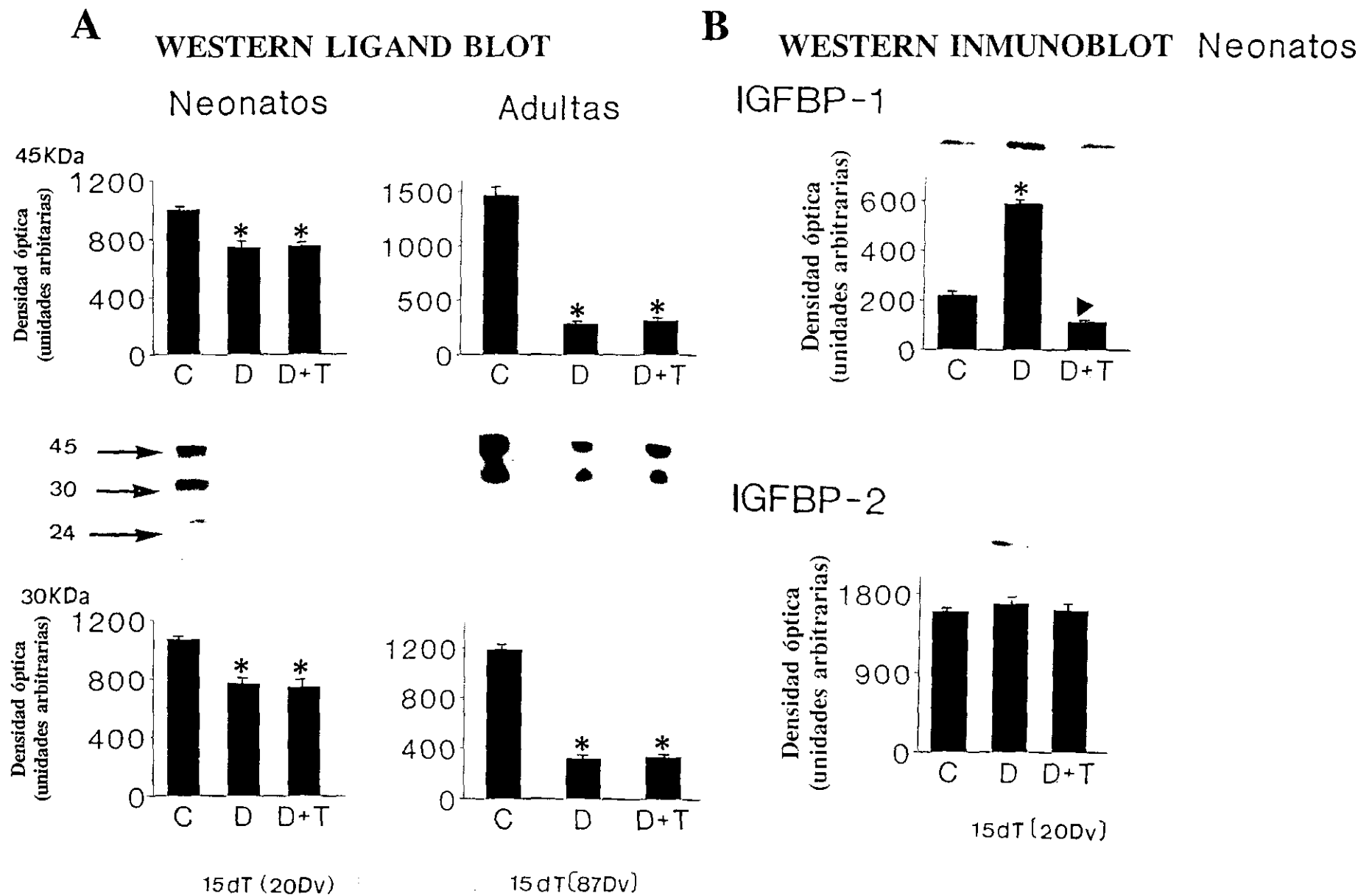
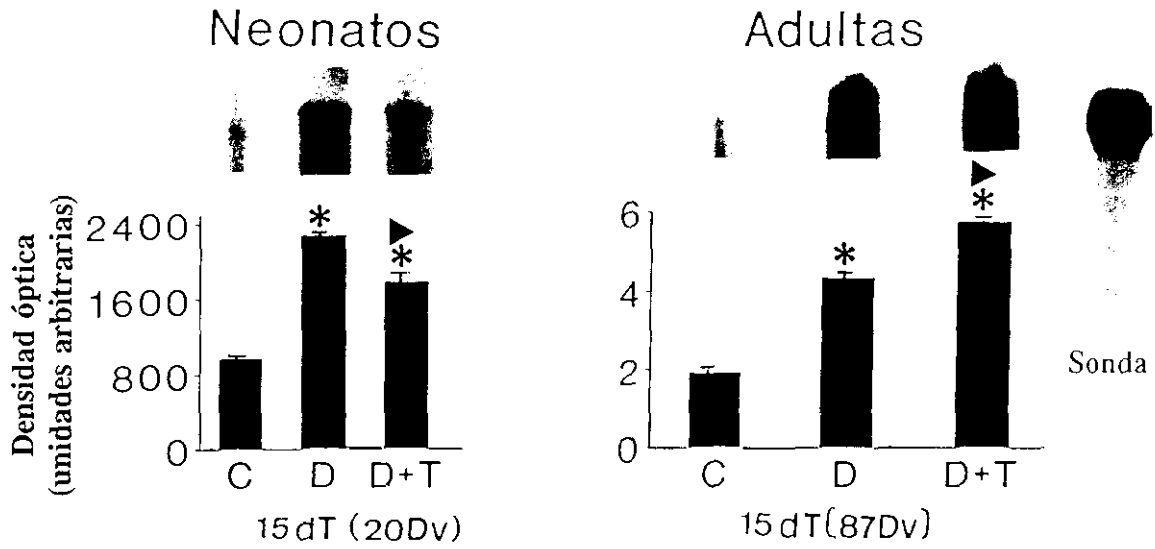


Fig 40 Análisis mediante "Western ligand blot" (A) y "Western inmunoblot" (B) de los niveles de las IGFBPs en 2.5µl de suero de ratas neonatales (20 días) o adultas (87 días) diabéticas (D), diabéticas tratadas con pellets de T₄ de 1.5µg/100g de peso en el caso de los animales más inmaduros y 1.75µg/100g de peso para adultos (D + T₄), controles (C). Media ± DS de 4 análisis diferentes. * Significación estadística respecto a la población control. ► Significación estadística respecto a las ratas diabéticas.

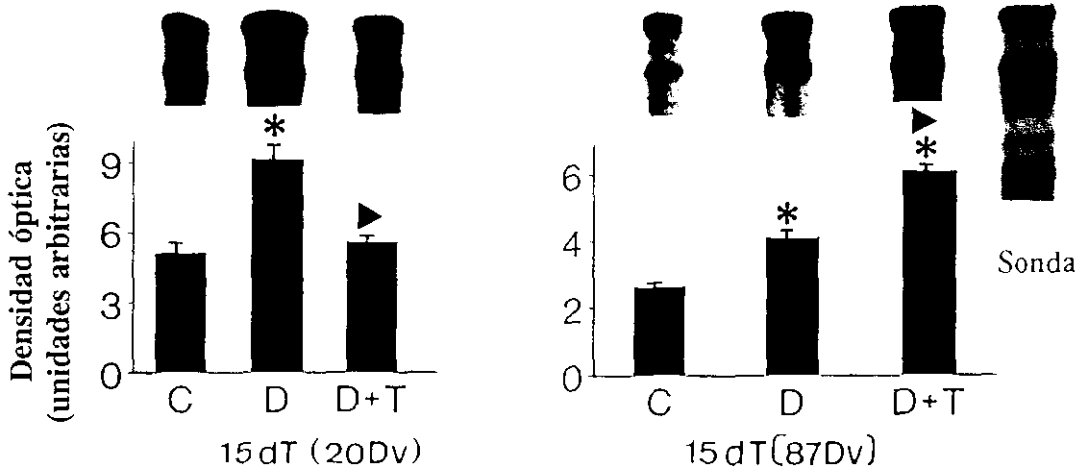
Fig 41 *Expresión hepática del ARNm y cuantificación densitométrica de IGFBP-1, 2 y 3 en ratas neonatales (20 días) y adultas (87 días) diabéticas (D), diabéticas tratadas con 1.5µg/100g de peso en el caso de los animales neonatales y 1.75µg/100g de peso para los adultos (D + T_d), controles (C). Media ± DS de 4 análisis distintos.*
** Significación estadística respecto a las ratas control. ► Significación estadística respecto a la población diabética.*

EXPRESION DEL ARNm HEPATICO (IGFBPs)

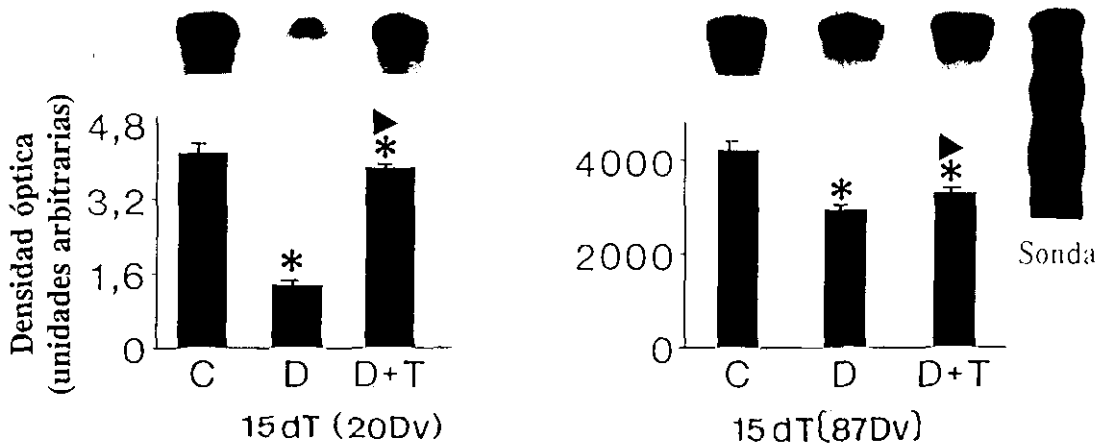
IGFBP-1



IGFBP-2



IGFBP-3



de la población control.

En la etapa adulta, el tratamiento con T_4 aumentó aún más los niveles de ARNm de IGFBP-1 respecto a los de las ratas diabéticas (Figura 41), y la administración de tiroxina por tanto no restauró sus niveles a los de los controles.

La expresión hepática de IGFBP-2 aumentó en las ratas diabéticas neonatales y adultas respecto a las control (Figura 41). Sin embargo, en la etapa neonatal, el tratamiento hormonal de estos animales diabéticos disminuyó los niveles de ARNm de IGFBP-2 hasta alcanzar unos valores similares a los de la población control (Figura 41), y por el contrario, los animales diabéticos adultos tratados con la hormona mostraron un aumento significativo de la expresión de IGFBP-2 respecto a la población diabética (Figura 41).

En cuanto a los niveles de ARNm hepático de IGFBP-3, disminuyeron significativamente en una situación de diabetes tanto en la etapa neonatal como en la adulta (Figura 41). No obstante, la administración de T_4 a las ratas neonatales diabéticas aumentó la expresión hepática de la IGFBP-3, aproximando los niveles de ARNm a los control (Figura 41). Por último, en la etapa adulta, la administración de T_4 a los animales diabéticos aumentó la expresión hepática de IGFBP-3 y situó sus niveles en valores intermedios y distintos a los mostrados por las poblaciones control y diabética (Figura 41).

3.6.6. Resumen de los resultados del estudio de la diabetes en ratas neonatales y adultas diabéticas y tratadas con T_4 .

La administración de STZ a las ratas provocó un bloqueo en la secreción de insulina, por lo que los niveles plasmáticos de esta hormona fueron muy bajos, y el tratamiento con T_4 no mejoró la situación. En los animales diabéticos, las dosis de T_4 rehabilitaron los niveles de IGF-I circulante y también su expresión de ARNm hepático sin incrementar la insulina, cosa que no hicieron en adulto. El IGF-II no se restauró a nivel circulante pero el ARNm, que lo tienen aumentado los animales neonatales diabéticos, disminuyó después del tratamiento. Las IGFbps circulantes, que están disminuidas en ambos animales diabéticos neonatales y adultos, no se rehabilitaron con T_4 . En neonatos sí que descendió la IGFBP-1 que tenía niveles mayores con respecto a controles.

Las dosis de T_4 en neonatos disminuyeron la expresión de IGFBP-1 y 2 aumentadas en los animales neonatales y adultos diabéticos, pero no lo hicieron en la población adulta. La expresión del ARNm en neonatos y adultos se rehabilita

después de las dosis en neonatos igual a controles y no en adultas. Se concluye la no regulación a nivel transcripcional del complejo de 30kDa (IGFBP-1 y 2) en los animales diabéticos neonatales y adultos.

Cuadro 5.- Resumen de los resultados de los estudios de la administración de T₄ en dosis de 1.5 y 1.75µg/100g de peso por vía sc (D + T₄) en ratas neonatales y adultas diabéticas (20 y 87 días de vida) respecto a la población control.

| | NEONATOS | | ADULTAS | |
|-------------------------|----------|--------------------|---------|--------------------|
| | D | D + T ₄ | D | D + T ₄ |
| GLUCEMIA | ↑ | ↑ | ↑ | ↑ |
| INSULINEMIA | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ |
| GH CIRCULANTE | = | ↑ | ↓ | ↓ |
| GH HIPOFISARIA | = | ↑ | ↓ | ↓ |
| IGF-I CIRCULANTE | ↓ | = | ↓ | ↓ |
| ARNm IGF-I | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ |
| IGF-II CIRCULANTE | ↓ | ↓ | | |
| ARNm IGF-II | ↑ | ↓ | | |
| IGFBP-1 Y 2 CIRCULANTES | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ |
| IGFBP-1 CIRCULANTE | ↑ | = | | |
| ARNm IGFBP-1 | ↑ | ↑ | ↑ | ↑ |
| IGFBP-2 CIRCULANTE | = | = | | |
| ARNm IGFBP-2 | ↑ | = | ↑ | ↑ |
| IGFBP-3 CIRCULANTE | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ |
| ARNm IGFBP-3 | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ |

3.7. HIPOTIROIDISMO, IGFs, IGFBPs Y TRANSPORTADORES DE GLUCOSA (GLUTs) EN PERIODO NEONATAL.

En el hipotiroidismo como se ha mostrado se altera el axis IGFs/IGFBPs y en dichas alteraciones parece tener un papel importante la insulina. Por otra parte, está descrito que el paso de GLUT-1, transportador de glucosa abundante en periodos inmaduros, a GLUT-4, transportador de glucosa en etapa adulta, parece estar regido por las hormonas tiroideas (Castelló, 1994). Con el fin de ver si ambos procesos, regulación del axis IGFs/IGFBPs y de GLUTs por dichas hormonas, están relacionados, se compararon estos estudios. Se diseñó un protocolo de trabajo en el que se analizaron las posibles alteraciones en los niveles de los IGFs, IGFBPs y GLUTs de los animales hipotiroideos (tratados con MMI y tiroidectomizados) a lo

largo del periodo perinatal (2, 4, 8 y 20 días de vida).

3.7.1. Evolución del peso corporal.

El peso corporal de los animales tiroidectomizados fue inferior al de los controles a los 4, 8 y 20 días de vida, y a esas edades la variación de dicho peso encontrada osciló frente a las ratas control entre un 13.28%, 21.75% y un 40.19%, respectivamente (Tabla 12).

Finalmente, en ambas poblaciones (hipotiroidea y control), se observó un aumento progresivo del peso corporal con la edad a lo largo de la etapa estudiada.

3.7.2. Niveles séricos de T₃ y T₄ y plasmáticos e hipofisarios de GH.

Los niveles circulantes de T₃ y T₄ disminuyeron en todos los animales hipotiroideos (tratados con MMI y tiroidectomizados) (Tabla 12). No obstante, las ratas neonatales de 2 y 4 días de vida, que fueron tratadas con MMI (0.02%, p/v) desde el día 14 de gestación, presentaron unos valores circulantes de hormonas tiroideas ligeramente inferiores a los de las ratas control a 4 días (38.47%). Por otro lado, los animales que fueron operados presentaron unos valores séricos muy bajos de T₃ (81.95% y 93.58% a los 8 y 20 días de vida, respectivamente) y T₄ (84.21% y 78.96% a los 8 y 20 días de edad) frente a los mostrados por la población control.

Los niveles circulantes de GH disminuyeron en los animales hipotiroideos de 2 (58.27%) y 4 días de vida (51.89%) respecto a la población control, pero aumentaron de un modo significativo en las ratas tiroidectomizadas, tanto a los 8 días de edad (3 días después de la tiroidectomía, 84.17%) como a los 20 días de vida (15 días después de la operación, 248.42%), siempre respecto a los neonatos control (Tabla 12) como se había encontrado en la primera parte de este trabajo.

El contenido de GH en pituitaria de las ratas hipotiroideas se alteró en el mismo sentido, respecto a la población control, a como lo hicieron los niveles plasmáticos de esta hormona (Tabla 12): disminuyó a los 2 y 4 días de vida en un 60.53 y un 85.11%, respectivamente, y se incrementó a los 8 (10.84%) y 20 días de edad (3.78%).

3.7.3. Glucemia e insulinemia.

Los animales tiroidectomizados presentaron un descenso significativo en los niveles sanguíneos de glucosa (8 y 20 días de vida) (Tabla 12).

Los valores plasmáticos de insulina no se modificaron en los animales neonatales tratados con MMI de 2 días de vida, aunque a los 4 días de edad se observó una disminución en las concentraciones de esta hormona (Figura 42). Por el

Tabla 12.- Peso corporal, niveles circulantes de T₃, T₄, glucosa, GH plasmática e hipofisaria de ratas neonatales hipotiroideas (H) tratadas con MMI (MMI, 2 y 4 días de vida), tiroidectomizadas (T, 8 y 20 días de edad) y controles. Media 8-10 animales ± DS.

| | | DIAS DE VIDA | | | |
|-------------------------------|-----------|---------------------------|---------------------------|----------------------------|----------------------------|
| | | Días después T (ddT) | | | |
| | | 2 (MMI) | 4 (MMI) | 8 (3ddT) | 20 (15 ddT) |
| Peso corporal (g) | H | 6.66 ± 0.26 | 9.21 ± 0.11 ^a | 13.06 ± 0.16 ^a | 24.85 ± 0.83 ^a |
| | Controles | 7.40 ± 0.08 | 10.62 ± 0.09 | 16.69 ± 0.24 | 41.55 ± 0.71 |
| T ₃ sérica (ng/dl) | H | 9.75 ± 0.19 | 11.31 ± 0.24 ^a | 7.70 ± 1.76 ^a | 6.43 ± 0.02 ^a |
| | Controles | 12.04 ± 1.71 | 18.38 ± 0.36 | 42.67 ± 2.64 | 100.20 ± 7.15 |
| T ₄ sérica (µg/dl) | H | 0.37 ± 0.04 | 0.17 ± 0.03 ^a | 0.25 ± 0.02 ^a | 1.13 ± 0.55 ^a |
| | Controles | 0.46 ± 0.09 | 0.86 ± 0.06 | 2.85 ± 0.39 | 5.37 ± 0.46 |
| GH plasmática (ng/ml) | H | 28.72 ± 4.31 ^a | 19.70 ± 0.73 ^a | 22.69 ± 2.07 ^a | 7.70 ± 0.53 ^a |
| | Controles | 68.83 ± 2.57 | 40.95 ± 0.22 | 12.32 ± 0.21 | 2.21 ± 0.15 |
| GH hipofisaria (µg/mg) | H | 0.30 ± 0.04 ^a | 0.35 ± 0.03 ^a | 2.76 ± 0.32 ^a | 11.55 ± 0.15 ^a |
| | Controles | 0.76 ± 0.09 | 2.35 ± 0.17 | 2.49 ± 0.51 | 11.13 ± 0.35 |
| Glucemia (mg/100ml) | H | 82.16 ± 1.04 | 110.91 ± 8.14 | 101.82 ± 0.90 ^a | 105.92 ± 4.85 ^a |
| | Controles | 94.71 ± 1.95 | 106.92 ± 6.01 | 118.54 ± 3.73 | 131.62 ± 1.69 |

^ap < 0.05 respecto a las ratas C

contrario, las ratas que fueron operadas mostraron unos niveles superiores a los de sus controles en un 64.86% y un 42.59% a los 8 y 20 días de vida, respectivamente (Figura 42) igual a lo hallado en la primera parte de este trabajo.

En ambas poblaciones (hipotiroideas y control), se observó un aumento progresivo en los niveles de insulina circulante, con un pico habitual y claro a los 4 días de vida en las ratas control que no aparece tan claro en las ratas tiroidectomizadas.

3.7.4. IGFs: niveles séricos y expresión del ARNm hepático.

3.7.4.1. Niveles séricos.

Los niveles de IGF-I en suero de las ratas control (Figura 42) mostraron un incremento progresivo (de 54.84ng/ml a 148.09ng/ml) de manera análoga a lo ya descrito para la insulina.

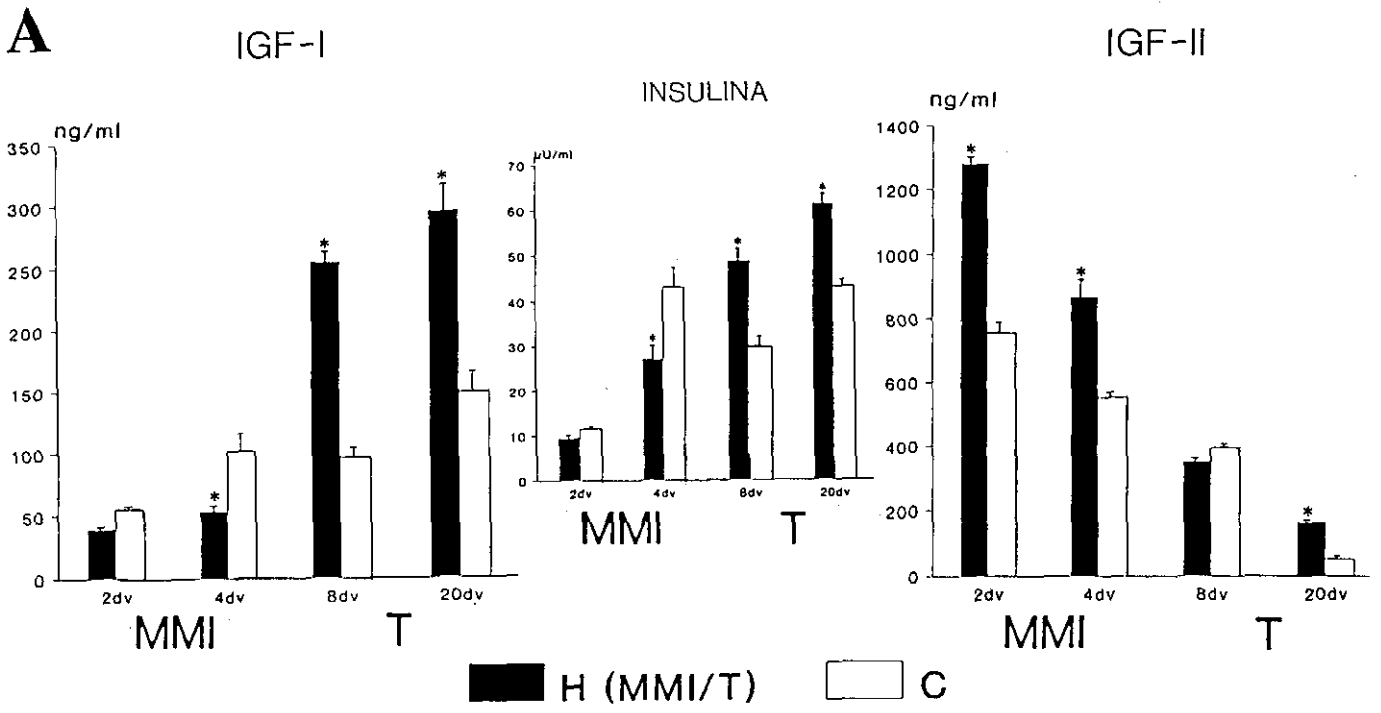
Los animales tratados con MMI presentaron unos valores de IGF-I inferiores a los de sus controles a los 4 días de edad (47.28%). Por el contrario, las ratas tiroidectomizadas mostraron un aumento en los niveles circulantes del péptido que llegó a ser de un 98.77% a los 20 días de vida y que resultó ser paralelo al incremento mostrado por la insulinemia en todos los casos, exactamente como sucedió en la primera parte del trabajo.

La concentración de IGF-II en el suero de las ratas control experimentó un descenso conforme aumentaba la edad del animal (Figura 42). Las ratas neonatales de 2 y 4 días de vida, que fueron tratadas con MMI, así como las de 20 días de edad, que fueron tiroidectomizadas, mostraron un aumento en los niveles circulantes de este péptido frente a la población control (69.97, 57.33 y 241.00%, respectivamente). Sin embargo, a los 8 días de vida se igualaron los valores séricos de IGF-II de las ratas operadas y controles.

3.7.4.2. Expresión del ARNm hepático.

Los animales hipotiroideos mostraron a 2 y 4 días de vida (tratados con MMI) un descenso en los niveles del ARNm hepático de IGF-I (Figura 42). Sin embargo, a los 8 y 20 días de edad, en los neonatos tiroidectomizados, se observó un aumento en la expresión del péptido en hígado, siempre respecto a la población control.

Los niveles de ARNm hepático de IGF-II (Figura 42) aumentaron en las ratas a las que se les administró el fármaco bociógeno (2 y 4 días de vida), así como en aquellas de 20 días de edad que fueron tiroidectomizadas, mientras que a los 8 días de vida (3 días después de la operación) la expresión del IGF-II fue menor en la



B

EXPRESION DEL ARNm HEPATICO (IGFs)

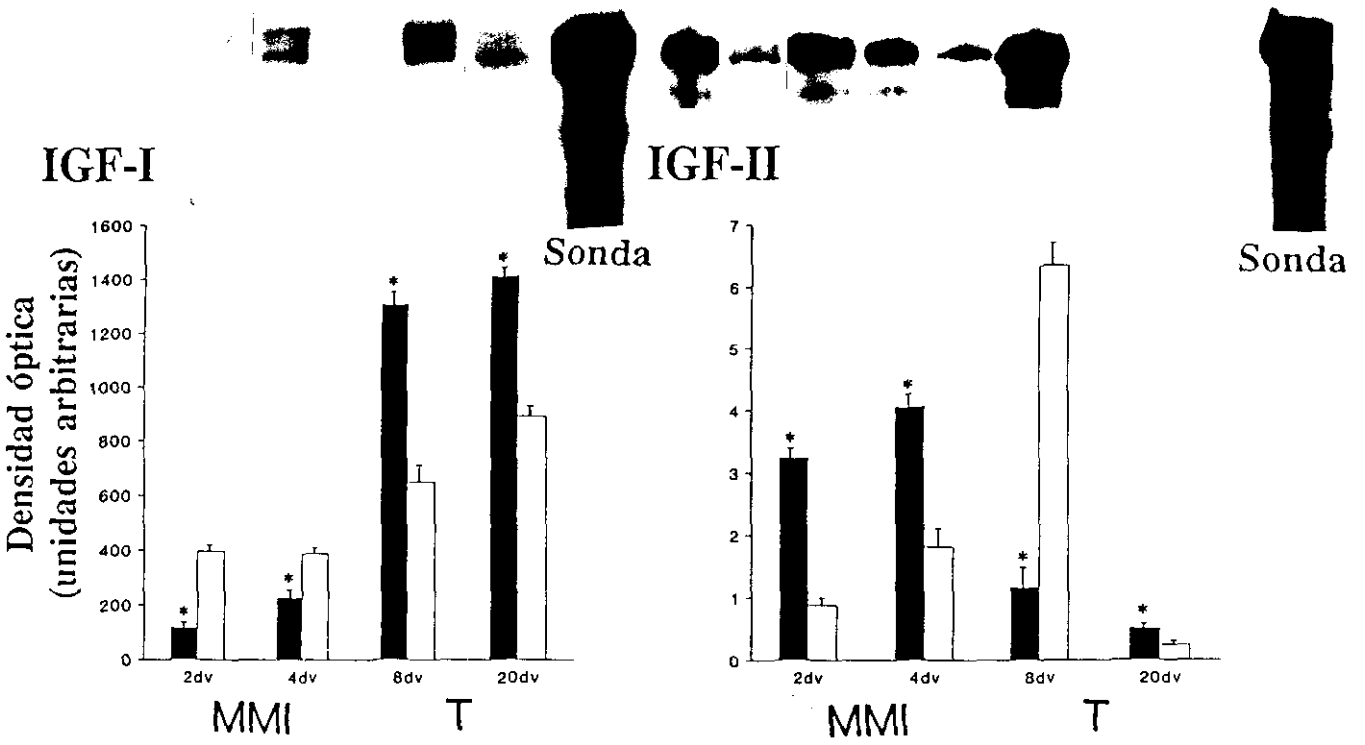


Fig 42 A) Niveles circulantes de IGF-I, insulina e IGF-II en animales neonatales hipotiroides (tratados con MMI o tiroidectomizados) y controles (C). Media \pm DS de 8-10 animales.
 B) Análisis mediante ensayo de protección a ribonucleasas de los transcritos hepáticos de IGF-I y II de ratas neonatales hipotiroides (MMI y T) y controles (C). Media \pm DS de 4 análisis diferentes.
 * Significación estadística respecto a la población control.

población de animales tiroidectomizados respecto a la control.

Se destaca así la existencia de un gran paralelismo entre las variaciones encontradas para estos péptidos (IGF-I y II) a nivel sérico y de expresión, lo que nos hace suponer la existencia de una regulación por parte de las hormonas tiroideas a nivel transcripcional. Además, se observó una gran similitud de resultados en estas poblaciones con respecto a las igual tratadas en la primera parte (apartado 3.1.), con lo cual ratificamos totalmente nuestros primeros resultados.

3.7.5. Estudio de regresión lineal y correlación.

El análisis de regresión y correlación entre IGF-I e insulina y GH se efectuó reuniendo en cada análisis los datos de las diferentes edades estudiadas.

La correlación fue muy buena y positiva entre IGF-I e insulina, tanto para población hipotiroidea ($r = 0.89$, $p < 0.001$) como para la control ($r = 0.84$, $p < 0.01$) (Figura 43). Sin embargo, estas poblaciones mostraron una correlación negativa ($r = -0.12$, $p < 0.05$ y $r = -0.93$, $p < 0.01$ para las ratas hipotiroideas y controles, respectivamente) cuando se representaron los niveles de IGF-I frente a los de GH (Figura 43), igual que lo obtenido en la primera parte.

3.7.6. IGFBPs: niveles séricos y expresión del ARNm hepático.

3.7.6.1. Niveles séricos.

3.7.6.1.1. Western ligand blot.

Los animales que fueron sometidos al tratamiento con el fármaco bociógeno presentaron una pauta diferente, respecto a las fluctuaciones observadas en los niveles circulantes de las IGFBPs, frente a aquellas ratas que se tiroidectomizaron.

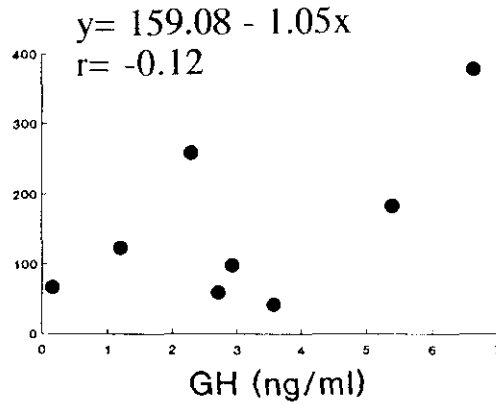
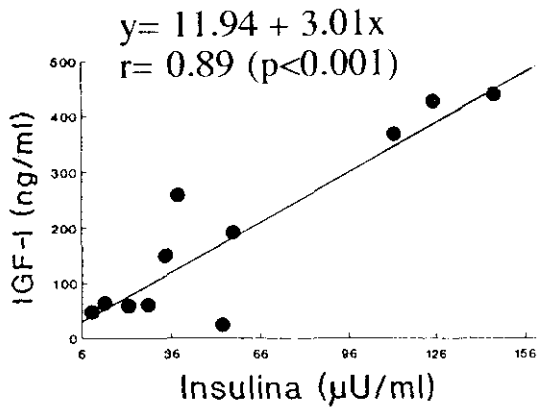
Los niveles séricos de las proteínas de 30kDa de los neonatos hipotiroideos disminuyeron a los 2 y 4 días de edad (poblaciones tratadas con MMI desde el día 14 de gestación), mientras que aumentaron a 8 y 20 días de vida (animales tiroidectomizados) frente a las ratas control (Figura 44).

La IGFBP-3 disminuyó en los animales hipotiroideos (tratados con MMI y tiroidectomizados) en todas las edades consideradas en el estudio (Figura 44).

La población control, como ya se ha señalado en otras ocasiones, mostró los cambios de las proteínas transportadoras asociadas al desarrollo; esto es, los niveles de IGFBP-1 y 2 disminuyeron al aumentar la edad del animal, mientras que la proteína de alto peso molecular siguió el patrón contrario (aumentó conforme lo hacía la edad de la rata).

NEONATOS

HIPOTIROIDEOS (MMI/T)



CONTROLES (C)

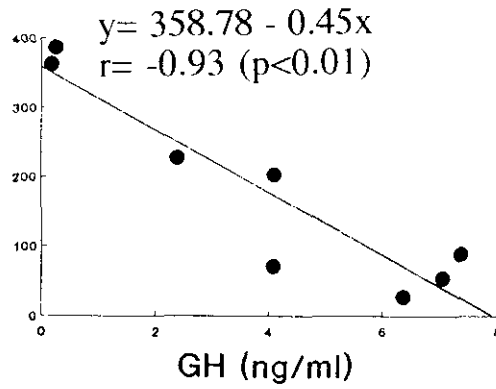
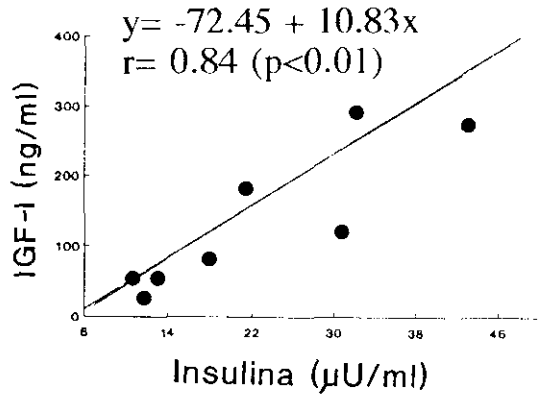
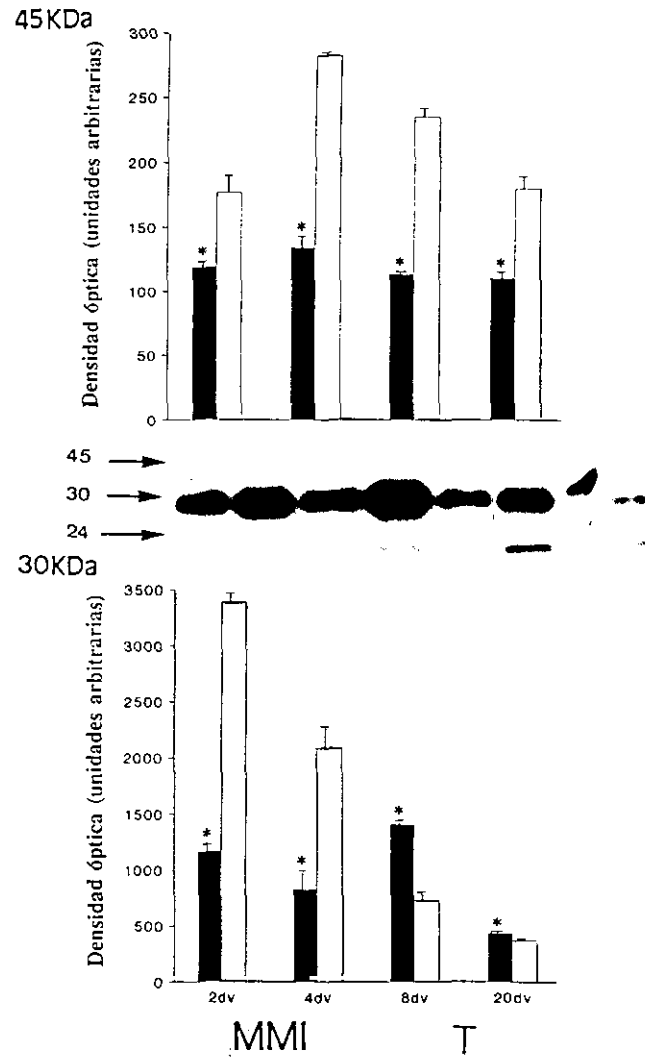


Fig 43 Análisis de regresión lineal y coeficiente de correlación de los niveles circulantes de IGF-I e insulina y GH de las ratas hipotiroideas (MMI y T) y controles (C) de 2, 4, 8 y 20 días de vida. Se muestran las diferencias significativas.

A WESTERN LIGAND BLOT



B WESTERN INMUNOBLOT

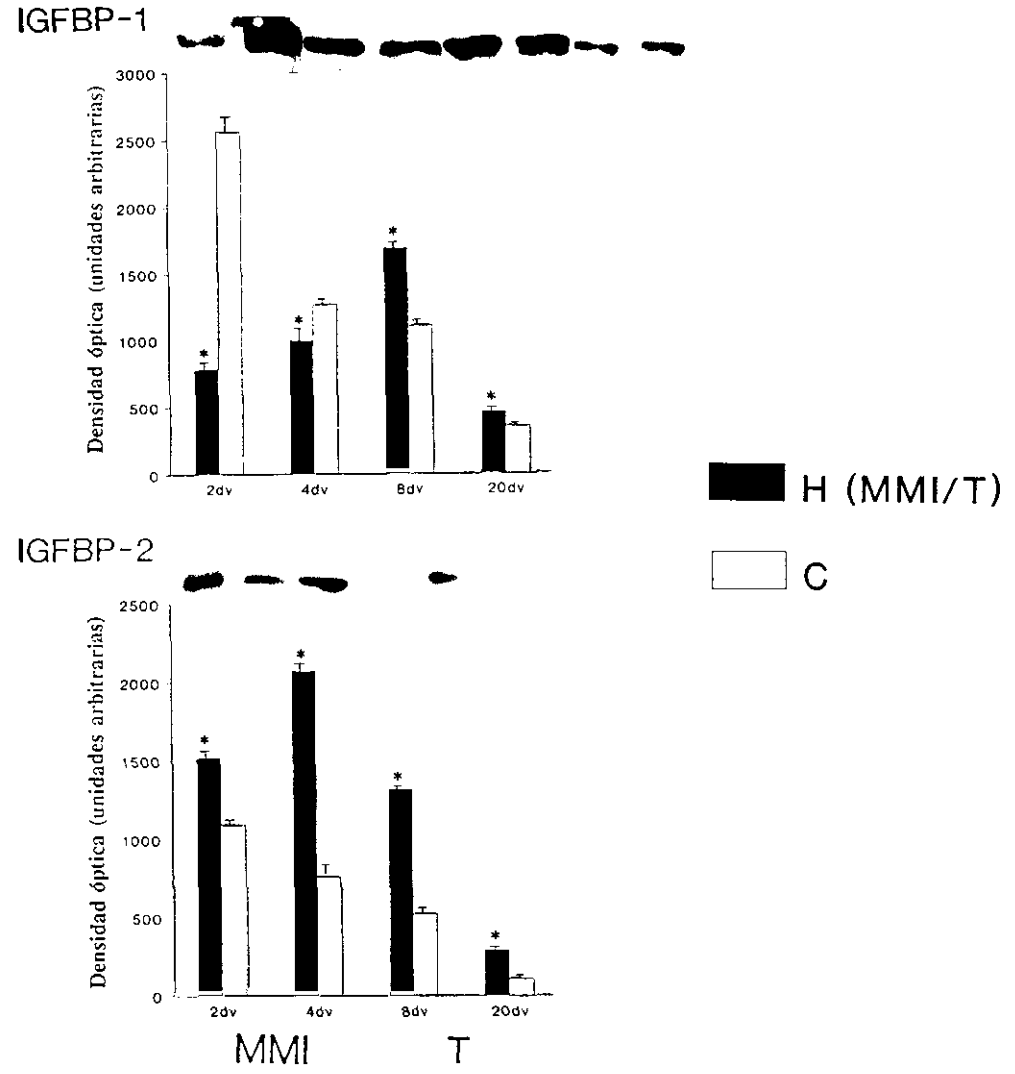


Fig 44 *Análisis mediante "Western ligand blot" (A) y "Western inmunoblot" (B) de los niveles de las IGFBPs en ratas neonatales (2, 4, 8 y 20 días de vida) hipotiroideas (MMI y T) y controles (C). Se analizaron 2.5µl de suero. Se muestra la cuantificación densitométrica de las concentraciones de las IGFBPs de las mismas poblaciones. Media ± DS de 4 análisis diferentes. * Significación estadística respecto a los animales control.*

3.7.6.1.2. Western inmunoblot.

Los niveles circulantes de IGFBP-1 se comportaron de modo muy distinto según el protocolo a que fue sometido el animal. Las poblaciones a las que se les administró MMI (2 y 4 días de vida) presentaron unas cifras séricas de esta proteína disminuidas, mientras que la tiroidectomía (8 y 20 días de edad) produjo un aumento en sus niveles, siempre respecto a los neonatos control (Figura 44), siguiendo igual pauta que la insulina.

El tratamiento de las membranas con anti-IGFBP-2 nos reveló un aumento significativo en los niveles séricos de esta proteína de bajo peso molecular en todos los animales hipotiroideos (tratados con MMI y tiroidectomizados) respecto a las ratas control (Figura 44).

3.7.6.2. Expresión hepática.

Los niveles de ARNm hepático de IGFBP-1 se encontraron disminuidos en los neonatos hipotiroideos que fueron tratados con MMI respecto a los controles y, por el contrario, los animales tiroidectomizados mostraron un aumento de la expresión de IGFBP-1, tanto a los 8 como a los 20 días de vida (Figura 45), al igual que ocurría con los niveles circulantes.

Los animales hipotiroideos mostraron unos niveles de ARNm de IGFBP-2 en hígado (Figura 45) superiores a los de sus controles en todas las edades estudiadas, excepto a los 2 días de vida, en que no se modificaron con respecto a controles.

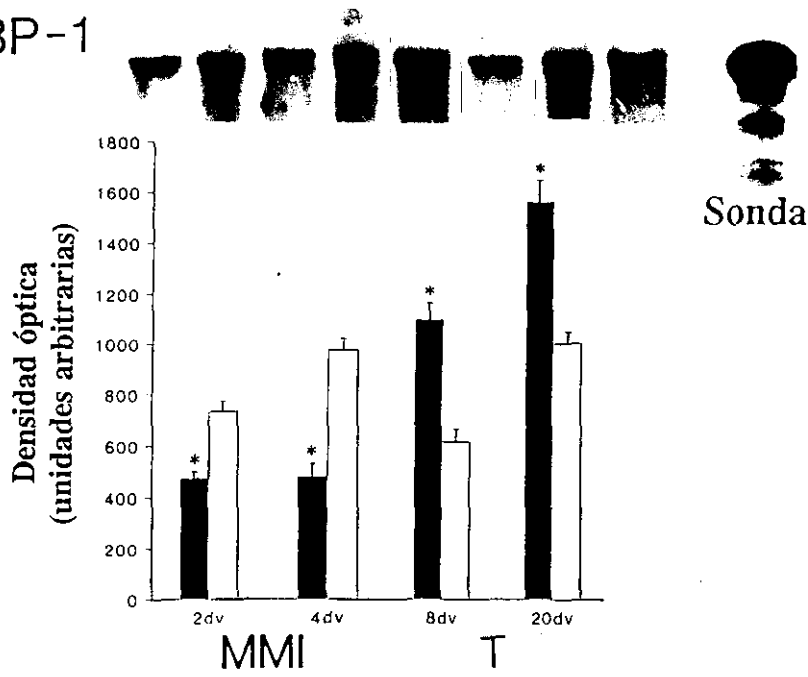
La expresión de la proteína de 45kDa (IGFBP-3) en hígado disminuyó en las ratas hipotiroideas respecto a los controles en todas las edades consideradas, excepto a los 4 días de vida (Figura 45).

Estos resultados nos muestran, por tanto, la existencia de un paralelismo entre los valores séricos y la expresión del ARNm hepático de las proteínas transportadoras encontradas para estos animales. Además, se encuentra también un perfil análogo en cuanto a las alteraciones en los niveles de las IGFbps entre los animales de 10, 15 y 20 días de vida tratados con MMI (ver apartado 3.1.) y los de 2 y 4 días de edad. Se debe destacar tan solo que las ratas de 2 y 4 días de vida presentaron unos niveles en el complejo proteico de 30kDa ("Western ligand blot") disminuidos frente a sus controles, mientras que los animales de 10, 15 y 20 días de vida, que fueron tratados también con MMI, mostraron unos valores de IGFBP-1 y 2 aumentados; esta diferencia quizás se deba a un descenso más acusado en los valores individuales de IGFBP-1, a 2 y 4 días de edad, respecto a 10, 15 y 20 días de vida o a que 2 y 4

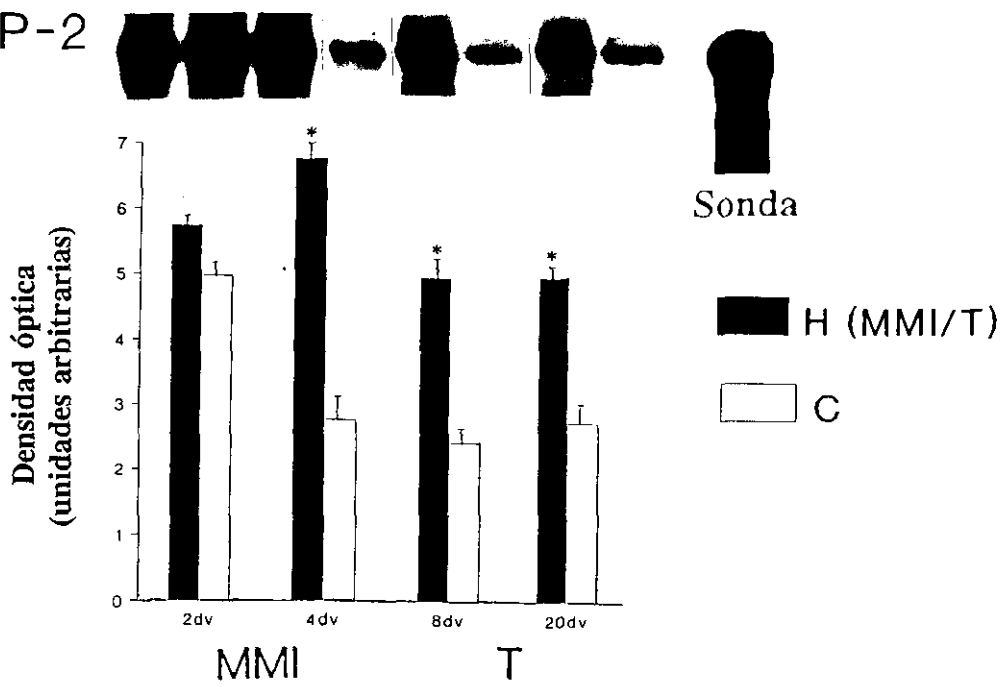
Fig 45 *Expresión hepática del ARNm y cuantificación densitométrica de IGFBP-1, 2 y 3 en neonatos hipotiroideos (MMI y T) y controles (C) de 2, 4, 8 y 20 días. El análisis se efectuó mediante el ensayo de protección de ribonucleasas. Media \pm DS de 4 análisis diferentes. * Significación estadística respecto a la población control.*

EXPRESION DEL ARNm HEPATICO (IGFBPs)

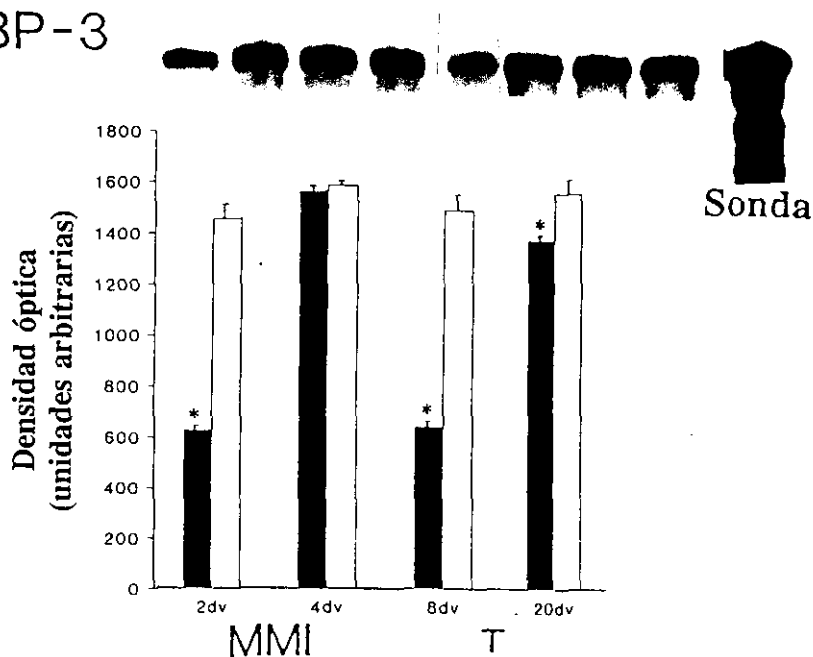
IGFBP-1



IGFBP-2



IGFBP-3



días son edades muy inmaduras.

3.7.7. Niveles de GLUTs en membrana cruda.

3.7.7.1. Corazón.

El corazón es un tipo especial de músculo esquelético que, como se ha mencionado, cuenta con dos tipos de transportadores de glucosa, el GLUT-1 y el GLUT-4.

El GLUT-1, que disminuye al aumentar la edad del animal en la rata control (Figura 46), incrementó sus niveles significativamente en las membranas plasmáticas de este tejido por la falta de hormonas tiroideas a los 4 y 8 días de edad respecto a los animales control. A los 2 y 20 días de vida no se encontró diferencia entre las dos poblaciones consideradas (hipotiroideas y controles).

En los animales control y, también en los hipotiroideos, el GLUT-4 aumentó con la edad de la rata (Figura 46). Los niveles de este transportador de glucosa disminuyeron tanto en los animales tratados con MMI como en los tiroidectomizados respecto a los controles, excepto a los 2 días de vida en que sus valores fueron iguales a los de la población control.

A la vista de los resultados, se podría sugerir que la falta de hormonas tiroideas provoca un retraso o una alteración en el patrón de cambio de los GLUTs, se produce una disrupción en el incremento de los niveles de GLUT-4 (propio del animal adulto).

3.7.7.2. Hígado.

El GLUT-1, en el hígado, aumentó en los animales hipotiroideos respecto a los controles a los 4, 8 y 20 días de vida, al igual que en el corazón. No se encontró diferencia estadísticamente significativa en los niveles de este transportador entre las dos poblaciones (hipotiroidea y control) a los 2 días de edad (Figura 46).

El GLUT-2, que es el transportador de glucosa mayoritario en el hígado, aumentó al hacerlo la edad del animal en las ratas control (Figura 46). En las ratas hipotiroideas, los niveles de GLUT-2 aumentaron a los 2 y 8 días de vida, pero a los 20 días de edad, momento en que los animales llevan un largo tiempo sufriendo las alteraciones metabólicas debidas a los bajos niveles de hormonas tiroideas, mostraron un descenso significativo que, quizá, no se observó antes por la necesidad de una situación de hipotiroidismo prolongado para que se produzca una adaptación (reducción de los niveles de GLUT-2) en este órgano clave para el metabolismo glucídico. De nuevo, parece que las situaciones de hipotiroidismo provocan una

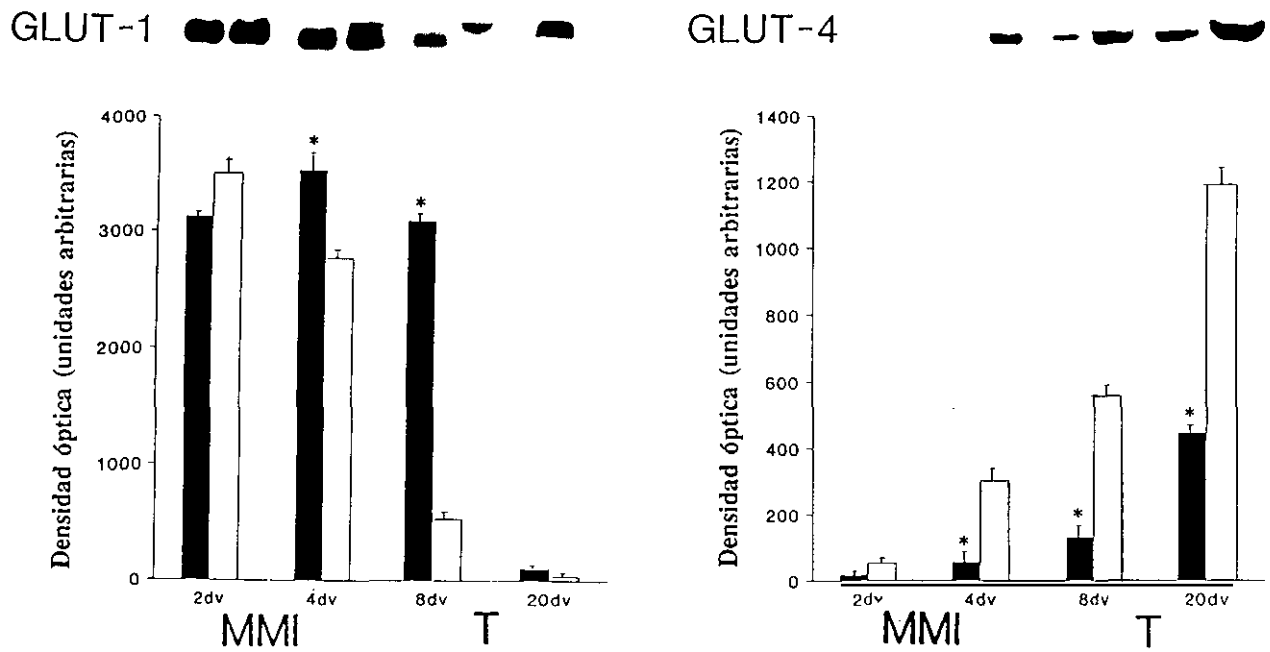
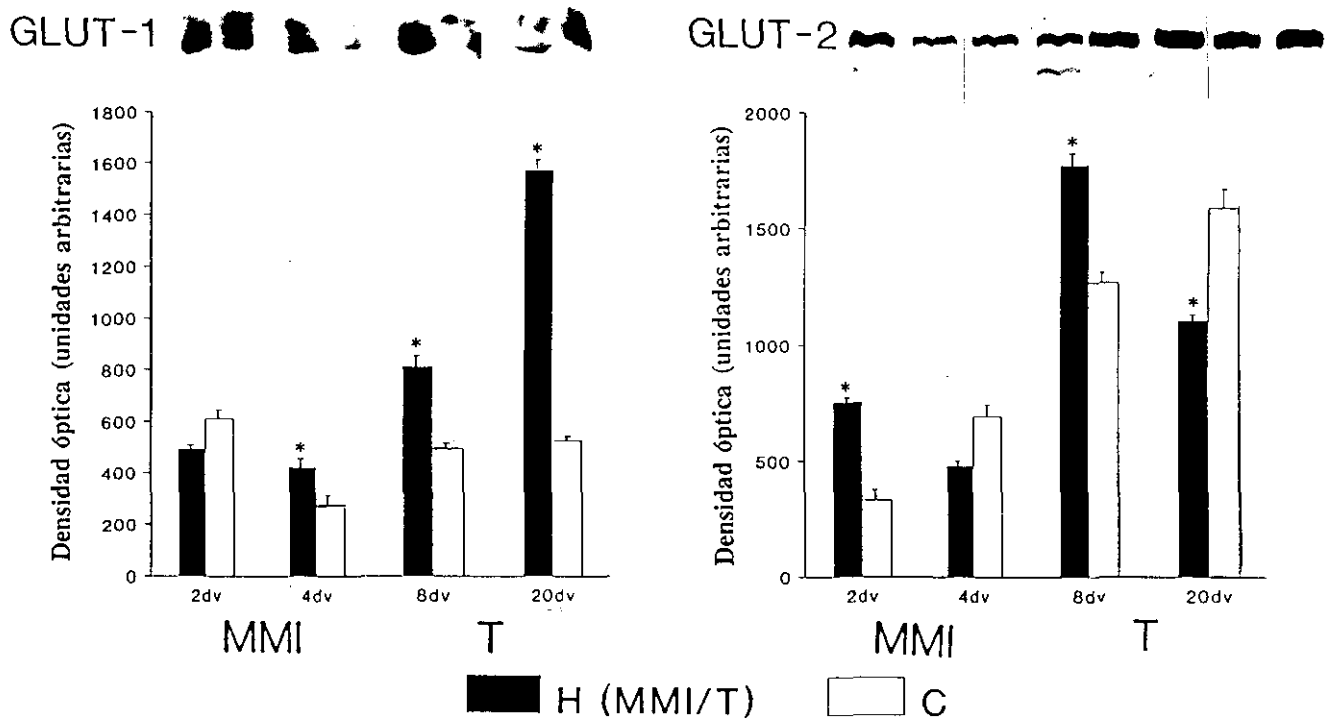
A**CORAZON****B****HIGADO**

Fig 46 Contenido de GLUT-1 y GLUT-4 en el corazón (A) y de GLUT-1 y GLUT-2 en hígado (B) de ratas hipotiroideas (MMI y T) y controles (C) de 2, 4, 8 y 20 días. Se analizaron por "Western inmunoblot" 50 y 20µg de proteínas en el corazón para uno y otro transportador, y 12.5 y 25µg de proteínas en el hígado para uno y otro transportador, respectivamente. Se muestra la cuantificación densitométrica y el valor medio \pm DS de 4 análisis distintos. * Significación estadística respecto a la población control.

disrupción en el patrón de incremento de este transportador, al igual que sucedía con el GLUT-4 en el corazón.

3.7.7.3. Músculos esqueléticos: cuádriceps y gastrocnemius.

En las ratas tratadas con MMI, a los 2 días de vida, se encontró un aumento en los niveles de GLUT-1 respecto a la población control; este incremento fue estadísticamente significativo en el cuádriceps, pero no en el gastrocnemius (Figura 47). Sin embargo, a los 4 días de edad, el descenso en los valores de GLUT-1 de los animales hipotiroideos fue mayor en el gastrocnemius que en el cuádriceps. Finalmente, el contenido en GLUT-1, tanto en las membranas de cuádriceps como en las de gastrocnemius, aumentó a los 3 y 15 días después de la tiroidectomía (8 y 20 días de vida).

El GLUT-4 disminuyó en ambos músculos a los 4 días de vida en los animales hipotiroideos que fueron tratados con MMI (Figura 47). Por el contrario, a los 3 y 15 días después de la operación (8 y 20 días de edad) se encontró un aumento en el contenido de este transportador en la fracción membranosa de ambos tejidos para la población de ratas operadas.

No se encontró diferencia entre los niveles de GLUT-4 de los dos músculos esqueléticos entre las ratas hipotiroideas y control a los 2 días de vida.

3.7.8. Resumen de los resultados del estudio del hipotiroidismo en ratas neonatales.

Los resultados mostrados por estos animales neonatales fueron iguales a los ofrecidos por las ratas de 10, 15 y 20 días tratadas con MMI (2 y 4 días en este estudio) y tiroidectomizadas (8 y 20 días) (apartado 3.2.7.).

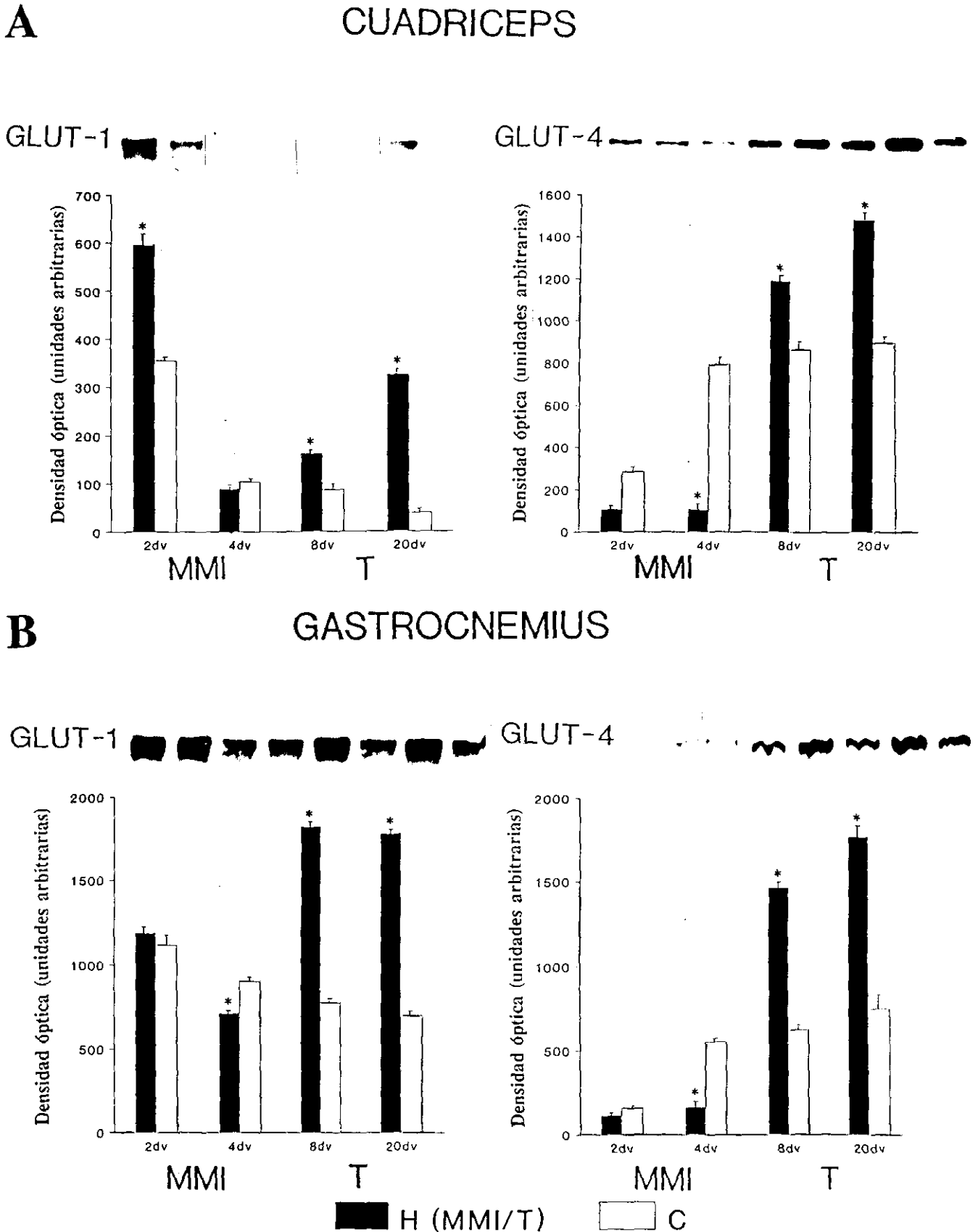


Fig 47 Análisis de los niveles de GLUT-1 y GLUT-4 en el cuadriceps (A) y gastrocnemius (B) de ratas hipotiroides (MMI y T) y controles (C) de 2, 4, 8 y 20 días. Se analizaron mediante "Western inmunoblot" 15 y 5µg de proteínas de uno y otro transportador, respectivamente. Se muestra la cuantificación densitométrica. Media ± DS de 4 análisis distintos. * Significación estadística respecto a la población control.

Cuadro 6.- Resumen de los resultados de los estudios del hipotiroidismo en ratas neonatales tratadas con MMI (MMI) y tiroidectomizadas (T) respecto a la población control.

| | MMI | T |
|--------------------|-----|---|
| GLUCEMIA | = | ↓ |
| INSULINEMIA | ↓ | ↑ |
| GH CIRCULANTE | ↓ | ↑ |
| GH HIPOFISARIA | ↓ | ↑ |
| IGF-I CIRCULANTE | ↓ | ↑ |
| ARNm IGF-I | ↓ | ↑ |
| IGF-II CIRCULANTE | ↑ | ↑ |
| ARNm IGF-II | ↑ | ↑ |
| IGFBP-1 CIRCULANTE | ↓ | ↑ |
| ARNm IGFBP-1 | ↓ | ↑ |
| IGFBP-2 CIRCULANTE | ↑ | ↑ |
| ARNm IGFBP-2 | ↑ | ↑ |
| IGFBP-3 CIRCULANTE | ↓ | ↓ |
| ARNm IGFBP-3 | ↓ | ↓ |

3.7.9. Resumen de los resultados de las variaciones de los transportadores de glucosa (GLUTs) en ratas hipotiroideas neonatales.

El hipotiroidismo aumenta en todas las etapas el GLUT-1 por encima de los controles y baja el GLUT-4 de una forma clara en corazón. En los músculos esqueléticos parece haber un aumento de GLUT-4 cuando la insulina está alta y disminución cuando está baja, y el GLUT-1 tiende a aumentar con el hipotiroidismo. En el hígado, el GLUT-1 tiende a aumentar en el hipotiroidismo. El GLUT-4 parece aumentar y disminuir con la insulina e IGF-I.

DISCUSSION

4. DISCUSION.

4.1. ESTUDIO DE LAS ALTERACIONES DEL AXIS IGFs/IGFBPs EN SITUACIONES DE HIPOTIROIDISMO DESDE LA ETAPA NEONATAL A LA ADULTA.

En la actualidad, hay un número creciente de datos que sugieren que las hormonas tiroideas están íntimamente involucradas en la regulación del axis GH/IGF a varios niveles. A pesar de que las hormonas tiroideas ejercen acciones sobre la pituitaria, bien alterando el número de células somatotropas (Kitauchi, 1998), bien influyendo sobre la expresión del gen de GH (Evans, 1982), todos los efectos de las hormonas tiroideas sobre el sistema IGFs/IGFBPs no parecen estar mediados por la GH (Gaspard, 1978; Ikeda, 1989; Nanto-Salonen, 1993). En realidad, la hormona de crecimiento, y no la insulina, ha sido el objetivo de la mayoría de los estudios, dado que se consideraba como el posible mediador de los efectos de las hormonas tiroideas sobre el sistema IGF/IGFBP (Burstein, 1979; Nanto-Salonen, 1993; Miell, 1994), a pesar de que la T₃ y la T₄ afectan a la mayoría de los aspectos del metabolismo modificando muchas hormonas como la insulina y las catecolaminas (Azam, 1990), y aunque también la secreción de los IGFs está regulada por el estado nutricional y metabólico (Straus, 1994; Thissen, 1994). En este estudio, las ratas se tiroidectomizaron para conseguir una reducción máxima de los niveles de hormonas tiroideas y, además, para prevenir los distintos efectos sobre la insulinemia motivados por las drogas bociógenas (Jolín, 1970; Jolín, 1974). Los resultados que se desprenden de este estudio, obtenidos pocos días después de la tiroidectomía, muestran los efectos a corto plazo de unos niveles de hormonas tiroideas extremadamente reducidos sobre diferentes parámetros, analizados desde la etapa neonatal a la adulta, y señalan el hecho de que los efectos de la función tiroidea sobre el sistema IGFs/IGFBPs dependen de la etapa de desarrollo del animal, como previamente habían mostrado otros modelos experimentales (Gallo, 1991; Nanto-Salonen, 1992).

4.1.1. Niveles de IGFs en suero y expresión de su ARNm en hígado en animales neonatales hipotiroideos.

El peso corporal disminuyó en las tres poblaciones hipotiroideas (neonatal, destetada y adulta) y los valores de hormonas tiroideas fueron muy bajos a los 5 días después de la tiroidectomía, de acuerdo con estudios previos realizados por Coiro y

col. (1979) y Walker y Dussault (1980). Las ratas destetadas, y más claramente las adultas, mostraron un descenso del peso corporal acompañado de una disminución de las hormonas tiroideas y GH circulantes, así como del contenido hipofisario de hormona de crecimiento, y por el contrario, en las ratas neonatales tiroidectomizadas, el descenso del peso corporal no se acompañó de una reducción en los niveles plasmáticos de GH o séricos de IGF-I; por tanto, estos resultados apoyaron el papel crucial de las hormonas tiroideas en la regulación del crecimiento durante los estadios inmaduros del desarrollo, como previamente se había descrito en ratas neonatales hipofisectomizadas (Glasscock, 1992), y en contraste con la eficacia limitada de la T₄ para favorecer el crecimiento en ratas adultas hipofisectomizadas (Glasscock, 1981). En las ratas destetadas, se encontró un descenso en los niveles de GH circulante e hipofisaria a los 15 días después de la tiroidectomía de acuerdo con otros autores que previamente habían mostrado un descenso a los 10 días después de la operación (Coiro, 1979); sin embargo, en las ratas adultas, se encontró una reducción en los valores hipofisarios y plasmáticos de GH ya a los 5 días después de la tiroidectomía. Una posible explicación para esta diferencia es el hecho de que el mecanismo regulador hipotalámico para la liberación de GH de la pituitaria se está desarrollando durante el periodo neonatal en la rata (Kitauchi, 1998) y probablemente, la falta de sensibilidad a las hormonas tiroideas en la hipófisis para la síntesis de GH madura durante el periodo neonatal y está ya plenamente establecida en la etapa adulta. Glydon y col. (1957) demostraron que el plexo primario de la eminencia media no se forma en la rata hasta el quinto día de vida postnatal, y que la concentración de somatostatina aumenta durante el periodo neonatal hasta alcanzar un pico a los 28 días de edad. Esta inmadurez del sistema endocrino podría explicar el hecho de que los neonatos de 10 días (5 días después de la tiroidectomía) mostraran un aumento inesperado, que se mantiene hasta los 20 días (15 días después de la operación), en los niveles de GH plasmática e hipofisaria y de insulina, en contra de lo que se observó en los adultos. Para confirmar las diferencias encontradas entre neonatos y adultos, fue necesario llevar a cabo un estudio de ratas neonatales tratadas con MMI, que se discutirá más adelante.

Se encontró un paralelismo entre los niveles plasmáticos de GH e insulina en todas las poblaciones, ambos parámetros aumentaron en las ratas neonatales tiroidectomizadas, mientras que disminuyeron en los animales destetados a los 15 días

después de la tiroidectomía, y en los adultos, en todos los estadios. Así pues, insulina y GH modificaron los valores en la misma dirección en todos los grupos hipotiroideos, lo que está de acuerdo con el hecho de que bajos niveles de hormonas tiroideas en animales adultos disminuyen los valores plasmáticos de GH e insulina (Montes, 1977; Bedo, 1991), y además, la diabetes, en adultos, se caracteriza por un efecto inhibitorio sobre la secreción de GH, mientras que el tratamiento con insulina normaliza los niveles plasmáticos e hipofisarios de GH (González, 1985; Robinson, 1987). Además, el paralelismo en el cambio de los niveles circulantes de insulina y GH, así como las concentraciones de GH hipofisaria observadas en este estudio, apoyaron la validez de las variaciones plasmáticas de GH obtenidas en una sola toma de muestra, dado que es bien sabido que la secreción de GH es episódica y sigue un ritmo circadiano (Tannebaum, 1976). No obstante, el mecanismo por el que las hormonas tiroideas contribuyen a la regulación de la homeostasis de la glucosa y la insulina es complejo (Lenzen, 1984). El hipotiroidismo experimental se acompaña de niveles de insulina basal normales, aumentados o disminuidos (Lenzen, 1984), y las variaciones se pueden explicar por diferentes mecanismos de adaptación metabólica a la falta de hormonas tiroideas, dependiendo del estadio de desarrollo, dado que la somatostatina aumenta durante el periodo neonatal (Walker, 1977) e inhibe la secreción de insulina (Alberti, 1973). Lenzen y col. (1976) encontraron un aumento en la secreción de insulina de los islotes pancreáticos en las ratas después de la tiroidectomía, como mostraron nuestros resultados para los animales neonatales, pero otros autores han descrito un descenso de la sensibilidad a la insulina en situaciones de hipotiroidismo (Morovat, 1998). Con el fin de evaluar si el incremento de la GH y la insulina en las ratas neonatales podría ser explicado simplemente por la inmadurez del animal, o si está involucrada la ausencia de glándula tiroidea en esta adaptación, se estudió una población de ratas neonatales tratadas con MMI (hipotiroideas-MMI) en las mismas etapas que los animales tiroidectomizados.

Las ratas hipotiroideas tratadas con MMI mostraron unos bajos niveles de hormonas tiroideas, junto con unos niveles plasmáticos e hipofisarios de GH disminuidos, y una insulinemia también inferior a la de las ratas control. Estos resultados sugieren que, en etapas inmaduras de desarrollo del sistema hipotalámico, el desequilibrio provocado por la falta de glándula tiroidea aumenta los niveles plasmáticos de GH e insulina, y que los valores aumentados de insulina y GH, que

habíamos encontrado en los animales neonatales tiroidectomizados, no se deben a la inmadurez del animal, puesto que en los animales neonatales tratados con MMI la insulina *desciende*. La estimulación β -adrenérgica aumenta la concentración plasmática de insulina en los organismos eutiroideos (Okajima, 1978), y el tratamiento de las ratas con glucocorticoides aumenta la insulinemia basal (Aránguez, 1986); no obstante, el estudio de las consecuencias de las adaptaciones al stress quirúrgico bajo una situación de ausencia de hormonas tiroideas será objeto de investigaciones futuras. Además, el posible efecto de los bociógenos *per se* sobre la insulina plasmática (Jolín, 1970; Jolín, 1974) podría jugar un papel en la reducción de los niveles circulantes de esta hormona encontrada en las ratas tratadas con MMI.

En cualquier caso, el estudio comparativo de dos poblaciones neonatales en las que se provocó el hipotiroidismo por distintos medios, permitió encontrar diferencias claras entre ambos grupos: los neonatos tiroidectomizados mostraron un aumento en los niveles séricos y de expresión del ARNm hepático de IGF-I en presencia de unos niveles plasmáticos de insulina altos y, por el contrario, se encontró una reducción en los tres parámetros anteriores para el caso de las ratas hipotiroideas tratadas con MMI. Aunque en los animales hipotiroideos tratados con MMI ya se había descrito una reducción del IGF-I (Gallo, 1991; Nanto-Salonen, 1991; Nanto-Salonen, 1993), nunca se habían determinado los niveles de insulina, ni se había calculado la correlación existente entre esta hormona y el IGF-I en estas condiciones.

La correlación alta y positiva encontrada entre los niveles circulantes de insulina e IGF-I en la etapa neonatal se confirmó por el análisis de regresión lineal, donde además, se mostró una correlación pobre entre los valores plasmáticos de GH y los séricos de IGF-I (Figura 10). Se halló una correlación positiva igualmente alta entre insulina e IGF-I en las ratas hipotiroideas tratadas con MMI, lo que apoyó resultados previos de nuestro grupo y otros autores que parecían indicar que el balance insulina/nutrientes, más que la GH, regulaba la secreción del IGF-I en estadios inmaduros del desarrollo (Johnson, 1989; Böni-Schnetzler, 1991; Rivero, 1995; Goya, 1996).

Por otro lado, tanto la tiroidectomía como el tratamiento con MMI alteró el perfil normal de descenso progresivo del IGF-II asociado a la edad mostrado por las ratas control (Donovan, 1989). Las diferencias encontradas en la regulación de IGF-II

entre los dos grupos de animales neonatales hipotiroideos se pueden explicar por el efecto regulador de la glucemia sobre el IGF-II que había sido sugerido en periodos inmaduros (Rivero, 1995; Goya, en evaluación en *J. Biol. Chem.*), dado que los niveles de glucosa en sangre estaban disminuidos en las ratas tiroidectomizadas, pero no en las tratadas con MMI.

4.1.2. IGFs en animales destetados y adultos tiroidectomizados.

En este estudio, las ratas hipotiroideas destetadas y adultas mostraron unos valores séricos y de expresión del ARNm hepático de IGF-I disminuidos en todos los estadios, junto con un descenso de los niveles de GH e insulina de acuerdo con lo que se había descrito previamente (Rodríguez-Arno, 1993b).

Los análisis de regresión lineal en estos estadios, destetado y adulto, mostraron una correlación alta y positiva entre los niveles plasmáticos de GH y los séricos de IGF-I, aunque dicha correlación fue pobre para la insulina. En cualquier caso, el descenso de los niveles de la GH hipofisaria y plasmática y de la insulinemia tras la tiroidectomía fue más rápido en la etapa adulta que en la destetada, lo que sugiere que las ratas destetadas constituyen una etapa intermedia en el desarrollo del sistema regulador entre la inmadurez, periodo neonatal, y el estado adulto. Todos estos resultados llevan a la conclusión de que los efectos de las hormonas tiroideas sobre la secreción de los IGFs dependen de la edad, como se había sugerido previamente para las IGFbps (Nanto-Salonen, 1992). Esta dependencia de la edad parece estar causada no sólo por la inmadurez del sistema endocrino para la adaptación, sino también por un mecanismo regulatorio distinto entre ambos estadios. Parece que la mediadora de los efectos de las hormonas tiroideas sobre la secreción de IGFs en etapas inmaduras es la insulina, pasando luego a ser la GH en etapa adulta. Sin embargo, para confirmar nuestra hipótesis y excluir el posible papel regulador de la GH, que cambiaba en igual sentido que la insulina, se bloqueó la secreción de la insulina en las ratas neonatales tiroidectomizadas mediante la administración de STZ, y las ratas destetadas y adultas operadas se trataron con insulina.

4.1.3. IGFs en animales tiroidectomizados neonatales tratados con estreptozotocina (STZ) y en destetados y adultos tratados con insulina.

Los animales neonatales tiroidectomizados tratados con STZ, como se esperaba, presentaron unos niveles bajos de insulina 5 días después de iniciar el

tratamiento (20 días), pero las cifras de GH en plasma se mantuvieron en unos valores similares a las ratas control, y su contenido hipofisario comenzó a disminuir como sucedía en las situaciones de diabetes en la rata (Montes, 1977; Giustina, 1994). En estas condiciones (hormonas tiroideas disminuidas, niveles plasmáticos de GH elevados y reducidos de insulina), se encontró un descenso en los valores de IGF-I, que ya había sido descrito en nuestro laboratorio en trabajos realizados con ratas diabéticas (Rivero, 1995; Goya, 1996), y se mostró la existencia de una correlación positiva entre insulina e IGF-I ($r = 0.98$, $p < 0.05$). En cualquier caso, el tratamiento con STZ causó un aumento en los niveles séricos y en la expresión del ARN de IGF-II en los neonatos tiroidectomizados, lo que sugiere, como previamente se ha mencionado para los neonatos tratados con MMI, el papel regulador de la glucemia sobre el IGF-II. De hecho, Goya y col. (en evaluación en J. Biol. Chem.), de nuestro propio grupo, han demostrado mediante estudios *in vitro* con hepatocitos fetales de rata que la glucosa ejerce un doble efecto sobre la expresión del gen de este factor de crecimiento, dado que induce su transcripción e incrementa la estabilidad del ARNm, y además, el hipotiroidismo parece retrasar la aparición del cambio de la expresión de las formas fetales de los IGFs a las adultas (Gallo, 1991).

Por otro lado, la administración de insulina aumentó el peso corporal de las ratas destetadas y adultas tiroidectomizadas respecto a los animales operados, dado que la hiperinsulinemia se acompaña de un aumento de las necesidades energéticas (Melian, 1997). Sin embargo, no altera los niveles de GH, lo que sugiere la necesidad de un tratamiento de mayor duración o de dosis superiores de dicha hormona para aumentar los niveles circulantes de GH (Ortiz-Caro, 1984).

4.1.4. Consideraciones finales del estudio de las variaciones de los IGFs.

Los datos presentados sugieren que la insulina, y no la GH, media los efectos de las hormonas tiroideas sobre la secreción del IGF-I en la etapa neonatal del desarrollo; en cualquier caso, dado que en el estado adulto el sistema neuroendocrino ha madurado y se han establecido las conexiones, la GH media los efectos tiroideos sobre la secreción del IGF-I. La regulación del sistema hormona tiroidea/IGF es compleja, pero se clarificará en la segunda parte de este trabajo por el estudio de las IGFbps en estas poblaciones y por los experimentos de rehabilitación de hipotiroidismo mediante la administración de T_4 .

Pensamos que el papel de la insulina, que ha sido olvidado, debería ser

considerado en los estudios de las relaciones entre la función tiroidea e IGF-I en las etapas inmaduras del desarrollo. El papel preciso de la insulina en el organismo adulto, cuando la regulación del IGF-I por la GH está totalmente establecida, será objeto de investigaciones futuras, ya que el equilibrio insulina/nutrientes parece interar de forma sutil con la GH en adulto sobre la regulación del axis IGFs/IGFBPs (Goya, en prensa en Life Sci.).

4.1.5. IGFBPs: niveles séricos y expresión del ARNm hepático en animales hipotiroideos neonatales.

En el suero, las IGFBPs juegan un importante papel en la regulación de las acciones de los IGFs en situaciones fisiológicas y patológicas (Rajaram, 1997), así algunos estudios sobre la regulación de estas proteínas transportadoras han mostrado que, en dichas situaciones, algunas hormonas pueden influir sobre los niveles séricos de una o varias IGFBPs (Jones, 1995; Rajaram, 1997). Además, se sabe que la regulación del axis IGFs/IGFBPs depende del estado nutricional (Clemmons, 1991; Thissen, 1994), con lo que la influencia de las hormonas tiroideas, que afectan a todos los aspectos del metabolismo, sobre dicho axis será compleja.

Las hormonas tiroideas, al igual que los IGFs (IGF-I y II), juegan un papel fundamental en el inicio y el mantenimiento del crecimiento somático en los mamíferos, y las IGFBPs modulan la actividad biológica de los IGFs (Rechler, 1993; Jones, 1995; Rajaram, 1997). Anteriormente, y en las tres poblaciones de ratas (neonatal, destetada y adulta), se han estudiado las variaciones de los IGFs y su expresión del ARN hepático, y se ha establecido el papel de la insulina como mediadora de los efectos de las hormonas tiroideas sobre la secreción de los IGFs en etapas inmaduras, pasando a depender en el adulto dichos efectos de la GH. Las variaciones séricas de las IGFBPs se han estudiado en situaciones de alteración nutritiva (Straus, 1994; Thissen, 1994), y también se han descrito variaciones diurnas, sobre todo para IGFBP-1 (Baxter, 1987), lo que está relacionado con la ingesta, dado que el estado metabólico de un individuo se refleja en el nivel de insulina, el cual, como se ha descrito, regula la secreción de IGFBP-1 (Lewitt, 1994; Baxter, 1995).

Las variaciones de la glucosa, insulina, GH, T₃, T₄ e IGF-I circulantes, así como el contenido de GH en hipófisis y el peso corporal, respecto a los animales neonatales, destetados y adultos eutiroideos, pueden verse en las Tablas 4, 5 y 6,

respectivamente. Las ratas neonatales presentaron dos situaciones diferentes en cuanto a los valores de insulina, GH e IGF-I circulante, puesto que estos niveles fueron superiores a los de los animales control en la población tiroidectomizada, e inferiores en la tratada con MMI, tanto a 10 y 15 como a 20 días de vida (5, 10 y 15 días después de la tiroidectomía en la primera población). Sin embargo, el peso corporal y las hormonas tiroideas séricas disminuyeron en ambos grupos de animales respecto a los controles. Estas diferentes variaciones encontradas para las dos poblaciones neonatales hipotiroideas, en cuanto a los niveles plasmáticos de insulina y GH, sugieren que en etapas inmaduras del sistema hipotalámico, el desequilibrio causado por la extirpación del tiroides aumenta las concentraciones circulantes de insulina y GH, quizás por una estimulación adrenérgica (Okajima, 1978) o por los glucocorticoides (Aránguez, 1986); también alerta sobre el posible efecto de los bociógenos *per se* sobre la insulinemia (Jolín, 1970; Jolín, 1974), que podrían jugar un papel en el descenso de los niveles de la insulina circulante en la población tratada con MMI. Sin embargo, ello permitió estudiar, como se hizo con los IGFs, las variaciones en la secreción de las IGFBPs en dos poblaciones de ratas hipotiroideas que presentaron un cuadro metabólico diferente.

4.1.5.1. IGFBPs en los animales neonatales hipotiroideos y tratados con STZ.

En estas condiciones, las poblaciones hipotiroideas (tratada con MMI y tiroidectomizada) presentaron, en el suero, unos niveles altos para el complejo de 30kDa (IGFBP-1 y 2) y bajos, para el de 45kDa (IGFBP-3). Sin embargo, este aumento fue mayor en los animales tratados con el fármaco bociógeno que en los tiroidectomizados (Figura 11), y tanto el análisis de los niveles circulantes por "Western immunoblot" como el de los transcritos hepáticos, parecieron mostrar que dicho incremento en los valores del complejo de 30kDa fue debido a la IGFBP-2 en las ratas tratadas con MMI, de acuerdo con lo observado por otros autores (Nanto-Salonen, 1991; Nanto-Salonen, 1992; Nanto-Salonen, 1993; Rodríguez-Arno, 1994). Sin embargo, nuestros resultados encontrados para las ratas neonatales tiroidectomizadas parecieron mostrar que el aumento de IGFBP-2 no era debido a la deprivación de las hormonas tiroideas circulantes directamente, como se había pensado, ya que en ambas poblaciones neonatales los niveles de T_3 y T_4 están muy bajos con respecto a la control (Tabla 4) y no aumenta tanto IGFBP-2 en la población

tiroidectomizada como en la que fue tratada con el bociógeno; quizás, en la población hipotiroidea tratada con MMI el aumento de IGFBP-2 es debido a una situación de diabetes (baja insulina y glucosa igual que controles, Tabla 4), ya que se ha establecido que la IGFBP-2 aumenta durante los estados de diabetes suave (Ooi, 1990; Bereket, 1995; Strasser-Vogel, 1995), y también se ha visto que IGFBP-2 se regula de manera inversa por la insulina y que el tratamiento con insulina normaliza sus niveles (Lewitt, 1994).

Se ha establecido que la insulina está involucrada en la regulación de los niveles séricos de IGFBP-1 (Holly, 1988; Lewitt, 1994), y que los valores de esta proteína transportadora varían por la ingesta de alimentos (Yeoh, 1988), descendiendo después de la comida por el efecto directo de la insulina. Sin embargo, en las ratas tiroidectomizadas, que presentaron altos niveles de insulina circulante, IGFBP-1 aumentó, no descendió, tanto a nivel circulante como de su ARN en hígado, frente a los animales control, y en la población hipotiroidea tratada con MMI, que mostró una baja insulinemia, IGFBP-1 disminuyó, no aumentó, tanto en el suero como en su expresión hepática; ello se podría explicar porque en los niños, se ha visto que las alteraciones en los valores circulantes de IGFBP-1 no están ligadas a cambios en la secreción de insulina (Counts, 1992; Smith, 1995), sino que estarían reguladas por su estado metabólico global (Cotterill, 1988). No obstante, la dependencia inversa de la insulina sobre la secreción de IGFBP-1, ya descrita en pacientes diabéticos (Suikkari, 1988; Quin, 1994; Muñoz, 1996) y en estudios realizados con animales (Lewitt, 1994), sí se manifestó en la población neonatal tiroidectomizada después de recibir STZ. Además, el hecho de que los niveles circulantes y la expresión en hígado de esta proteína variaran del mismo modo resultó indicativo de que el efecto de la insulina sobre la producción de IGFBP-1 estuvo regulado a nivel transcripcional en el hígado (Pao, 1992).

Los altos valores circulantes de IGFBP-2 de estos animales neonatales tiroidectomizados tratados con STZ (Rajaram, 1997) se acompañaron de una expresión hepática disminuida, del mismo modo en que había sido mostrado en ratas neonatales diabéticas (Rivero, 1995). Esta discrepancia entre los niveles séricos y de ARNm de esta proteína ligadora evidenció un hecho que ya había sido descrito por otros autores, y es que la regulación de la expresión del gen de IGFBP-2 se realiza a nivel post-transcripcional (Ooi, 1992a).

Los niveles circulantes y la expresión del ARNm hepático de IGFBP-3, menos abundante en etapas inmaduras, disminuyeron en los animales hipotiroideos (tiroidectomizados y MMI) respecto a los controles, al igual que sucedía en las ratas subnutridas y diabéticas (Philipps, 1989; Donovan, 1991; Rivero, 1995; Goya, 1996). Estas variaciones de IGFBP-3 fueron análogas en ambas poblaciones hipotiroideas, tiroidectomizada y tratada con MMI, que presentaron niveles de insulina, GH e IGF-I aumentados y disminuidos, respectivamente, frente a las ratas control; ello pareció mostrar una independencia de la IGFBP-3 respecto a GH e IGF-I en estas etapas inmaduras, y de forma contraria a lo establecido en adultos (Rechler, 1993; Jones, 1995), lo que sugeriría una posible acción directa de la deprivación de hormonas tiroideas.

Por otro lado, los niveles de IGFBP-3 séricos disminuyeron en las ratas neonatales tiroidectomizadas tratadas con STZ respecto a los animales control, aunque su expresión en hígado, que era inferior a la de la población control, aumentó ligeramente respecto a los valores mostrados por las ratas tiroidectomizadas. Se ha postulado que el déficit de insulina aumenta la actividad proteasa de la IGFBP-3 (Rechler, 1998), y ello explicaría la disminución encontrada en los animales neonatales tratados con STZ.

4.1.5.2. Consideraciones finales del estudio de las variaciones de las IGFbps.

Creemos pues que estos resultados, en dos poblaciones neonatales hipotiroideas, ambas con niveles muy reducidos de hormonas tiroideas y diferentes cuadros metabólicos (niveles circulantes distintos de GH, insulina y glucosa), muestran que las variaciones del complejo de 30kDa (IGFBP-1 y 2), que es el más abundante en el periodo neonatal (Donovan, 1989; Rivero, 1995), parecen regidas no por una acción directa de la falta de hormonas tiroideas, sino por la repercusión que ello tiene en el estado metabólico del animal; por tanto, el aumento del complejo de 30kDa respecto a los valores control parece debido a IGFBP-1 y 2 en los animales tiroidectomizados y sólo a IGFBP-2 en los tratados con MMI. Todo ello además, pone de relieve la importancia de la insulina en la regulación del complejo de 30kDa en los animales neonatales, que ya fue puesta de manifiesto para la regulación de IGF-I. Por otra parte, en ambas poblaciones hipotiroideas neonatales (tiroidectomizadas y tratadas con MMI) existe un paralelismo entre los niveles

circulantes obtenidos para IGFBP-1 y 2 y su expresión del ARN hepático (Figuras 11, 12 y 13), sugiriendo una regulación transcripcional (Rodríguez-Arno, 1994). La regulación del complejo de 30kDa, en estas ratas, concuerda además con resultados realizados en tejidos fetales y adultos, que muestran que IGFBP-2 aumenta en situaciones de diabetes ligera, mientras que IGFBP-1 sólo se incrementa ante una insuficiencia severa, en la diabetes (Ooi, 1990), y sugiere un papel biológico específico para IGFBP-1 y 2.

Se destaca el hecho de que la variación de las IGFBPs en animales neonatales hipotiroideos coincide con las alteraciones encontradas en neonatos subnutridos, y las de los animales tratados con STZ en este trabajo coinciden con las de las ratas diabéticas (Philipps, 1989; Donovan, 1991; Rivero, 1995; Goya, 1996), lo cual resalta la importancia del estado metabólico del animal en sus regulaciones.

4.1.6. IGFBPs en animales destetados y adultos tiroidectomizados y tratados con insulina.

Las Tablas 5 y 6 muestran que las ratas hipotiroideas destetadas y adultas presentaban, respecto a los controles, unos niveles circulantes de insulina, GH e IGF-I disminuidos, junto con variaciones mínimas en la glucemia y muy bajas concentraciones de hormonas tiroideas. Así pues, los animales destetados y adultos tiroidectomizados mostraron un cuadro metabólico similar al que presentaron las ratas neonatales hipotiroideas tratadas con MMI; en estas condiciones, los niveles circulantes del complejo de 30kDa y la IGFBP-3 están disminuidos, pero el tratamiento con insulina de estos animales hipotiroideos restituyó los valores séricos de IGFBP-3 sólo a 37 días de vida, y aumentó ligeramente el complejo de 30kDa, aunque no se llegaron a alcanzar los niveles control en ninguna de las dos poblaciones, destetada y adulta. La expresión del ARN hepático de IGFBP-1 y 3 presentó unas variaciones paralelas a las mostradas por los niveles circulantes, lo que sugería la existencia de una regulación transcripcional (Ooi, 1990; Villafuerte, 1996; Villafuerte, 1997). Sin embargo, el ARN hepático de IGFBP-2 aumentó tanto en los animales destetados como los adultos, y los ensayos hechos por "Western immunoblot" pusieron de manifiesto también un incremento de dicha proteína, como sucedió con los neonatos hipotiroideos tratados con MMI, que presentaban un cuadro metabólico muy similar (Tabla 4); ello pareció mostrar de nuevo que, en dichas condiciones de diabetes ligera (Ooi, 1990), la IGFBP-2 también aumenta en adultos.

4.1.6.1. Consideraciones finales del estudio de las variaciones de las IGFbps en animales hipotiroideos.

Estos resultados muestran que existe una regulación diferente y específica para IGFBP-1, 2 y 3 en las ratas hipotiroideas para cualquier edad que se considere, y apoyan la conclusión (Nanto-Salonen, 1992) de que las consecuencias de la privación de hormonas tiroideas sobre la secreción de las IGFbps depende de la edad. En las ratas neonatales, las variaciones del complejo de 30kDa, sin embargo, parecen ser una consecuencia de las alteraciones del cuadro metabólico provocadas por el déficit de hormonas tiroideas, y no una acción específica directa de estas. También estos resultados sugieren que la IGFBP-2, en todos los periodos estudiados, parece tener un papel homeostático en cuadros que cursan con alteraciones metabólicas, como se había sugerido para la rata adulta durante estados catabólicos (Orlowski, 1990). Así mismo, se ratificó, por los resultados expuestos, el importante papel de las hormonas tiroideas como reguladoras del crecimiento en etapas inmaduras, no sólo por sus acciones específicas conocidas sobre el sistema nervioso central, sino por sus acciones metabólicas, sobre todo a través de las variaciones de los niveles de insulina que se producen y que parecen regir alteraciones en el complejo de 30kDa que modula la biodisponibilidad de los IGFs en estas etapas. De nuevo, como se describió en los animales subnutridos y diabéticos (Rivero, 1995; Goya, 1996), todo ello parece producirse en estas etapas inmaduras de forma independiente de GH, como se ha sugerido también en estudios con animales hipofisectomizados (Glasscock, 1991). Estos resultados, junto con los obtenidos para los IGFs, alertan además sobre la importancia de la vía de producción del hipotiroidismo para los estudios de la influencia de las hormonas tiroideas sobre la regulación del eje IGFs/IGFBPs.

4.2. ESTUDIO DE LAS ALTERACIONES DEL AXIS IGFs/IGFBPs EN SITUACIONES DE HIPOTIROIDISMO (TIROIDECTOMIA) DESDE LA ETAPA NEONATAL A LA ADULTA DESPUES DE LA REHABILITACION CON T₄.

El retraso del crecimiento es una de las primeras respuestas fisiológicas del hipotiroidismo, por ello todos los animales tiroidectomizados mostraron un menor peso corporal respecto a sus controles (Aláez, 1992a). No obstante, el tratamiento

con T₄ normalizó completamente el crecimiento mediante el implante de pellet, de acuerdo con lo que se ha descrito ampliamente en la bibliografía, que la administración de GH o T₄ restaura el crecimiento de las ratas tiroidectomizadas (Nanto-Salonen, 1992; Nanto-Salonen, 1993).

La administración de una dosis de 1.5µg/100g de peso de T₄ a estas ratas tiroidectomizadas no igualó los niveles de las hormonas tiroideas circulantes en estos animales a los de la población control. Las ratas neonatales tienen unos niveles en suero más elevados de hormonas tiroideas de forma fisiológica, por ello, probablemente, la dosis de T₄ utilizada (1.5µg/100g de peso) resultó insuficiente para la rehabilitación de los niveles de las hormonas tiroideas. No obstante, esta cantidad de tiroxina sí resultó adecuada para incrementar, incluso por encima de los valores control, los niveles plasmáticos e hipofisarios de GH, lo que evidenció la gran sensibilidad de la pituitaria de estos animales neonatales a la regulación por las hormonas tiroideas (Kim, 1993).

La tiroidectomía causó un incremento en la insulinemia de los animales neonatales, pero la administración de T₄ no disminuyó los niveles plasmáticos de esta hormona a los valores control, quizás porque la dosis de tiroxina administrada resultó insuficiente, ya que se había descrito con anterioridad que el tratamiento con T₃ de ratas hipotiroideas disminuye los niveles de insulina circulante (Azam, 1990).

Las hormonas tiroideas, como se ha mencionado en repetidas ocasiones, poseen una gran importancia en el crecimiento, y además, los niveles de GH son dependientes del estado tiroideo, de ahí que los animales destetados y adultos operados presentaran un menor peso corporal y niveles de GH circulante e hipofisaria disminuidos respecto a las ratas control. No obstante, la administración de T₄ produjo una normalización de los valores de hormonas tiroideas, junto con una recuperación del peso (Aláez, 1992a) de los animales destetados y adultos que pasó por un aumento en el contenido y los niveles circulantes de GH (Nanto-Salonen, 1991). Glasscock y col. (1991) han descrito una dependencia hormonal similar del crecimiento en ratas hipofisectomizadas, con una corrección completa del crecimiento por el tratamiento combinado de T₄ y GH, y una corrección sólo parcial con la administración de hormona de crecimiento. Además, se ha visto que el hipotiroidismo disminuye la secreción pituitaria de GH y sus niveles de ARNm, pero se normalizan tras el tratamiento con T₄ (Jones, 1990), y también se ha demostrado que la T₃

aumenta la transcripción del gen de GH (Martial, 1977).

Por otro lado, Hervás y col. (1975) demostraron que los efectos de las inyecciones de T_4 sobre el contenido hipofisario de GH de las ratas tiroidectomizadas se relacionaba cuantitativamente con la dosis de tiroxina empleada, dichos efectos se observaban más pronto con dosis altas de T_4 , y según el tiempo transcurrido desde la administración de la hormona; demostraron también que la concentración de GH en pituitaria aumentaba antes que sus valores circulantes. Así pues, no resulta extraño que el tratamiento llevado a cabo durante 10 días, en ratas destetadas y adultas, mostrara niveles más cercanos a los presentados por los animales control, y lo mismo sucedió con el contenido hipofisario de GH en ratas adultas rehabilitadas. De nuevo, se debe destacar el hecho de que las ratas destetadas mostraran un comportamiento intermedio entre la etapa neonatal y la adulta, puesto que al igual que las primeras, presentaron, tras el tratamiento con T_4 , unos niveles de GH circulantes superiores a los de sus respectivos controles. Además, la normalización de los niveles de las hormonas tiroideas en los animales adultos se acompañó de un aumento gradual en los valores plasmáticos de GH e insulina, mientras que en el caso de las ratas destetadas, el tratamiento con tiroxina, que causó un fuerte incremento en los niveles séricos de T_3 y T_4 , produjo un aumento rápido y brusco en las cifras circulantes de GH e insulina. Se encontró un paralelismo entre los niveles plasmáticos de GH e insulina ya descrito con anterioridad (Montes, 1977; Bedo, 1991) en todas las poblaciones estudiadas.

Se debe destacar el hecho de que el tratamiento hormonal llevado a cabo mediante pellets, que constituye una pauta de administración más continuada y fisiológica que la inyección, ofrezca una normalización de los valores para estos parámetros endocrinos basales, dato que se deberá tener en cuenta para futuros estudios. Así pues, esta restitución de los parámetros endocrinos después de la rehabilitación con T_4 de los animales destetados y adultos tiroidectomizados (Tabla 9) estuvo de acuerdo con lo esperado según los resultados anteriormente establecidos en la literatura científica.

4.2.1. IGFs e IGFbps en neonatos.

El tratamiento con T_4 disminuyó los niveles séricos de IGF-I y II en los neonatos tiroidectomizados, aunque la expresión hepática del ARNm permaneció elevada para ambos factores respecto a las ratas control, como sucedía en la

población tiroidectomizada antes del tratamiento. Sólo se igualó la cantidad de los transcritos de IGF-II a los animales control cuando las ratas fueron tratadas con el pellet. Este hecho pareció sugerir una vez más que, en la población neonatal, la alteración en los niveles de IGF-I asociada al hipotiroidismo no era secundaria a la secreción de GH, ya que las dosis de T_4 dadas restauraban por encima de los valores control los niveles de GH. Sin embargo, los niveles de insulina, aunque disminuyen con respecto a los animales no tratados, siguen altos respecto a los control; en dichas circunstancias, los valores circulantes de IGF-I se rehabilitan igual a los controles, pero no la expresión de IGF-I. Dicha rehabilitación parcial de IGF-I apunta a una acción directa de las hormonas tiroideas a través de la GH y al margen de la insulina, que sigue alta en los animales neonatales.

El descenso de IGF-II después de recibir tiroxina parece mostrar la capacidad de la hormona de acelerar el proceso de maduración de IGFs, ya que el IGF-II es el IGF abundante en periodo fetal, y ha sido descrito por otros autores, que el paso a valores circulantes altos de IGF-I (IGF del periodo adulto), parece regulado por las hormonas tiroideas (Gallo, 1991; Nanto-Salonen, 1993). También se muestra en los animales tiroidectomizados neonatales que la elevación de la glucemia juega un papel en la restauración del IGF-II, como se había descrito (Rivero, 1995).

En cualquier caso, la disminución de los niveles de insulina en los neonatos tiroidectomizados rehabilitados, respecto a los animales operados, parece jugar un papel en la restauración de los valores séricos de IGF-I; consecuentemente, las ratas neonatales sometidas al tratamiento con T_4 mostraron una correlación alta y positiva entre los niveles circulantes de insulina e IGF-I, aunque dicha correlación fue mayor cuando la administración de la T_4 se realizó por medio de pellet que por inyección. Por otro lado, el coeficiente de correlación fue pobre para la GH, pero no tan bajo como se encontraba en los animales tiroidectomizados sin rehabilitar, mostrando que en este caso, los valores altos de GH circulante parecen jugar un papel en la rehabilitación. De nuevo se repitió el hecho de que la correlación fue mejor al tratar a los animales con el pellet frente al otro tratamiento. Estos hechos apoyan una vez más que, a pesar de que el IGF-I parece regulado por la insulina en periodos inmaduros del desarrollo (Böni-Schnetzler, 1991; Rivero, 1995; Goya, 1996), la GH juega también un papel en determinadas circunstancias.

La rehabilitación con T_4 causó un descenso en las proteínas ligadoras de

30kDa (IGFBP-1 y 2) y un aumento en IGFBP-3 en neonatos, mientras aumentaron en destetadas y adultas ambas proteínas, es decir, se produce, en las tres poblaciones, una rehabilitación a nivel circulante de estas IGFBPs después del tratamiento con T₄.

La implantación del pellet de T₄ a animales neonatales tiroidectomizados se acompañó de una disminución en los valores séricos y de expresión del ARNm de las dos proteínas transportadoras del complejo de 30kDa; las variaciones fueron más pronunciadas en la transcripción que a nivel circulante.

La IGFBP-1 se encuentra regulada por la insulina (Baxter, 1995), sin embargo, y quizás debido a que los valores plasmáticos de esta hormona no se restauraron totalmente a los niveles control, la administración de T₄ no fue capaz de normalizar completamente la secreción y producción de esta proteína transportadora; de hecho, se ha descrito *in vitro* que la adición de la T₃ no afecta a la expresión de IGFBP-1 y 2, pero sí a la de IGFBP-4 (Demori, 1997). La normalización de IGFBP-2 muestra claramente la idoneidad del tratamiento con pellet para su recuperación.

La concentración sérica y de ARNm en hígado de IGFBP-3 aumentó con el tratamiento con T₄, si bien este incremento fue mayor en el caso de la administración por pellet que dando la inyección. Esta proteína de alto peso molecular está regulada fundamentalmente por la GH, por ello otros autores, al administrar hormona de crecimiento a las ratas hipotiroideas igualaron su nivel a los valores control (Nanto-Salonen, 1993).

Por otra parte, cabe destacar el hecho de que a pesar de que la rehabilitación de los IGFs y sus IGFBPs no fue muy buena en los animales neonatales tiroidectomizados, sobre todo para los IGFs, ello fue, sin duda, debido a la baja dosis de T₄ empleada en el experimento.

En todos los casos, se encontró un paralelismo entre las alteraciones de los niveles circulantes y de los transcritos hepáticos de estas IGFBPs, lo que sugería la existencia de una regulación a nivel transcripcional (Nanto-Salonen, 1992; Latimer, 1993).

4.2.2. IGFs e IGFBPs en destetados y adultos.

La tiroidectomía se asocia con unos bajos niveles circulantes y de expresión del ARN hepático de IGF-I (Rodríguez-Arno, 1993b), pero la administración de T₄ los aumenta (Chernausek, 1983; Nanto-Salonen, 1991), tal como sucede en nuestros resultados para animales destetados y adultos. Se ha demostrado también que el

estado tiroideo puede alterar la expresión del IGF-I en otros tejidos además del hígado: la T₃ aumenta los efectos de IGF-I en cultivos de osteoblastos (Schmid, 1992; Varga, 1994) y de células de Sertoli (Palmero, 1990). No obstante, el tratamiento con T₄ mostró unos resultados dispares: la administración de la hormona mediante la inyección rehabilitó sólo parcialmente los niveles de expresión y séricos de este factor de crecimiento (van Buul-Offers, 1994), aunque el pellet sí los normalizó, lo que parece indicar que la eficacia de la pauta hormonal depende no sólo de la dosis o la duración del tratamiento, sino también de la forma de administración o de la vía (Latimer, 1993). El paralelismo encontrado entre los niveles circulantes y los del ARN hepático del IGF-I en animales destetados y adultos tiroidectomizados y tratados con T₄ sugiere el hecho de que la regulación de las hormonas tiroideas sobre el IGF-I parece hacerse a nivel transcripcional (Wolf, 1989), siendo, en la etapa adulta, la GH, la hormona que actúa como mediadora principal de las hormonas tiroideas, y que es capaz de alterar la síntesis y/o estabilidad de los transcritos del ARN de IGF-I en el hígado de rata (Roberts, 1986). Consecuentemente, los análisis de regresión lineal en estos estadios, destetado y adulto, mostraron una correlación alta y positiva entre los niveles plasmáticos de GH y los séricos de IGF-I, y dicha correlación fue pobre para la insulina. En cualquier caso, en las ratas adultas, el coeficiente fue más alto cuando la administración se realizó con pellet frente a la inyección, y aumentó más cuanto mayor fue la duración del tratamiento, lo que parece indicar una vez más a la GH en la etapa adulta como mediadora de la acción de las hormonas tiroideas sobre la secreción de los IGFs (Kitauchi, 1998). En cuanto a las ratas destetadas, el coeficiente de correlación mejoró con el tratamiento por pellet respecto a la inyección.

La administración de T₄ a las ratas destetadas y adultas operadas causó un aumento en los niveles séricos de las dos proteínas del complejo de 30kDa y de la expresión hepática de IGFBP-1. La expresión del gen de esta proteína transportadora está regulada por la insulina (Ooi, 1990), y la insulina aumentó después del tratamiento; quizás, además, estos cambios en los niveles circulantes de IGFBP-1, probablemente, estarían relacionados con acciones directas de la T₄, al menos en parte, puesto que se ha visto que la T₃ es capaz de aumentar el ARNm y la secreción de esta proteína *in vivo* y en cultivos de células de hepatoma humano (Rodríguez-Arnao, 1993b; Miell, 1994). No obstante, estos cambios, en nuestro estudio, parecen

mediados por el aumento progresivo de insulina (Rivero, 1995; Goya, en prensa en *Life Sci.*).

La alta expresión del ARNm de IGFBP-2 se normalizó por el tratamiento con T_4 también en el suero, de acuerdo con Nanto-Salonen y col. (1992). Por otro lado, Nanto-Salonen y col. (1993) mostraron que la administración de GH a ratas hipotiroideas no afectaba a la expresión del gen de IGFBP-2, con lo que parecía que la regulación de esta proteína involucraba otros mecanismos, y entre ellos estarían las hormonas tiroideas (Nanto-Salonen, 1993); una evidencia de esta modulación de la IGFBP-2 por las hormonas tiroideas se ha mostrado en cultivos de osteoblastos, donde aumentaba la producción y secreción de esta proteína transportadora por la administración de T_3 (Schmid, 1992).

Las concentraciones sérica y de ARNm hepático de IGFBP-3, que disminuían después de la tiroidectomía, aumentaron después del tratamiento con T_4 , al igual que habían establecido otros autores (Nanto-Salonen, 1993). De nuevo, pareció estar claro que este efecto era debido a un aumento progresivo de la secreción de GH. Se ha descrito que la administración de GH a ratas hipotiroideas normalizaba los niveles de IGFBP-3 (Nanto-Salonen, 1993), lo que establece que la expresión de esta proteína ligadora está regulada por los niveles de GH.

El hecho de que los niveles circulantes y de ARNm en hígado de estas IGFbps varíen de forma paralela, sugirió la existencia de una regulación a nivel de la transcripción por parte de la T_4 , cosa que previamente había sido mostrada en los animales destetados y adultos por otros autores, y también en humanos (Latimer, 1993; Nanto-Salonen, 1992; ; Angervo, 1993b; Miell, 1994).

Finalmente, cabe destacar el hecho de que el efecto de la T_4 sobre los niveles de las IGFbps parece ser específico del órgano (Latimer, 1993). En nuestros resultados, la restauración en la expresión de estas proteínas varió dependiendo de la vía de administración empleada y de la duración del tratamiento, ofreciendo mejores resultados el tratamiento más largo y cuando la liberación de la tiroxina administrada fue continuada.

4.3. ESTUDIO DE LA REHABILITACION CON T_4 EN SITUACIONES DE DIABETES EN PERIODO NEONATAL Y ADULTO.

La diabetes causó un descenso del peso corporal (Maiter, 1989) que se

acompañó de una disminución en los niveles circulantes de insulina, T_3 , T_4 , GH, y de esta última hormona también a nivel hipofisario. Se ha descrito que esta enfermedad altera el axis hipotálamo-hipófisis-tiroideas; se produce una reducción en los niveles del TRH hipotalámico y plasmático (González, 1980; Aláez, 1992a) y de la TSH hipofisaria y circulante (Aláez, 1992a; Rodríguez, 1992), disminuye la velocidad de secreción de TSH, la respuesta de la TSH a la TRH (Pastor, 1983; Aláez, 1992a) a pesar de que el metabolismo periférico de la TSH es normal, y tienen lugar numerosos cambios estructurales en la glándula tiroidea (Tontis, 1990). Además, desciende la producción de hormonas tiroideas (Tontis, 1990; Rodríguez, 1992) y la desyodación de T_4 a T_3 en los tejidos periféricos (Ortiz-Caro, 1984; Aláez, en prensa en *Metabolism*; Calvo, 1997) y, como consecuencia de ello, se produce una disminución en la concentración de ambas yodotironinas en la mayoría de los tejidos (Aláez, 1992a; Ortiz-Caro, 1984). Todos estos cambios en el estado tiroideo se consideran como una respuesta adaptativa causada por la limitada disponibilidad de energía a nivel celular.

En la rata, la diabetes inducida por STZ se acompaña de un descenso en los niveles plasmáticos y el contenido hipofisario de GH (Rodríguez, 1992; Giustina, 1994; Flyvbjerg, 1995). Este defecto podría deberse a un aumento de la somatostatina hipotalámica, que motivaría una disminución en la velocidad de transcripción del gen de GH, aunque esto sólo no explicaría totalmente el descenso en los niveles de ARNm y de GH en pituitaria observado en la diabetes (Martial, 1977; Rodríguez, 1992). Se podría pensar, por tanto, que la administración de T_4 a estas ratas diabéticas normalizaría los niveles de la hormona de crecimiento circulantes e hipofisarios, así como su expresión en esta glándula, pero esto no es así, dado que Bedo y col. (1991) describieron que para conseguir una regulación normal del gen de la GH por las hormonas tiroideas es necesaria la insulina. Este hecho se comprueba en los animales diabéticos adultos de nuestro trabajo, en los cuales, las dosis de T_4 no aumentan la insulina y tampoco la GH a los valores control; sin embargo, no sucede lo mismo en los neonatos diabéticos de nuestro experimento, en los que el aumento de GH después de la administración de T_4 se produce sin un incremento en la insulina.

4.3.1. IGFs e IGFbPs: niveles séricos y expresión del ARNm hepático.

La diabetes se asocia con unos bajos niveles circulantes y de expresión del

ARN hepático de IGF-I (Ishii, 1994; Rivero, 1995). Sin embargo, esta enfermedad altera la expresión de este factor de crecimiento también en otros tejidos como riñón, músculo esquelético o glándulas adrenales (Luo, 1991; Bornfeldt, 1992; Ishii, 1994).

No se conoce totalmente la causa por la que disminuye la expresión del IGF-I en la diabetes, aunque parece depender de la interacción de varias hormonas, entre las que se incluyen la insulina y la GH (Miller, 1981). En esta enfermedad, se sabe que se produce una resistencia a la GH en el hígado de los animales (Maiter, 1989), pero también los efectos directos o indirectos de la insulina parecen ser necesarios para mantener los niveles normales del ARNm de IGF-I (Bornfeldt, 1992).

A pesar pues, de que el cuadro metabólico es totalmente distinto en una rata diabética y en una hipotiroidea, nosotros quisimos estudiar hasta qué punto la rehabilitación con hormona tiroidea del axis IGFs/IGFBPs guardaba o no paralelismo con lo que había ocurrido en la rehabilitación de los animales hipotiroideos. El hecho de que se encuentre un paralelismo entre los niveles circulantes y los del ARNm hepático de IGF-I sugiere que, en la rata diabética la expresión del gen de IGF-I se regula a nivel transcripcional, lo que estuvo de acuerdo con lo descrito por Adamo y col. (1991) y Pao y col. (1992).

Las ratas neonatales diabéticas que recibieron el tratamiento hormonal con T_4 aumentaron los niveles séricos y de expresión en hígado de IGF-I, aunque la administración de T_4 a los animales adultos no pareció tener ningún efecto sobre los valores séricos, de acuerdo con Ikeda y col. (1990), y de expresión en hígado de este factor de crecimiento. Sin embargo, la administración de insulina a niños diabéticos eleva los valores de IGF-I antes de incrementar los niveles de receptores de GH y sin aumentar las cifras de hormona de crecimiento, lo que sugeriría, en la diabetes, un efecto estimulador directo de la insulina sobre la producción hepática de IGF-I para las edades tempranas del desarrollo (Bereket, 1995). Sin embargo, en nuestro trabajo, obtenemos una restauración de IGF-I en los animales neonatales tratados con tiroxina sin un aumento de insulina, lo cual prueba que, en estas circunstancias, el aumento de IGF-I se ha producido por una acción directa de T_4 a través, probablemente, del aumento producido en la GH. En los animales adultos, cuya secreción de IGF-I y expresión de su ARNm hepático hemos demostrado que depende de los niveles de GH, es natural que las dosis dadas a nuestros animales diabéticos, que no aumentan la GH, no restauren tampoco los valores de IGF-I.

El modelo de diabetes por STZ mostró unos niveles circulantes de IGF-II disminuidos y una expresión en hígado aumentada respecto a las ratas control. Sin embargo, existen muy pocas referencias bibliográficas, y con resultados dispares, acerca de la regulación del IGF-II en situaciones como la diabetes; así, los distintos autores mostraron unos niveles de IGF-II elevados (Hall, 1989), no alterados o disminuidos (Merimée, 1984; Rivero, 1995). La administración de T₄ a los animales diabéticos no alteró los bajos niveles de IGF-II mostrados por las ratas no tratadas, y bajó su ARNm, de acuerdo con lo observado por Nanto-Salonen y col. (1993).

La diabetes disminuye las proteínas transportadoras de 30 y 45kDa, o sea IGFBP-1 y 2 e IGFBP-3. El estudio realizado mediante "Western inmunoblot" mostró que, en el periodo neonatal, la diabetes aumenta los niveles circulantes de IGFBP-1, y de IGFBP-2 de acuerdo con Ooi y col. (1990) y Unterman y col. (1990), e igual ocurre en el hombre (Quin, 1994; Bereket, 1995). Este aumento en la expresión de IGFBP-1 se debe a la regulación inversa descrita entre la insulina sobre IGFBP-1 (Baxter, 1995).

Las alteraciones en los valores séricos del complejo de 30kDa se acompañaron de unas modificaciones a nivel de la expresión en hígado en sentido inverso, es decir, se produjo un aumento en los valores de ARNm de IGFBP-1 y 2 tanto en las ratas neonatales como en las adultas (Ooi, 1990; Rivero, 1995), lo que sugiere que no se están regulando a nivel transcripcional. Sin embargo, convendría, en un futuro, revisar dicha aseveración repitiendo el "Western ligand blot" con una población diabética más amplia. Ooi y col. (1991) demostraron que el aumento en los niveles del ARNm de IGFBP-1 se debía a un incremento en la velocidad de transcripción del gen de esta proteína, y así mismo, en estados diabéticos, se ha descrito la magnitud y velocidad del descenso en la transcripción de IGFBP-1 después del tratamiento con insulina (Ooi, 1992b; Pao, 1992).

A pesar de que los niveles de ARNm de IGFBP-2 también aumentaban en el hígado de los animales diabéticos, no se ha encontrado un aumento en la transcripción del gen de esta proteína, por lo que se ha sugerido una regulación post-transcripcional (Tseng, 1992). No obstante, cabe destacar que la expresión de IGFBP-2 está regulada de manera específica y diferente en cada órgano en condiciones metabólicas anormales como la diabetes (Chen, 1994).

Los niveles de IGFBP-3 fueron inferiores a los controles en las ratas

diabéticas neonatales, adultas (Rivero, 1995; Rodgers, 1995) y en el hombre (Brismar, 1994; Bereket, 1995; Hanaire-Broutin, 1996). Estos bajos valores circulantes se asociaron a una disminución en la abundancia del ARNm de esta proteína (Rivero, 1995), todo lo cual está de acuerdo con nuestros resultados, y el tratamiento con T₄ no parece aumentar ni los valores circulantes de las IGFbps ni la expresión hepática de su ARNm a los controles, aunque su aumento con respecto a los animales diabéticos es evidente en nuestros resultados. Villafuerte y col. (1996) han demostrado en cultivos de hepatocitos que la insulina estimula la transcripción del gen de IGFbp-3, y que aumenta la liberación de la proteína, pero ello no lo hemos encontrado en nuestro trabajo. Así pues, la IGFbp-3 durante el periodo adulto, en la diabetes, disminuye tanto en suero como la expresión de su ARNm, y por tanto, parece regulada a nivel transcripcional. Además, recientemente se ha demostrado que en la diabetes se produce un aumento en actividad proteolítica de esta proteína (Fowlkes, 1997; Rechler, 1998), lo que explicaría también los bajos niveles de IGFbp-3 encontrados en los animales diabéticos.

Hay que remarcar pues, que los resultados obtenidos con animales diabéticos neonatales y adultos, muestran una disminución de IGF-I y de IGF-II en suero en el periodo neonatal, y de IGF-I en periodo adulto, con reducción en ambos de su expresión hepática, y que ello se acompaña de una gran reducción de insulina y de GH circulante en adulto, y en neonato, tan solo de insulina, aunque, en ambos, bajan las hormonas tiroideas. Las dosis de T₄ restauran la GH circulante y pituitaria en neonatos pero no la insulina, y rehabilitan el IGF-I en suero, así como la expresión de su ARNm, cosa que no sucede en adulto, ya que la GH no aumenta, y por tanto, no se restauran los IGFs. Ello ratifica el papel de la GH como mediadora de las acciones de las hormonas tiroideas sobre la secreción de IGF-I en periodo adulto, y muestra que, en periodo neonatal, en circunstancias en las cuales la insulina está baja, como en los neonatos diabéticos tratados con T₄, las hormonas tiroideas consiguen rehabilitar los niveles de IGF-I a través de un aumento de GH (Mathews, 1986; Bichell, 1992). Estos datos, junto con los obtenidos en ratas neonatales hipotiroideas, parecen mostrar que en etapa neonatal, las hormonas tiroideas ejercen sus acciones sobre la secreción de IGF-I en primer lugar, a través de la insulina y sólo, en segundo término, cuando la insulina está bloqueada, diabetes con STZ, la mediadora pasa a ser la GH, sin embargo, es la GH siempre la mediadora en periodo adulto.

Estos resultados sobre animales diabéticos ratifican pues los obtenidos en ratas hipotiroideas tratadas con T_4 , ya que los animales hipotiroideos neonatales tratados con tiroxina también rehabilitan parcialmente el IGF-I con un aumento grande de GH.

Las IGFbps, tanto las de 30kDa como la IGFbp-3, parecen regularse según un estado metabólico muy complejo en la diabetes que se debería estudiar a más largo plazo, por lo cual se puede concluir poco de este estudio; tan solo se ve claramente, una vez más, que en situación de franca diabetes, la IGFbp-1 se regula de forma inversa a los niveles de insulina.

4.4. ESTUDIO DE LAS VARIACIONES DE LOS TRANSPORTADORES DE GLUCOSA (GLUTs) EN ANIMALES NEONATALES HIPOTIROIDEOS. POSIBLE CORRELACION ENTRE LAS ACCIONES DE LAS HORMONAS TIROIDEAS, GLUTs Y EL AXIS IGFs/IGFBPs.

Este estudio pretende establecer la posible existencia de una conexión, mediada por las hormonas tiroideas, entre el patrón ontogénico de cambio de los GLUTs y los IGFs. Se ha descrito que la transición del GLUT-1 (forma predominante en etapas inmaduras) al GLUT-4 (transportador típico de la edad adulta), en músculo y tejido adiposo, tiene lugar el día 4 de vida (Santalucía, 1992), y que las hormonas tiroideas parecen retrasar esta pauta ontogénica (Castelló, 1994). Por otro lado, también se sabe que el cambio en el predominio de la forma fetal de los IGFs (IGF-II) a la adulta (IGF-I) se produce en la segunda semana de desarrollo y que está influenciado por las hormonas tiroideas (Gallo, 1991; Nanto-Salonen, 1991; Nanto-Salonen, 1992); así pues, se decidió estudiar un modelo de hipotiroidismo a 2 y 4 días de vida (momento del cambio de los GLUTs) y a 8 y 20 días de edad (transición de los IGFs) para evaluar en él las posibles alteraciones en los cambios de estas proteínas (GLUTs e IGFs) y el papel que las hormonas tiroideas desempeñaban en dicha modificación de estas pautas.

El peso corporal y los niveles circulantes de hormonas tiroideas disminuyeron en los animales neonatales hipotiroideos, excepto a los 2 días de vida (Nanto-Salonen, 1991), aunque el descenso de estos parámetros fue más acusado en aquellos a los que se les practicó la tiroidectomía, población de 8 y 20 días, respecto a aquellos que recibieron el fármaco bociógeno, población de 2 y 4 días. Estos resultados ya se habían obtenido en aquellas poblaciones de animales neonatales, 10-20 días, que

fueron sometidas a la operación quirúrgica frente a las que recibieron el MMI en la primera parte de este trabajo; así pues, en este experimento vamos a poder hablar de dos grupos de animales hipotiroideos neonatales que van a presentar un comportamiento paralelo al de las dos poblaciones antes citadas: tratadas con el fármaco antitiroideo (MMI) y sacrificadas a 2 y 4 días y tiroidectomizadas, población sacrificada a 8 y 20 días. El hecho de que las ratas de 2 días no presenten un menor peso corporal puede estar motivado por los cambios hormonales del momento del nacimiento y también porque necesiten un periodo de latencia entre el comienzo de la administración del MMI y la manifestación de sus efectos (Flórez, 1992). No obstante, todos los neonatos hipotiroideos, incluidos los de 2 días de vida, presentaron una reducción en los niveles plasmáticos y el contenido hipofisario de GH, lo cual apoya el papel crucial de las hormonas tiroideas en la regulación de la síntesis de GH (Seo, 1981). Se encontró un descenso en la insulinemia de los animales de 4 días, y un aumento en las ratas neonatales sacrificadas a 8 y 20 días; todo ello concuerda totalmente con lo que obtuvimos en la primera parte del trabajo, y ratifica nuestros resultados anteriores.

4.4.1. IGFs e IGFbps: niveles séricos y expresión del ARNm hepático.

Se puso de manifiesto la existencia de un paralelismo entre los niveles circulantes de insulina e IGF-I, de modo que los neonatos tratados con MMI presentaron unos valores inferiores a los de sus controles, mientras que los animales tiroidectomizados mostraron unas cifras de ambos péptidos superiores a los de sus controles, de modo análogo a lo que se había descrito para las poblaciones neonatales (apartado 4.1).

Los animales de 2 días de vida, que recibieron MMI, mostraron un peso y unos niveles circulantes de hormonas tiroideas, insulina e IGF-I similares a los de las ratas control y una GH disminuida, lo que parece sugerir una vez más que, en las etapas inmaduras del desarrollo es la insulina, y no la GH, la hormona que regula la síntesis y secreción de los IGFs (Rivero, 1995; Goya, 1996), tal como se sugiere en la primera parte del trabajo.

Por otro lado, tanto la tiroidectomía como el tratamiento con MMI, aunque guardan el perfil normal de descenso progresivo de IGF-II asociado a la edad, sus valores estuvieron por encima de los controles (Latimer, 1993; Nanto-Salonen, 1993). La diferencia entre los dos grupos de ratas hipotiroideas, en cuanto a niveles de IGF-

II, se puede explicar por el efecto regulador de la glucemia sobre el IGF-II en periodos inmaduros (Rivero, 1995; Goya, 1998), dado que los niveles de glucosa en sangre disminuyen en los animales tiroidectomizados, aunque no en los tratados con el fármaco antitiroideo.

De nuevo se encontró una correlación alta y positiva entre los niveles circulantes de insulina e IGF-I, que se confirmó mediante el análisis de regresión lineal, que además, ratificó la existencia de una pobre correlación entre los valores plasmáticos de GH e IGF-I en estas poblaciones. Así pues, estos resultados corroboraron la importancia de la insulina, y no la GH, en la regulación de la secreción de IGF-I en estadios inmaduros de desarrollo (Böni-Schnetzler, 1991; Rivero, 1995; Goya, 1996).

En la rata, existe una secuencia de aparición de las IGFbps (Donovan, 1989; Rivero, 1995); en el periodo adulto, la mayor parte de los IGFs está presente en la circulación como un complejo proteico de 150kDa (ALS) que prolonga la semivida en el plasma de los IGFs y proporciona una reserva de dichos factores para los tejidos. Sin embargo, en etapas inmaduras, el complejo predominante (50kDa), ya no está formado por IGFbp-3 sino por IGFbp-1 y 2, que no son dependientes de la GH como la IGFbp-3 (Rivero, 1995; Goya, 1996). Estas proteínas, IGFbp-1 y 2, pueden ejercer acciones metabólicas independientes de los IGFs (Lewitt, 1991; Baxter, 1995; Rajaram, 1997).

El hipotiroidismo, como hemos visto a lo largo de este trabajo, altera los niveles de las IGFbps, y por tanto, la actividad biológica de los IGFs. También, como en otras ocasiones, tenemos dos grupos de animales neonatales: las ratas hipotiroideas de 2 y 4 días de vida, que muestran un comportamiento similar al de los neonatos tratados con MMI (descenso de los niveles de IGFbp-1 y 3, y aumento de los de IGFbp-2), y los animales tiroidectomizados sacrificados a 8 y 20 días de edad (desciende IGFbp-3 y aumentan IGFbp-1 y 2); al igual que sucedía en la primera parte del trabajo, y ello se produce también con un cuadro endocrino diferente: uno, que cursa con insulopenia y normoglucemia (animales tratados con MMI y sacrificados a 2 y 4 días), y otro, con altos niveles de insulina e hipoglucemia (ratas de 8 y 20 días tiroidectomizadas).

Sin embargo, los animales de 2 y 4 días tratados con MMI no mostraban los valores circulantes de 30kDa aumentados, sino disminuidos; ello es porque el cuadro

metabólico, niveles de insulina y GH, no coincide totalmente con los animales neonatales MMI de 10 días de la primera parte del trabajo. Sin embargo, sí se encuentra, por "Western immunoblot", los valores de IGFBP-1 disminuidos y los de IGFBP-2 aumentados. Los animales sacrificados a 8 y 20 días tiroidectomizados se comportan como los tiroidectomizados de la primera parte en cuanto a las concentraciones circulante y de ARNm de IGFBP-1 y 2, motivado por la regulación que ejerció la insulina sobre esas proteínas transportadoras (Baxter, 1995); es decir, encontramos resultados similares a los de la primera parte del trabajo en ambos grupos de animales neonatales tiroidectomizados en cuanto a IGFbps.

Las IGFbps de bajo peso molecular (IGFBP-1 y 2) disminuyeron conforme aumentaba la edad del animal en los controles. Los niveles de IGFBP-3 en suero y la expresión de su ARNm en hígado descendieron en el hipotiroidismo, lo cual es debido a los bajos niveles de GH registrados (Hervás, 1975).

4.4.2. GLUTs: niveles en membrana cruda de corazón, hígado, cuádriceps y gastrocnemius.

La regulación de los transportadores de glucosa por las hormonas tiroideas u otros factores es diferente en función del tejido de que se trate, e incluso, depende del transportador de glucosa considerado (Postic, 1993b). En el corazón, en los animales control, nuestros resultados muestran claramente el descenso en el contenido de GLUT-1 y el incremento de GLUT-4 asociado a la edad (Santalucía, 1992). El hipotiroidismo causó un descenso en el contenido de GLUT-4 y aumentó la cantidad de GLUT-1; otros autores han mostrado también estas mismas variaciones en la expresión de estos transportadores durante la etapa perinatal (Castelló, 1994). Se ha descrito un aumento dosis-dependiente de la expresión de GLUT-4 por el tratamiento con T₃ en cardiomiocitos procedentes de ratas adultas (Gosteli-Peter, 1996). Por tanto, parece claro que el déficit de hormonas tiroideas conduce a un desajuste del descenso de GLUT-1 que ocurre en la etapa perinatal, a la vez que disminuye el aumento en la cantidad de GLUT-4 típico del periodo adulto; se produce un retraso en el cambio del patrón ontogénico de expresión de los transportadores de glucosa.

El hígado juega un papel fundamental en la regulación de la homeostasis glucídica, y en él, el GLUT-2 está mayoritariamente situado en la membrana plasmática (Stephens, 1995) y el transporte de glucosa va a depender directamente de la cantidad de GLUT-2.

Nuestros resultados muestran claramente tres aspectos: 1) el GLUT-2 hepático se va incrementando a lo largo del desarrollo de acuerdo con Rubio y col. (1997) y Postic y col. (1994) en los controles; 2) el hipotiroidismo afecta al contenido hepático de este transportador de glucosa de acuerdo con Weinstein y col. (1994); 3) el GLUT-1 aumenta en hígado en los animales hipotiroideos respecto a los valores control. Luego parece, que en estos animales hipotiroideos, tanto en corazón como en hígado, se produce un retardo en la aparición de ambos transportadores. Sin embargo, es difícil e imposible con los datos actuales poder relacionar los niveles de IGF-I alterados en dichos animales y las variaciones encontradas en los transportadores de glucosa, realmente parecen procesos sin correlación entre ellos.

En los músculos esqueléticos (cuadriceps y gastrocnemius), al igual que en el corazón y todos los tejidos insulino-sensibles, se expresan dos isoformas de transportador: GLUT-4 y GLUT-1, siendo el primero el más abundante (80-90%) y responsable de más del 85% de la captación de glucosa estimulada por la insulina. Del mismo modo que en el corazón, pudimos observar en los animales control como durante la etapa neonatal, el transportador predominante era el GLUT-1, pero fue sustituido por el GLUT-4 conforme avanzaba la edad del animal (Santalucía, 1992).

La expresión de los transportadores del músculo esquelético está controlada por varios factores. Se había descrito que la administración de T_3 aumentaba la expresión del GLUT-4 en el músculo esquelético de las ratas adultas (Casla, 1990; Weinstein, 1991; Torrance, 1997a), e inducía la diferenciación de esas células *in vitro* (Shimokawa, 1997) y, se había demostrado que las hormonas tiroideas poseían una acción directa sobre la expresión de este transportador, puesto que el gen del GLUT-4 posee un elemento de respuesta a estas hormonas (Ezaki, 1997; Shimokawa, 1997). No obstante, también la insulina parecía tener un importante papel en este tejido y sobre este transportador, al igual que en el corazón (Fischer, 1997); bajo el efecto insulínico, una pequeña proporción de GLUT-1 intracelular se relocalizaba en la membrana plasmática en la fibra muscular (Napoli, 1995), aunque, el fenómeno tiene mucha más importancia para el GLUT-4, dado que la insulina puede aumentar su proporción en la superficie celular de 15 a 20 veces, en tanto que el GLUT-1 sólo incrementa de 3 a 5 veces (Camps, 1992; Gould, 1993). Además, estudios *in vitro* (miocitos L6) mostraron que el GLUT-1, frente al GLUT-4, era menos sensible a la regulación por glucosa que por la insulina (Koivisto, 1991).

La regulación de los transportadores de glucosa parece, por tanto, que se realiza con la participación de las hormonas tiroideas y de la insulina. Así pues, el hecho de que encontremos un incremento en la cantidad de GLUT-1 y GLUT-4 en las ratas tiroidectomizadas, que presentaron altos niveles de insulinemia, podría ser explicado por el fuerte efecto estimulante de esta hormona sobre el transportador. A los 4 días de vida se produjo un descenso en el contenido de los dos transportadores, puesto que disminuyeron los niveles de las dos hormonas estimulantes, hormonas tiroideas e insulina (Shetty, 1996). Por último, a los 2 días de edad, cuando los animales eran normoinsulinémicos y eutiroideos, sólo se produjo un aumento en el contenido de GLUT-1 en el cuadriceps (se encontró una tendencia análoga en el gastrocnemius) que podría ser debido a un retraso en el cambio del patrón ontogénico.

Se podría pensar que el aumento en los animales tiroidectomizados y sacrificados a 8 y 20 días de vida del GLUT-4 y GLUT-1, y el descenso del GLUT-4 a 2 y 4 días, podría estar propiciado por el aumento y descenso del IGF-I que, como él, va asociado a una variación paralela de la insulina, pero sin duda, es esta hormona la causante de los cambios en los transportadores. Por tanto, los datos estudiados de GLUT-1 y GLUT-4 en los animales hipotiroideos parecen mostrar que no existe una relación directa entre las variaciones de GLUTs y de IGFs en los animales tiroidectomizados, sino que ambas variaciones en periodo neonatal, dependen de los niveles de insulina alterados a su vez por la falta de hormonas tiroideas.

CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES.

Animales hipotiroideos neonatales, destetados y adultos.

Neonatales

1. La comparación de resultados de los parámetros estudiados muestra un cuadro metabólico distinto entre las dos poblaciones neonatales hipotiroideas estudiadas, según se produzca la deficiencia de hormonas tiroideas por tiroidectomía, o por tratamiento con MMI. GH e insulina están altas en los animales neonatales tiroidectomizados, y disminuidas en los tratados con MMI, la glucemia está disminuida en los tiroidectomizados e igual a los controles en los MMI. Con dicho cuadro metabólico, los animales tiroidectomizados aumentan su IGF-I circulante, mientras desciende en los tratados con MMI. La expresión de su ARNm hepático guarda un paralelismo con sus niveles en suero, sugiriendo una regulación transcripcional.

2. El IGF-II circulante parece regulado por la glucemia de forma positiva; disminuye en los animales tiroidectomizados y no se altera en los hipotiroideos-MMI. El estudio de la expresión de su ARNm sugiere una regulación transcripcional.

3. El análisis de correlación lineal de ambas poblaciones neonatales, entre valores plasmáticos de insulina e IGF-I, muestra una correlación positiva con coeficiente de correlación muy alto, $r=0.91$, mientras la correlación es muy baja para valores plasmáticos de GH.

4. El estudio de las proteínas ligadoras de IGFs muestra que el aumento encontrado del complejo de 30kDa (IGFBP-1 y 2) en los animales hipotiroideos neonatales es más grande en los hipotiroideos-MMI que en los tiroidectomizados, y tanto los resultados de "Western immunoblot", como la expresión de su ARNm hepático, parecen mostrar que ello se debe a un aumento de IGFBP-2, propiciado, sin duda, por el cuadro metabólico característico de los animales MMI. La IGFBP-1 no parece regularse en los animales neonatales de forma inversa a la insulina como ocurre en adultos. La IGFBP-3 disminuye en ambas poblaciones hipotiroideas neonatales y, como la IGFBP-2, parece sugerirse una regulación transcripcional.

5. Por último, los estudios realizados bloqueando la secreción de insulina con estreptozotocina (STZ), en los animales neonatales tiroidectomizados, ratifican la correlación positiva encontrada entre valores circulantes de insulina y de IGF-I, así como muestran que el IGF-II aumenta con la hiperglucemia, y en ambos, se sugiere una regulación transcripcional. En cuanto a las proteínas ligadoras, la IGFBP-3 no varía en plasma, y prácticamente tampoco la expresión de su ARNm. En este caso de clara diabetes, la IGFBP-1 aumenta al disminuir la insulina, y la IGFBP-2 vuelve a mostrar una sutil regulación según el cuadro metabólico del animal.

Destetados y adultos

6. Estos animales tiroidectomizados destetados y adultos muestran una disminución de IGF-I debida a la falta de hormonas tiroideas, y cuya causa parece ser la hormona de crecimiento disminuida. La regulación parece hacerse a nivel transcripcional.

7. El análisis de correlación lineal muestra una correlación alta entre niveles de GH y de IGF-I, y baja con la insulina.

8. En los animales tiroidectomizados, destetados y adultos, disminuye el complejo de 30kDa (IGFBP-1 y -2), y también la proteína ligadora IGFBP-3. Las dosis de insulina administradas a los hipotiroideos adultos no alteran los niveles de IGFs ni de las proteínas ligadoras.

9. Se concluye que el mediador de las acciones de las hormonas tiroideas sobre el axis IGFs/IGFBPs en periodo neonatal parece ser la insulina, pasando a ser la GH en periodo adulto.

Rehabilitación.

10. Los experimentos de rehabilitación con tiroxina, en periodo neonatal o en periodo adulto, muestran que la vía idónea de rehabilitación es el pellet, y no la inyección de tiroxina.

11. Los animales neonatales tratados con $1.5\mu\text{g}/100\text{g}$ de peso de T_4 durante 5 días no consiguen rehabilitar sus valores circulantes de IGF-I ni los de IGF-II. Tampoco consiguen rebajar a los valores control su insulina alta ni su GH plasmática, así como

la glucemia disminuida; todo ello porque tampoco rehabilitan, con la dosis utilizada, los niveles de las hormonas tiroideas.

12. Las proteínas transportadoras de 30kDa y de 45kDa se rehabilitan en la etapa neonatal con las dosis de T₄ empleada.

13. Los animales destetados y adultos tiroidectomizados tratados con 1.75µg/100g de peso de tiroxina durante 5 días rehabilitan todos los parámetros del axis IGFs/IGFBPs estudiados.

14. El análisis de correlación lineal entre insulina y niveles de IGF-I en neonatos, así como entre niveles de GH e IGF-I en adultos, muestra una correlación positiva alta en estos animales rehabilitados. Dicha correlación es mayor en los animales tratados con pellets en todas las poblaciones y más clara en animales adultos.

Diabetes.

15. Los animales neonatales diabéticos por STZ tratados con tiroxina rehabilitan los valores circulantes de IGF-I y la expresión de su ARNm hepático de IGF-I y II, así como sus proteínas ligadoras, con aumento de GH y no de insulina. Sin embargo, los animales diabéticos adultos tratados con T₄ no rehabilitan, con la dosis administrada, los parámetros de IGFs, ya que no aumentan tampoco la GH ni las hormonas tiroideas hasta los niveles control.

Transportadores de glucosa.

16. Las alteraciones encontradas en diversos tejidos de los transportadores de glucosa en animales neonatales hipotiroideos, muestran que no parece existir correlación directa entre las variaciones de IGFs y de GLUTs, sino que ambas alteraciones parecen dependientes de los niveles de insulina, a su vez alterados por el déficit de hormonas tiroideas.

En resumen, este estudio realizado en animales tiroidectomizados, desde la etapa neonatal a la adulta de la rata, muestra que la influencia de las hormonas tiroideas sobre el axis IGFs/IGFBPs varía según la edad del animal que se considere, siendo el mediador de dicha acción la insulina en periodos neonatales, y pasando a

ser la GH la hormona mediadora en periodo adulto. El estudio de las variaciones de las proteínas transportadoras en estos animales tiroidectomizados pone de manifiesto la importancia del estado metabólico en su regulación, sobre todo, para las proteínas ligadoras de bajo peso molecular abundantes en etapa neonatal. La IGFBP-3 parece mostrar una regulación mediada por la hormona de crecimiento, sobre todo en periodo adulto. Los estudios con animales hipotiroideos, neonatales y adultos, rehabilitados con tiroxina ratificaron los resultados anteriores, no obstante, en periodo neonatal estos estudios, junto con los realizados dando tiroxina a animales diabéticos neonatales, muestran que las hormonas tiroideas en situaciones límites de falta de insulina también actúan rehabilitando los niveles de IGF-I a través de su acción sobre la hormona de crecimiento. Estos datos, y los obtenidos sobre la regulación de los transportadores de glucosa, ponen de relieve que las hormonas tiroideas son factores endocrinos decisivos en la regulación del desarrollo, no sólo por sus conocidas acciones específicas sobre el Sistema Nervioso Central, sino porque producen desequilibrios en vertiente metabólica, alterando otras hormonas como la insulina y la GH, que a su vez provocan variaciones en la secreción de factores de crecimiento, IGFs, totalmente implicados como reguladores del crecimiento en los mamíferos.

BIBLIOGRAFIA

6. BIBLIOGRAFIA.

- **Adamo ML, Ben-Hur H, Roberts CT and LeRoith D.** Regulation of start site usage in the leader exons of the rat insulin-like growth factor-I gene by development, fasting and diabetes. *Mol. Endocrinol.* 5: 1677-1686 (1991).
- **Ahrén B and Lundquist I.** Insulin secretory response to different secretagogues in hyper- and hypothyroid mice. *Acta Endocrinol.* 97: 508-513 (1981).
- **Aláez, C. Tesis doctoral.** Actividad 5'-desyodasa y regulación del axis tiroideo en rata subnutrida. *F. Farmacia. U. Complutense. Madrid* (1992a).
- **Aláez C, Calvo R, Alvarez C, Goya L, Martín MA, Obregón MJ and Pascual-Leone AM.** Influence of thyroid hormone deiodination on the regulation of the thyroid axis in diabetic rats. *Metabolism (en prensa)*.
- **Aláez C, Calvo R, Obregón MJ and Pascual-Leone AM.** Thyroid hormones and 5'-deiodinase activity in neonatal undernourished rats. *Endocrinology* 130:773-779 (1992b).
- **Alberti KGMM, Christensen SE, Iverson J, Seyer-Hansen K, Christensen NJ, Prange-Hansen AA, Lunkbaek K and Orskow H.** Inhibition of insulin secretion by somatostatin. *Lancet* 2: 1299-1301 (1973).
- **Alvarez C, Martín MA, Goya L, Bertin E, Portha B and Pascual-Leone AM.** Contrasted impact of maternal rat food-restriction on the fetal endocrine pancreas. *Endocrinology* 138: 2267-2273 (1997).
- **Angervo M, Leinonen P, Koistinen R, Julkunen M, Seppala M.** Triiodothyronine and cyclohexamide enhance insulin-like growth factor binding-protein-1 gene expression in human hepatoma cells. *J. Mol. Endocrinol.* 10: 7-13 (1993a).

- **Angervo M, Toivonen J, Leinonen P, Valimaki M and Sepälä M.** Thyroxine withdrawal is accompanied by decreased circulating levels of insulin-like growth factor binding protein-1 in thyroidectomized patients. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 76: 1199-1201 (1993b).
- **Aránguez I, Goya L and Pascual-Leone AM.** Changes in blood glucose, liver glycogen, ketone bodies and plasma insulin in suckling rats treated with a single high cortisol dose one day after birth. *Acta Endocrinol. (Copenh.)* 113: 598-603 (1986).
- **Azam M, Gupta BL and Baquer NZ.** Effect of hyperthyroidism on rat blood cell insulin receptors and catecholamines: relationship with cellular ageing. *Biochem. Int.* 21: 135-144 (1990).
- **Babajko S, Hardouin S, Segovia B, Groyer A and Binoux M.** Expression of insulin-like growth binding protein-1 and -2 genes through the perinatal period in the rat. *Endocrinology* 132: 2586-2592 (1993).
- **Barnard RJ and Youngren JF.** Regulation of glucose transport in skeletal muscle. *FASEB J.* 6: 3238-3244 (1992).
- **Baxter RC.** Circulating binding proteins for the insulin-like growth factors. *Trends Endocrinol. Metab.* 4: 91-96 (1993).
- **Baxter RC.** Insulin-like growth factors binding proteins as glucoregulators. *Metabolism* 44 Suppl 4: 12-17 (1995).
- **Baxter RC and Cowell CT.** Diurnal rhythm of growth hormone independent binding protein for insulin-like growth factors in human plasma. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 65: 432-440 (1987).
- **Bedo G, Santisteban P, Jolin T and Aranda A.** Expression of the growth hormone gene and the pituitary-specific transcription factor GHF-1 in diabetic

- rat. *Mol. Endocrinol.* 5: 1730-1739 (1991).
- **Beer SF, Parr JH, Temple C and Hales CN.** The effect of thyroid disease on proinsulin and C-peptide levels. *Clin. Endocrinol.* 30: 379-383 (1989).
 - **Beltchez PE, Gredley G, Bird D and Himsworth RL.** Regulation of TSH secretion by negative feedback of T₃ on the hypothalamus. *J. Endocrinol.* 76: 439-448 (1978).
 - **Bereket A, Lang CH, Blethen SL, Gelato MC, Fan J, Frost RA and Wilson TA.** Effect of insulin on the insulin-like growth factor system in children with new-onset insulin-dependent diabetes mellitus. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 80: 1312-1317 (1995).
 - **Berelowitz M, Maeda K, Harris S and Frohman LA.** The effect of alteration in the pituitary-thyroid axis on hypothalamic content and *in vitro* release of SRIF-like immunoreactivity. *Endocrinology* 107: 24-29 (1980).
 - **Bers G and Garfin D.** Protein and nucleic acid blotting and immunochemical detection. *Biotechnology* 3: 275 (1985).
 - **Bichell DP, Kikuchi K, Rotwein P.** Growth hormone rapidly activates IGF-I gene transcription *in vivo*. *Mol. Endocrinol.* 6: 1899-1908 (1992).
 - **Böni-Schnetzler M, Schmid C, Meier PJ and Froesch ER.** Insulin regulates insulin-like growth factor-I mRNA in rat hepatocytes. *Am. J. Physiol.* 260: E846-E851 (1991).
 - **Bornfeldt KE, Skottner A and Arnqvist HJ.** *In vivo* regulation of messenger RNA encoding insulin-like growth factor-I (IGF-I) and its receptor by diabetes, insulin and IGF-I in rat muscle. *J. Endocrinol.* 135: 203-211 (1992).
 - **Bradford MM.** A rapid and sensitive method for the quantification of microgram

- quantities of protein, utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254 (1976).
- **Brismar K, Fernqvist-Forbes E, Wahren J and Hall K.** Effect of insulin on the hepatic production of insulin-like growth factor binding protein-1 (IGFBP-1), IGFBP-3, and IGF-I in insulin-dependent diabetes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 79: 872-878 (1994).
 - **Burant CF, Sivitz WI, Fukumoto H, Kayano T, Nagamatsu S, Seino S, Pessin SE and Bell GI.** Mammalian glucose transporters: structure and molecular regulation. *Recent Prog. Horm. Res.* 47: 349-388 (1991).
 - **Burstein PJ, Draznin B, Johson CJ and Schalch DS.** The effect of hypothyroidism on growth, serum growth hormone, the growth hormone-dependent somatomedin, insulin-like growth factor, and its carrier protein in rats. *Endocrinology* 104: 1107-1111 (1979).
 - **Butler AA, Gallaher BW, Ambler GR, Cluckman PD and Breier BH.** Insulin-like growth factor-I and IGF binding protein-3 in plasma of GH deficient rats. *J. Endocrinol.* 150: 67-76 (1996).
 - **Calvo R, Morreale de Escobar G, Escobar del Rey F and Obregón MJ.** Maternal nonthyroidal illness and fetal thyroid hormone status, as studied in the streptozotocin-induced diabetes mellitus rat model. *Endocrinology* 138: 1159-1169 (1997).
 - **Camps M, Castelló A, Muñoz P, Monfar M, Testar X, Palacín M and Zorzano A.** Effect of diabetes and fasting on GLUT-4 (muscle/fat) glucose-transporter expression in insulin-sensitive tissues. *Biochem. J.* 282: 765-772 (1992).
 - **Casla A, Rovira A, Wells JA and Dohm GL.** Increased glucose transporter (GLUT-4) protein expression in hyperthyroidism. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*

171: 182-188 (1990).

- **Castelló A, Rodríguez-Manzaneque JC, Camps M, Pérez-Castillo A, Testar X, Palacín M, Santos A and Zorzano A.** Perinatal hypothyroidism impairs the normal transition of GLUT4 and GLUT1 glucose transporters from fetal to neonatal levels in heart and brown adipose tissue. *J. Biol. Chem.* 269: 5905-5912 (1994).
- **Cavaliere H, Knobel M, Medeiros-Neto G.** Effect of thyroid hormone therapy on plasma insulin-like growth factor I levels in normal subjects, hypothyroid patients and endemic cretins. *Horm. Res.* 25: 132-139 (1987).
- **Ceda GP, Fielder PJ, Donovan SM, Rosenfeld RG, Hoffman AR.** Regulation of insulin-like growth factor binding proteins expression by thyroid hormone in rat GH3 pituitary tumor cells. *Endocrinology* 130: 1483-1489 (1992).
- **Clark R.** The somatogenic hormones and insulin-like growth factor-I stimulations of lymphopoiesis and immune function. *Endocr. Rev.* 18: 157-179 (1997).
- **Clemmons DR and Underwood LE.** Nutritional regulation of IGF-I and IGF-binding proteins. *Ann. Rev. Nutr.* 11: 393-412 (1991).
- **Coiro V, Braverman LE, Christianson D, Fang SL and Goodman M.** Effect of hypothyroidism and thyroxine replacement on growth hormone in the rat. *Endocrinology* 105: 641-646 (1979).
- **Colomb V, Leturque A, Guihot G, Loizeau M, Lavie S, Colomer S, Ricour C and Girard J.** Role of nutrient delivery affects insulin sensitivity and liver glucose transporter expression in rat. *Am. J. Physiol.* 269: E827-E833 (1995).
- **Cotterill AM, Cowell CT, Baxter RC, McNeill D and Silinik M.** Regulation of the growth hormone-independent growth factor-binding protein in children. *J.*

Clin. Endocrinol. Metab. 67: 882-887 (1988).

- **Counts DR, Gwirtsman H, Carlsson LM, Lesem M and Cutler GB Jr.** The effect of anorexia nervosa and re-feeding on growth hormone-binding protein, the insulin-like growth factors (IGFs) and the IGF binding proteins. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 75: 762-767 (1992).
- **Coverley JA and Baxter RC.** Regulation of insulin-like growth factor (IGF) binding protein-3 phosphorylation by IGF-I. *Endocrinology* 136: 5778-5781 (1995).
- **Chen Y and Arnqvist HJ.** Differential regulation of insulin-like growth factor binding protein-2 and -4 mRNA in muscle tissues and liver by diabetes or fasting. *J. Endocrinol.* 143: 235-242 (1994).
- **Chernausk SD, Underwood LE, Utiger RD and van Wyk JJ.** Growth hormone secretion and plasma somatomedin-C in primary hypothyroidism. *Clin. Endocrinol.* 19: 337-344 (1983).
- **Chomczynski P and Sacchi N.** Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162: 156-159 (1987).
- **Daughaday WH and Rotwein P.** Insulin-like growth factors I and II. Peptide, messenger ribonucleic acid and gene structures, serum, and tissue concentrations. *Endocr. Rev.* 10: 68-91 (1989).
- **Demori I, Bottazi C, Voci A, Gallo G, Scharf JG and Fugassa E.** Tri-iodothyronine increases insulin-like growth factor binding protein-4 expression in rat hepatocytes. *J. Endocrinol.* 154: 155-165 (1997).
- **Dobbing J.** The latter growth of the brain and its vulnerability. *Pediatrics* 53: 2-6 (1977).

-
- **Donovan SM, Atilano LC, Hintz RL, Wilson DM and Rosenfeld RG.** Differential regulation of the insulin-like growth factors (IGF-I and -II) and IGF binding proteins during malnutrition in the neonatal rat. *Endocrinology* 129: 149-157 (1991).
 - **Donovan SM, Oh Y, Pham H and Rosenfeld RG.** Ontogeny of the insulin-like growth factor-binding proteins in the rats. *Endocrinology* 125: 2621-2627 (1989).
 - **Eayrs JT.** Developmental relationships between brain and thyroid. *En: Michael RP (ed) Endocrinology and human behaviour, London: Oxford University Press, 239-255 (1968).*
 - **Escrivá F, Agote M and Pascual-Leone AM.** Effects of undernutrition on muscle glucose transporter protein in the rat. *Diabetologia (en evaluación).*
 - **Escrivá F and Pascual-Leone AM.** Decrease of blood glucose, liver glycogen, and insulin and changes in glucose tolerance in suckling rats treated neonatally with high L-thyroxine doses. *Endocrinology* 108: 336-340 (1981).
 - **Escrivá F, Rodríguez C, Cacho C, Alvarez C, Portha B and Pascual-Leone AM.** Glucose utilization and insulin action in adult rats submitted to prolonged food restriction. *Am. J. Physiol.* 263: E1-E7 (1992).
 - **Evans RM, Birnberg NC, Rosenfeld MG.** Glucocorticoid and thyroid hormones transcriptionally regulate growth hormone gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 7659-7663 (1982).
 - **Ezaki O.** Regulatory elements in the insulin-responsive glucose transporter (GLUT4) gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 241: 1-6 (1997).
 - **Ezzats S, Laks D, Oster J and Melemd S.** Growth hormone regulation in primary fetal and neonatal rat pituitary cell cultures: the role of thyroid hormones. *Endocrinology* 128: 937-943 (1991).

- **De Fesi CR, Fels Ec, Surks MI.** Triiodothyronine stimulates growth of cultured GC cells by action early in the G₁ period: evidence for mediation by the nuclear T₃ receptor. *Endocrinology* 116: 2062-2069 (1985).
- **Fischer Y, Thomas J, Sevilla L, Muñoz P, Becker C, Holman G, Kozka IJ, Palacín M, Testar X, Kammermeier H and Zorzano A.** Insulin-induced recruitment of glucose transporter 4 (GLUT4) and GLUT1 in isolated rat cardiac myocytes. *J. Biol. Chem.* 272: 7085-7092 (1997).
- **Flórez J and Amado JA.** Hormonas tiroideas y fármacos antitiroideos. *En: Farmacología humana. Ed: Masson-Salvat Medicina 2ª(ed): 825-834 (1992).*
- **Flyvbjerg A, Landau D, Domene H, Hernández L, Gronbaek H and LeRoith D.** The role of growth hormone, insulin-like growth factors (IGFs) and IGF-binding proteins in experimental diabetic kidney disease. *Metabolism* 44 Suppl 4: 67-71 (1995).
- **Foss MC, Paccola GMGF, Saad MJA, Pimenta WP, Piccinato CE and Iazagi N.** Peripheral glucose metabolism in human hyperthyroidism. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 70: 1167-1172 (1990).
- **Fowlkes JL.** Insulinlike growth factor-binding protein proteolysis. *Trends Endocrinol. Metab.* 8: 299-306 (1997).
- **Freake HC, Oppenheimer JH.** Thermogenesis and thyroid function. *Ann. Rev. Nutr.* 15: 263-291 (1995).
- **Frystyk J, Gronbaek H, Skjaerbaek C and Flyvbjerg A.** Effect of hyperthyroidism on circulating levels of free and total IGF-I and IGF-BPs in rats. *Am. J. Physiol.* 269: E840-E845 (1995).
- **Gallo G, de Marchis M, Voci A and Fugassa E.** Expression of hepatic mRNAs for insulin-like growth factors-I and -II during the development of hypothyroid

rats. *J. Endocrinol.* 131: 367-372 (1991).

- **Gargosky SE, Tapanainen P and Rosenfeld RG.** Administration of growth hormone (GH), but not insulin-like growth factor-I (IGF-I), by continuous infusion can induce the formation of the 150-kilodalton IGF-binding protein-3 complex in GH-deficient rats. *Endocrinology* 134: 2267-2276 (1994).
- **Gaspard T, Wondergem R, Hamamdžić M, Klitgaard HM.** Serum somatomedin stimulation in thyroxine-treated hypophysectomized rats. *Endocrinology* 120: 606-611 (1978).
- **Geary ES, Lim M, Ceda GP, Ro S, Rosenfeld RG, Hoffman AR.** Triiodothyronine regulates insulin-like growth factor-I binding to cultured rat pituitary cells. *J. Neuroendocrinol.* 1: 179-184 (1989).
- **Gershengorn MC.** Thyrotropin releasing hormone stimulation on pituitary hormone secretion. *Ann. Rev. Physiol.* 48: 515-526 (1986).
- **Giustina A and Wehrenberg WB.** Growth hormone neuroregulation in diabetes mellitus. *Trends Endocrinol. Metab.* 5: 73-78 (1994).
- **Glasscock GF, Gelber SE, Lamson G, McGee-Tekula R and Rosenfeld RG.** Pituitary control of growth in the neonatal rat: effects of neonatal hypophysectomy on somatic and organ growth, serum insulin-like growth factors (IGF)-I and -II levels, and expression of IGF binding proteins. *Endocrinology* 127: 1792-1803 (1990).
- **Glasscock GF, Gin KKL, Kim JD, Hintz RL and Rosenfeld RG.** Ontogeny of pituitary regulation of growth in the developing rat: comparison of effects of hypophysectomy and hormone replacement on somatic and organ growth, serum insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-II levels, and IGF-binding protein levels in the neonatal and juvenile rat. *Endocrinology* 128: 1036-1047 (1991).

-
- **Glasscock GF, Hein AN, Miller JA, Hintz RL and Rosenfeld RG.** Effects of continuous infusion of insulin-like growth factor-I and II, alone and in combination with thyroxine or growth hormone, on the neonatal hypophysectomized rat. *Endocrinology* 130: 203-210 (1992).
 - **Glasscock GF and Nicoll CS.** Hormonal control of growth in the infant rat. *Endocrinology* 109: 176-184 (1981)
 - **Glydon R and Sr J.** The development of the blood supply of the pituitary in the albino rat, with special reference to the portal vessels. *J. Anat. (London)* 91: 237 (1957).
 - **González C and Jolin T.** Effect of streptozotocin diabetes and insulin replacement on growth hormone in rats. *J. Endocrinol. Invest.* 8: 7-11 (1985).
 - **González C, Montoya E and Jolin T.** Effect of streptozotocin diabetes on the hypothalamic-pituitary-thyroid axis in the rat. *Endocrinology* 107: 2099-2103 (1980).
 - **Gosteli-Peter MA, Schmid C and Zapf J.** Triiodothyronine increases glucose transporter isotype 4 mRNA expression, glucose transport, and glycogen synthesis in adult rat cardiomyocytes in long-term culture. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 221: 521-524 (1996).
 - **Gosteli-Peter MA, Winterhalter KH, Schmid C, Froesch ER and Zapf J.** Expression and regulation of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-binding protein messenger ribonucleic acid levels in tissues of hypophysectomized rats infused with IGF-I and growth hormone. *Endocrinology* 135: 2558-2567 (1994).
 - **Gould GW and Bell GI.** Facilitative glucose transporters: an expanding family. *TIBS* 15: 18-23 (1990).
 - **Gould GW and Holman GD.** The glucose transporter family: structure, function

- and tissue specific expression. *Biochem. J.* 295: 329-341 (1993).
- **Goya L, de la Puente A, Ramos S, Martín MA, Escrivá F and Pascual-Leone AM.** Regulation of IGF-I and -II by glucose in primary cultures of fetal rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.* (en evaluación).
 - **Goya L, Rivero F, Martín MA, Alvarez C, Ramos S, de la Puente A and Pascual-leone AM.** Liver mRNA expression of IGF-I and IGFbps in adult undernourished diabetic rats. *Life Sci.* (en prensa).
 - **Goya L, Rivero F, Martín MA, Arahuetes R, Hernández ER and Pascual-Leone AM.** Effects of refeeding of undernourished and insulin treatment of diabetic neonatal rats on IGF and IGFBP. *Am. J. Physiol.* 271: E223-E231 (1996).
 - **de Greef WJ, Rondeel JMM, van Haasteren GAC, Klootwijk W and Visser TJ.** Regulation of hypothalamic TRH production and release in the rat. *AMA* 19: 77-79 (1992).
 - **Guyton AC.** Hormonas tiroideas metabólicas. *En: Tratado de Fisiología médica, ed: Interamericana-Mc Graw Hill 7ª (ed): 888-899 (1986).*
 - **Hall K, Johansson BL, Pova G, Thalme B.** Serum levels of insulin-like growth factor (IGF) I, II and IGF-binding protein in diabetic adolescents treated with continuous subcutaneous insulin infusion. *J. Int. Med.* 225: 273-278 (1989).
 - **Hall LJ, Kajimoto Y, Bichell D, Kim S-W, James PL, Counts D, Nixon LJ, Tobin G and Rotwein P.** Functional analysis of the rat insulin-like growth factor I gene and identification of an IGF-I gene promoter. *DNA and Cell Biol.* 11: 301-313 (1992).
 - **Hanaire-Broutin H, Sallerin-Caute B, Poncet MF, Tauber M, Bastide R,**

- Chale JJ, Rosenfeld R, Taubert JP.** Effect of intraperitoneal insulin delivery on growth hormone binding protein, insulin-like growth factor-I (IGF-I), and IGF-binding protein-3 in IDDM. *Diabetologia* 39: 1498-1504 (1996).
- **Hernández ER, Roberts CT, Hurwitz A, Le Roith D and Adashi EY.** Rat ovarian insulin-like growth factor II gene expression is theca-interstitial-cell-exclusive: hormonal regulation and receptor distribution. *Endocrinology* 127: 3249-3251 (1990).
 - **Hervás F, Morreale de Escobar G, Escobar del Rey F.** Rapid effects of single small doses of L-thyroxine and triiodo-L-thyronine on growth hormone as studied in the rat by radioimmunoassay. *Endocrinology* 97: 91-101 (1975).
 - **Hiraki Y, Rosen OM and Birnbaum MJ.** Growth factors rapidly induce expression of the glucose transporter gene. *J. Biol. Chem.* 263: 13655-13662 (1988).
 - **Holly JMP, Biddlecombe RA, Dunger DB, Edge JA, Amiel SA, Howell R, Chard T, Rees LH and Wass JAH.** Circadian variation of GH-independent IGF-binding protein in diabetes mellitus and its relationship to insulin. A new role for insulin?. *Clin. Endocrinol.* 29: 667-675 (1988).
 - **Hossenlopp P, Seurin D, Segovia-Quinson B, Hardouin S and Binoux M.** Analysis of serum insulin-like growth factor binding proteins using Western blotting: use of the method for tritiation of the binding proteins and competitive binding studies. *Anal. Biochem.* 154: 138-143 (1986).
 - **Humbel RE.** Insulin-like growth factors I and II. *Eur. J. Biochem.* 190: 445-462 (1990).
 - **Hunter WM and Greenwood FC.** Preparation of iodine-131 labelled human growth hormone of high specific activity. *Nature* 194: 495-496 (1962).

-
- **Hunziker EB, Wagner J and Zapf J.** Differential effects of insulin-like growth factor-I and growth hormone on developmental stages of rat growth plate chondrocytes *in vivo*. *J. Clin. Invest.* 93: 1078-1086 (1994).
 - **Ikeda T, Fujiyama K, Takeuchi T.** Effect of thyroid hormone on somatomedin C release from perfused rat liver. *Experientia* 45: 170-171 (1989).
 - **Ikeda T, Fujiyama K, Hoshino T, Takeuchi T, Mashiba H and Tominaga M.** Possible role of thyroid hormone in decreased somatomedin-C levels in diabetic and starved rats. *Ann. Nutr. Metab.* 34: 8-12 (1990).
 - **Ikejiri K, Yamada T and Ogura H, Matsumoto and Kobe.** Age-related glucose intolerance in hyperthyroid patients. *Diabetes* 27: 543-549 (1978).
 - **Ishii DN, Guertin DM and Whalen LR.** Reduced insulin-like growth factor-I mRNA content in liver, adrenal glands and spinal cord of diabetic rats. *Diabetologia* 37: 1073-1081 (1994).
 - **Jayendra HS and Cerchio GM.** Hypoinsulinemia of hypothyroidism. *Arch. Intern. Med.* 132: 657-661 (1973).
 - **Jolin T and Montes A.** The different effects of thyroidectomy, $KClO_4$ and propylthiouracil on insulin secretion and glucose uptake in the rat. *Endocrinology* 94: 1502-1507 (1974).
 - **Jolin T, Morreale G and Escobar del rey F.** Differential effects in the rat of thyroidectomy, propylthiouracil and other goitrogens on plasma insulin and thyroid weight. *Endocrinology* 87: 99-110 (1970).
 - **Johnson TR, Blossey BK, Denko CW and Ilan J.** Expression of insulin-like growth factor-I in cultured rat hepatocytes: effects of insulin and growth hormone. *Mol. Endocrinol.* 3: 580-587 (1989).

-
- **Jones JI and Clemmons DR.** Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr. Rev.* 16: 3-34 (1995).

 - **Jones PM, Burrin JM, Ghatei MA, O'Halloran DJ, Legon S and Bloom SR.** The influence of thyroid hormone status on the hypothalamo-hypophyseal growth hormone axis. *Endocrinology* 126: 1374-1379 (1990).

 - **Katsilambros N, Ziegler R, Schatz H, Hinz M, Maier V and Pfeiffer EF.** Intravenous glucose tolerance and insulin secretion in the rat after thyroidectomy. *Horm. Metab. Res.* 4: 377-379 (1972).

 - **Kim JD, Nanto-Salonen K, Szczepankiewicz JL, Rosenfeld RG and Glasscock GF.** Evidence for pituitary regulation of somatic growth, insulin-like growth factors-I and -II, and the binding protein in the fetal rat. *Pediatric Res* 32: 144-151 (1993).

 - **Kitauchi S, Yamanouchi H, Hirano N, Toné S and Shiino M.** Effect of neonatal thyroidectomy on growth hormone secretion in the rat. *J. Endocrinol.* 157: 245-250 (1998).

 - **Kjeld JM, Kuku SF, Diamant L, Fraser TR, Joplin GF and Mashiter K.** Production and storage of ¹²⁵I thyroxine and ¹²⁵I triiodothyronine of high specific activity. *Clin. Chim. Acta* 61: 381-389 (1975).

 - **Koivisto U-M, Martínez-Valdez H, Bilan PJ, Burdett E, Ramlal T and Klip A.** Differential regulation of the GLUT-1 and GLUT-4 glucose transport systems by glucose and insulin in L6 muscle cells in culture. *J. Biol. Chem.* 266: 2615-2621 (1991).

 - **Laemmli UK.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685 (1970).

 - **Latimer AM, Hausman GJ, McCusker RH and Buonomo FC.** The effects of

- thyroxine on serum and tissue concentrations of IGFs (IGF-I and -II) and IGF-binding proteins in the fetal pig. *Endocrinology* 133: 1312-1319 (1993).
- **Legrand J.** Morphogenetic action of thyroid hormones. *Trends Neurosci.* 2: 234-236 (1979).
 - **Legrand J.** Thyroid hormone effects on growth and development. *En: Hennemann G (eds) Thyroid hormone metabolism, New York: Marcel Dekker, 503-534 (1986).*
 - **Lenzen S and Bailey C.** Thyroid hormones, gonadal and adrenocortical steroids and the function of the islets of Langerhans. *Endocr. Rev.* 5: 411-434 (1984).
 - **Lenzen S, Joost HG and Hasselblatt A.** The inhibition of insulin secretion from the perfused rat pancreas after thyroxine treatment. *Diabetologia* 12: 495-500 (1976).
 - **Lenzen S and Klöppel G.** Insulin secretion and the morphological and metabolic characteristics of pancreatic islets of hyperthyroid ob/ob mice. *Endocrinology* 103: 1546-1555 (1978).
 - **Leonard JL.** Identification and structure analysis of iodothyronine deiodinases. *En: Greer Ma (ed) The thyroid gland, New York: Raven Press, 285-305 (1990).*
 - **Lewitt MS and Baxter RC.** IGFBP-1: a role in glucose counterregulation? *Mol. and Cell. Endocrinol.* 79: C147-C152 (1991).
 - **Lewitt MS, Saunders H, Phyval JL and Baxter RC.** Regulation of insulin-like growth factor-binding protein-1 in rat serum. *Diabetes* 43: 232-239 (1994).
 - **Lowe WL, Roberts CT, Lasky SR and Le Roith D.** Differential expression of alternative 5'-untranslated regions in mRNAs encoding rat insulin-like growth factor I. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 84: 8946-8950 (1987).

-
- **Lund PK.** Insulin-like growth factor I: molecular biology and relevance to tissue-specific expression and action. *Recent Prog. Horm. Res.* 49: 125-148 (1994).

 - **Lund PK, Moats-Staats BM, Hynes MA, Simmons JG, Jansen M, D'Ercole AJ and van Wyk JJ.** Somatomedin-C/ Insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor-II mRNAs in rat fetal and adult tissues. *J. Biol. Chem.* 261: 14539-14544 (1986).

 - **Luo J and Murphy LJ.** Differential expression of insulin-like growth factor-I and insulin-like growth binding protein-1 in the diabetic rats. *Mol. Cell. Biochem.* 103: 41-50 (1991).

 - **Luo J, Reid RE and Murphy LJ.** Dexamethasone increases hepatic insulin-like growth factor binding protein-1 (IGFBP-1) mRNA in serum IGFBP-1 concentrations in the rat. *Endocrinology* 127: 1456-1462 (1990).

 - **Magner JA.** Thyroid-stimulating hormone: biosynthesis, cell biology and bioactivity. *Endocrin. Rev.* 11: 354-385 (1990).

 - **Maher F, Vannuci SJ, Simpson IA.** Glucose transporter proteins in brain. *FASEB J.* 8: 1003-1011 (1994).

 - **Maiter D, Fliejen T, Underwood LE, Maes M, Gerard G, Davenport ML and Ketelslegers JM.** Dietary protein restriction decreases insulin-like growth factor I independent of insulin and liver growth hormone binding. *Endocrinology* 124: 2604-2611 (1989).

 - **Martial JA, Baxter JD, Goodman HM and Seeburg PH.** Regulation of growth hormone messenger RNA by thyroid and glucocorticoid hormones. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 1816-1820 (1977).

 - **Martín MA.** Tesis doctoral. Secreción de insulina en animales subnutridos: estudio *in vivo* e *in vitro*. *F. Biología. U. Complutense. Madrid* (1995).

- **Martín MA, Alvarez C, Goya L, Portha B and Pascual-Leone AM.** Insulin secretion in adult rats that had experienced different underfeeding patterns during their development. *Am. J. Physiol.* 272: E634-E640 (1997).
- **Mathews LS, Norstedt G and Palmiter RD.** Regulation of insulin-like growth factor-I gene expression by growth hormone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 9343-9347 (1986).
- **Matthaei S, Trost B, Hamann A, Kausch C, Benecke H, Greten H, Höppner W and Klein HH.** Effect of *in vivo* thyroid hormone status on insulin signalling and GLUT1 and GLUT4 glucose transport systems in rat adipocytes. *J. Endocrinol.* 144: 347-357 (1995).
- **McCarthy T, Casinghino S, Centrella M and Canalis E.** Complex pattern of insulin-like growth factor binding protein expression in primary rat osteoblast enriched cultures: regulation by prostaglandin E₂, growth hormone, and the insulin-like growth factors. *J. Cell. Physiol.* 160: 163-175 (1994).
- **Melian E, Velasco B, Barrios R and Sánchez-Franco F.** Basal and growth hormone-induced hepatic messenger ribonucleic acid expression of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-binding protein-3 is independent of hyperinsulinemia and increased energy status in the genetically obese Zucker rat. *Endocrinology* 138: 1066-1071 (1997).
- **Melmed S and Yamasita S.** Insulin-like growth factor-I action on hyperthyroid rat pituitary cells: suppression of T₃-induced growth hormone secretion and messenger ribonucleic acid levels. *Endocrinology* 118: 1483-1490 (1986).
- **Merimée TJ, Gardner DF, Zapf J, Froesch ER.** Effect of glycemic control on serum insulin-like growth factors in diabetes mellitus. *Diabetes* 33: 790-793 (1984).
- **Miell JP, Taylor AM, Zini M, Maheshwari HG, Ross RJM and Valcavi R.**

- Effects of hypothyroidism and hyperthyroidism on insulin-like growth factors (IGFs) and growth hormone- and IGF-binding proteins. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 76: 950-955 (1993).
- **Miell JP, Zini M, Quin JD, Jones J, Portioli I and Valcavi R.** Reversible effects of cessation and recommencement of thyroxine treatment on insulin-like growth factors (IGFs) and IGF-binding proteins in patients with total thyroidectomy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 79: 1507-1512 (1994).
 - **Miller LL, Schalch S and Draznin B.** Role of the liver in regulating somatomedin activity: effects of streptozotocin diabetes and starvation on the synthesis and release of insulin-like growth factor and its carrier proteins by isolated perfused rat liver. *Endocrinology* 108: 1265-1271 (1981).
 - **Moggetti P, Castello R, Tosi F, Zenti MG, Magnani C, Bolner A, Perobelli L and Muggeo M.** Glucose counterregulatory response to acute hypoglycemia in hyperthyroid human subjects. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 78: 169-173 (1994).
 - **Möller C, Arner P, Sonnenfeld T and Norstedt G.** Quantitative comparison of insulin-like growth factor mRNA levels in human and rat tissues analysed by a solution hybridization assay. *J. Mol. Endocrinol.* 7: 213-222 (1991).
 - **Montes A, Hervás F and Jolin T.** Effects of thyroidectomy and thyroxine on plasma growth and insulin levels in rats. *Horm. Res.* 8: 148-158 (1977).
 - **Morley J.** Neuroendocrine control of thyrotropin secretion. *Endocr. Rev.* 2: 396-436 (1981).
 - **Morovat A and Dauncet MJ.** Effects of thyroid status on IGF-I, GH and insulin are modified by food intake. *Eur. J. Endocrinol.* 138: 95-103 (1998).
 - **Morreale de Escobar G, Ruiz-Marcos A, Escobar del Rey F.** Thyroid hormone and the developing brain. *En: Dussault JH, Walker P (eds)*

Congenital hypothyroidism, New York : Marcel Decker, 85-126 (1983).

- **Müller MJ, Acheson KJ, Jequier E and Burger AG.** Effect of thyroid hormone on oxidative and nonoxidative glucose metabolism in humans. *Am. J. Physiol.* 255: E146-E152 (1988).
- **Muñoz MT, Barrios V, Pozo J and Argente J.** Insulin-like growth factor I, its binding proteins 1 and 3, and growth hormone-binding protein in children and adolescents with insulin-dependent diabetes mellitus: clinical implications. *Pediatr. Res.* 39: 992-998 (1996).
- **Nanto-Salonen K, Glasscock GF and Rosenfeld RG.** The effects of thyroid hormone on insulin-like growth factor (IGF) and IGF-binding protein (IGFBP) expression in the neonatal rat: prolonged high expression of IGFBP-2 in methimazole-induced congenital hypothyroidism. *Endocrinology* 129: 2563-2570 (1991).
- **Nanto-Salonen K, Muller HL, Hoffman AR, Vu TH and Rosenfeld RG.** Mechanism of thyroid hormone action on the insulin-like growth factor system: all thyroid hormone effects are not growth hormone mediated. *Endocrinology* 132: 781-788 (1993).
- **Nanto-Salonen K and Rosenfeld RG.** Insulin-like growth factor binding protein expression in the hypothyroid rat is age dependent. *Endocrinology* 131: 1489-1496 (1992).
- **Napoli R, Hirshman MF and Horton ES.** Mechanism and time course of impaired skeletal muscle glucose transport activity in streptozotocin diabetic rats. *J. Clin. Invest.* 96: 427-437 (1995).
- **Nikodem VM, Petty KJ, Mitsuhashi T, Desvergne B.** Structure and mechanism of action of thyroid hormone receptors. *En: Greer MA (ed) The thyroid gland, New York: Raven Press, 307-321 (1990).*

- **Obregón MJ, Pascual A, Morreale de Escobar G, Escobar del Rey F.** Pituitary and plasma thyrotropin, thyroxine, and triiodothyronine after hyperthyroidism. *Endocrinology* 104: 1467-1473 (1979).
- **Okajima F and Vi M.** Adrenergic modulation of insulin secretion *in vivo* dependent on thyroid states. *Am. J. Physiol.* 234: E106-E111 (1978).
- **O'Meara NM, Blackman JD, Sturis J and Polonsky KS.** Alterations in the kinetics of C-peptide and insulin secretion in hyperthyroidism. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 76: 79-84 (1993).
- **Ooi GT, Orlowski CC, Brown AL, Becker RE, Unterman TG and Rechler MM.** Different tissue distribution and hormonal regulation of messenger RNAs encoding rat insulin-like growth factor binding protein-1 and -2. *Mol. Endocrinol.* 4: 321-328 (1990).
- **Ooi GT, Tseng LYH, Rechler MM.** Post-transcriptional regulation of insulin-like growth factor binding protein-2 mRNA in diabetic rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 189: 1031-1037 (1992a).
- **Ooi GT, Tseng LYH, Tran MQ and Rechler MM.** Insulin rapidly decreases IGFBP-1 gene transcription in streptozotocin-diabetic rats. *Mol. Endocrinol.* 6: 2219-2228 (1992b).
- **Orlowski CC, Brown AL, Ooi GT, Yang IWH, Tseng LYH and Rechler MM.** Tissue, developmental and metabolic regulation of messenger ribonucleic acid encoding a rat insulin-like growth factor binding protein. *Endocrinology* 126: 644-652 (1990).
- **Ortiz-Caro J, Obregón MJ, Pascual A and Jolin T.** Decreased T₄ to T₃ conversion in tissues of streptozotocin-diabetic rats. *Acta Endocrinol.* 106: 86-91 (1984).

-
- **Palmero S, Prati M, Barreca A, Minuto F, Giordano G and Fugassa E.** Thyroid hormone stimulates the production of insulin-like growth factor-I (IGF-I) by immature rat Sertoli cells. *Mol. Cel. Endocrinol.* 68: 61-65 (1990).
 - **Pao C-I, Farmer PK, Begovic S, Goldstein S, Wu G and Phillips LS.** Expression of hepatic insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor binding protein-1 gene is transcriptionally regulated in streptozotocin-diabetic rats. *Mol. Endocrinol.* 6: 969-977 (1992).
 - **Pastor RM and Jolin T.** Peripheral metabolism and secretion rate of thyrotropin in streptozotocin-diabetic rats. *Endocrinology* 112: 1454-1459 (1983).
 - **Philipps A, Drakenberg K, Persson B, Sjögren B, Eklöf AC, Hall K and Sara V.** The effects of altered nutritional status upon insulin-like growth factors and their binding proteins in neonatal rats. *Pediatr. Res.* 26: 128-134 (1989).
 - **Porterfield JP and Hendrich CE.** The role of thyroid hormones in prenatal and neonatal neurological development-current perspectives. *Endocr. Rev.* 14: 94-106 (1993).
 - **Postic C, Burcelin R, Rencurel F, Pegorier J-P, Loizeau M, Girard J and Leturque A.** Evidence for a transient inhibitory effect of insulin on GLUT2 expression in the liver: studies *in vivo* and *in vitro*. *Biochem. J.* 293: 119-124 (1993a).
 - **Postic C, Leturque A, Printz RL, Maulard P, Loizeau M, Granner DK and Girard J.** Development and regulation of glucose transporter and hexokinase expression in rat. *Am. J. Physiol.* 266: E548-E559 (1994).
 - **Postic C, Leturque A, Rencurel F, Printz RL, Forest C, Granner DK and Girard J.** The effects of hyperinsulinemia and hyperglycemia on GLUT4 and hexokinase II mRNA and protein in rat skeletal muscle and adipose tissue. *Diabetes* 42: 922-929 (1993b).

-
- **Quin JD, Fisher BM, MacCuish AC, Beastall GH, Small M, Holly JMP and Cotterill AM.** Insulin-like growth factor binding protein-1 response to acute insulin induced hypoglycaemia in type 1 diabetes. *Clin. Endocrinol.* 41: 225-229 (1994).

 - **Rajaram S, Baylink DJ and Mohan S.** Insulin-like growth factor-binding proteins in serum and other biological fluids: regulation and functions. *Endocr. Rev.* 18: 801-831 (1997).

 - **Recler MM.** Insulin-like growth factor binding-proteins. *Vitamins and Hormone* 47: 1-114 (1993).

 - **Rechler MA and Clemmons DR.** Regulatory actions of insulin-like growth factor binding proteins. *Trends Endocrinol. Metab.* 9: 176-183 (1998).

 - **Rencurel F, Waeber G, Antoine B, Rocchiccioli F, Maulard P, Girard J and Leturque A.** Requirement of glucose metabolism for regulation of glucose transporter type 2 (GLUT2) gene expression in liver. *Biochem. J.* 314: 903-909 (1996).

 - **Rivero F, Goya L, Aláez C and Pascual-Leone AM.** Effects of undernutrition and diabetes on serum liver mRNA expression of IGFs and their binding proteins during rat development. *J. Endocr.* 145: 427-440 (1995).

 - **Rivero F, Goya L and Pascual-Leone AM.** Comparison of extraction methods for insulin-like growth factor-binding proteins prior to measurement of insulin-like growth factor-I in undernourished neonatal and adult rat serum. *J. Endocrinol.* 140: 257-263 (1994).

 - **Roberts CT Jr, Brown AL, Graham DE, Seelig S, Berry S, Gabbay KH and Rechler MM.** Growth hormone regulates the abundance of insulin-like growth factor-I RNA in adult rat liver. *J. Biol. Chem.* 261: 10025-10028 (1986).

-
- **Robinson ICAF, Clark RG and Carlsson LMS.** Insulin, IGF-I and growth in diabetic rats. *Nature* 326: 549 (1987).
 - **Rodgers BD, Bautista RM and Nicoll CS.** Regulation of insulin-like growth factor binding proteins in rat with insulin-dependent diabetes mellitus. *P. S. E. B. M.* 210: 234-241 (1995).
 - **Rodríguez M, Rodríguez F and Jolin T.** Effect of restricted feeding, fasting and diabetes on the relationship between thyroid hormone receptor occupancy, growth hormone induction, and inhibition of thyrotropin release in thyroidectomized rats. *Endocrinology* 131: 1612-1618 (1992).
 - **Rodríguez-Arno J, Miell J, Thomas M, McGregor AM, Ros RJM.** Increased hepatic IGFBP-2 gene expression in hypothyroid rats. *Endocrinology* 137 (Suppl) P80 (1993a).
 - **Rodríguez-Arno J, Miell J, Thomas M, McGregor AM, Ros RJM.** Changes in hepatic insulin-like growth factor-binding proteins-1, -2 and -3 mRNA levels in rats with altered thyroid status. *J. Endocrinol.* 140: 251-255 (1994).
 - **Rodríguez-Arno J, Miell J and Ross RJM.** Influence of thyroid hormones on the GH-IGF-I axis. *Trends Endocrinol. Metab.* 4: 169-173 (1993b).
 - **Rondeel JJM, de Greef WJ, Klootwijk W, Visser TJ.** Effects of hypothyroidism on hypothalamic release of thyrotropin-releasing hormone in rats. *Endocrinology* 130: 651-656 (1992).
 - **Rondeel JJM, de Greef WJ, van der Schoot P, Karels B, Klootwijk W, Visser TJ.** Effect of thyroid status and paraventricular area lesions on the release of thyrotropin-releasing hormone and catecholamines into hypophyseal portal blood. *Endocrinology* 123: 523-527 (1988).
 - **Rondeel JJM, de Greef WJ and Visser TJ.** Effect of thyroid status on release

of hypothalamic thyrotropin-releasing hormone. *Horm. Metab. Res.* 23 (Suppl): 1-4 (1990).

- **Rosenfeld RG, Lamson G, Pham H, Oh Y, Conover C, de Leon DD, Donovan SM, Ocrant I and Giudice L.** Insulinlike growth factor-binding proteins. *Recent Prog. Horm. Res.* 46: 99-163 (1990).
- **Rotwein P, Bichell DP and Kikuchi K.** Multifactorial regulation of IGF-I gene expression. *Mol. Reprod. Dev.* 35: 358-364 (1993).
- **Rubio E.** Memoria de Licenciatura. Acción insulínica en ratas adultas realimentadas tras una etapa de subnutrición. *F. Farmacia. U. Complutense. Madrid* (1997)
- **Rubio E, Agote M, Escrivá F and Pascual-Leone AM.** GLUT-4 and GLUT-1 content and *in vivo* insulin response in muscle from undernourished and refed rats. *Ars Pharmaceutica* 37: 957-969 (1996).
- **Ruiz de Oña C, Obregón MJ, Escobar del Rey F, Morreale de Escobar G.** Developmental changes in rat brain 5'-deiodinase and thyroid hormones during the fetal period: the effects of fetal hypothyroidism and maternal thyroid hormone. *Pediatr. Res.* 24: 588-594 (1988).
- **Samuels MH, Wierman ME, Wang C, Ridway EC.** The effect of altered thyroid status on pituitary hormone messenger ribonucleic acid concentration in the rat. *Endocrinology* 124: 2277-2282 (1989).
- **Santalucía T, Camps M, Castelló A, Muñoz P, Nuel A, Testar X, Palacín M and Zorzano A.** Developmental regulation of GLUT-1 (erythroid/Hep G2) and GLUT-4 (muscle/fat) glucose transporter expression in rat heart, skeletal muscle, and brown adipose tissue. *Endocrinology* 130: 837-846 (1992).
- **Sara VR and Hall K.** Insulin-like growth factors and their binding proteins.

Physiol. Rev. 70: 591-614 (1990).

- **Schmid C, Schlapfer I, Futo E, Waldvogel JS, Zapf J and Froesch ER.** Triiodothyronine (T₃) stimulates insulin-like growth factor (IGF)-1 and IGF-binding protein (IGFBP-2) production by rat osteoblasts *in vitro*. *Acta Endocrinol.* 126: 467-473 (1992).
- **Seo H, Wunderlich C, Vassart G and Refetoff S.** Growth hormone to thyroid hormone in the neonatal rat. *J. Clin. Invest.* 67: 569-574 (1981).
- **Shapiro LE, Samuels HM, Yaffe BM.** Thyroid and glucocorticoids hormones synergistically control growth hormone mRNA in cultured GH1 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 45-49 (1978).
- **Shetty M, Kuruvilla AK, Ismail-Beigi F and Loeb JN.** Stimulation of glucose transport in Clone 9 cells by insulin and thyroid hormone: role of GLUT-1 activation. *Biochim. Biophys. Acta* 1314: 140-146 (1996).
- **Shimokawa T, Kato M, Shioduka K, Irie J and Ezaki O.** Effect of triiodothyronine on muscle cell differentiation and blood glucose level in hyperglycemic KK mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 235: 790-793 (1997).
- **Smith WJ, Underwood LE, Clemmons DR.** Effects of caloric or protein restriction on insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-binding proteins in children and adults. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 80: 443-449 (1995).
- **Snedecor GW and Cochran G.** Statistical Methods, edn 5. Ames: Iowa State University Press.
- **Spira O and Gordon A.** Thyroid hormone feedback effects on thyroid-stimulating hormone. *En: Hennemann G (eds) Thyroid hormone metabolism, New York: Marcel Dekker Inc, 535-578 (1986).*

-
- **Stephens JM and Pilch PF.** The metabolic regulation and vesicular transport of GLUT-4, the major insulin-responsive glucose transporter. *Endocr. Rev.* 16: 529-546 (1995).
 - **St Germain DL.** Iodothyronine deiodinases. *Trends Endocrinol. Metab.* 5: 36-42 (1994).
 - **Strasser-Vogel B, Blum WF, Past R, Kessler U, Hoeflich A, Meiler B, Kiess W.** Insulin-like growth factor (IGF)-I and -II and IGF-binding proteins-1, -2 and -3 in children and adolescents with diabetes mellitus: correlation with metabolic control and height attainment. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 80: 1207-1213 (1995).
 - **Straus DS.** Nutritional regulation of hormones and growth factors that control mammalian growth. *FASEB J.* 8: 6-12 (1994).
 - **Straus DS, Ooi GT, Orłowski CC and Bechler MM.** Expression of the genes for insulin-like growth factor-I (IGF-I), IGF-II, and IGF-binding proteins-1 and -2 in fetal rat under conditions of intrauterine growth retardation caused by maternal fasting. *Endocrinology* 128: 518-525 (1991).
 - **Suikkari AM, Koivisto VA, Rutanen EM, Yki-Järvinen H, Karonen S-L and Seppälä M.** Insulin regulates the serum levels of low molecular weight insulin-like growth factor-binding protein. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 66: 266-272 (1988).
 - **Tannenbaum GS, Martin JB and Colle E.** Ultradian growth hormone rhythm in the rat: effects of feeding, hyperglycemia and insulin induced hypoglycemia. *Endocrinology* 99: 720-727 (1976).
 - **Taylor R, McCulloh Aj, Zeulen S, Gray P, Clark F and Alberi KGMM.** Insulin secretion, adipocyte insulin binding and insulin sensitivity in thyrotoxicosis. *Acta Endocrinol.* 109: 96-103 (1985).

- **Thissen JP, Ketelslegers JM and Underwood LE.** Nutritional regulation of the IGFs. *Endocr. Rev.* 15: 81-101 (1994).
- **Thorens B, Sarkar HK, Kaback HR and Lodish HF.** Cloning and functional expression in bacteria of a novel glucose transporter present in liver, intestine, kidney and β -pancreatic islet cells. *Cell* 55: 281-290 (1988).
- **Timiras PS, Nzekwe EU.** Thyroid hormones and nervous system development. *Biology of the neonate* 55: 376-385 (1989).
- **Tontis DK, Bestetti GE, Reymond MJ, Lemarchand-Béraud T and Rossi GL.** The age at onset of diabetes influences functional and structural changes in the pituitary-thyroid axis of streptozotocin-diabetic male rats. *Virchows Archiv. B Cell. Pathol.* 59: 205-213 (1990).
- **Torrance CJ, Devente JE, Jones JP and Dohm GL.** Effects of thyroid hormone on GLUT4 glucose transporter gene expression and NIDDM in rats. *Endocrinology* 138: 1204-1214 (1997a).
- **Torrance CJ, Usala SJ, Pessin JE and Dohm L.** Characterization of a low affinity thyroid hormone receptor binding site within the rat GLUT4 gene promoter. *Endocrinology* 138: 1215-1223 (1997b).
- **Tseng LY-H, Ooi GT, Brown AL, Straus DS and Rechler MM.** Transcription of the insulin-like growth factor binding protein-2 gene is increased in neonatal and fasted adult rat liver. *Mol. Endocrinol.* 6: 1195-1201 (1992).
- **Unterman TG, Patel K, Kumar Mahathre V, Rajamohan G, Oehler DT and Becker RE.** Regulation of low molecular weight insulin-like growth factor binding proteins in experimental diabetes mellitus. *Endocrinology* 126: 2614-2624 (1990).
- **Van Buul-Offers SC, Bloemen RJ, Reijnen-Greinigt MG, van Leiden HA,**

- Hoogerbrugge CM and van den Brande JL.** Insulin-like growth factor-I and -II and their binding proteins during growth hormone and thyroxine therapy. *J. Endocrinol.* 143: 191-198 (1994).
- **Van Hardeveld C.** Effects of thyroid hormone on oxygen consumption, heat production, and energy economy. *En: Hennemann G (eds) Thyroid hormone metabolism, New York: Marcel Dekker Inc, 579-608 (1986).*
 - **Varga F, Rumpler M and Klaushofer K.** Thyroid hormones increase insulin-like growth factor mRNA levels in the clonal osteoblastic cell line MC3T3-E1. *FEBS Let.* 345:67-70 (1994).
 - **Venditti P, Balestrieri M, di Meo S and de Leo T.** Effect of thyroid state on lipid peroxidation, antioxidant defences, and susceptibility to oxidative stress in rat tissues. *J. Endocrinol.* 155: 151-157 (1997).
 - **Vijayan E and McCann SM.** Effects of substance P and neurotensin on growth hormone and thyrotropin release *in vivo* and *in vitro*. *Life Sci.* 26: 321-327 (1980).
 - **Villafuerte B, Zhang W-N and Phillips LS.** Insulin and insulin-like growth factor-I regulate hepatic insulin-like growth factor binding protein-3 by different mechanism. *Mol. Endocrinol.* 10: 622-630 (1996).
 - **Villafuerte BC, Zhao W, Herington AC, Saffery R and Phillips S.** Identification of an insulin-responsive element in the rat insulin-like growth factor binding protein-3 gene. *J. Biol. Chem.* 272: 5024-5030 (1997).
 - **Yaffe BM and Samuels HH.** Hormonal regulation of the GH gene. *J. Biol. Chem.* 259: 6284-6291 (1984).
 - **Yeoh SI and Baxter RC.** Metabolic regulation of the growth hormone independent insulin-like growth factor binding protein in human plasma. *Acta*

Endocrinol. 119: 465-473 (1988).

- **Walker P and Dussault JH.** Hypothalamic somatostatin and pituitary and serum growth hormone concentrations during postnatal development in rats exposed chronically to propylthiouracil or a low iodine diet. *J. Dev. Physiol. 2: 111-117 (1980).*
- **Walker P, Dussault JH, Alvarado-Urbina G and Dupont A.** The development of the hypothalamo-pituitary axis in the neonatal rat hypothalamic somatostatin and pituitary and serum GH concentrations. *Endocrinology 101: 782-787 (1977).*
- **Weeke J and Orskov H.** Ultrasensitive radioimmunoassay for direct determination of free triiodothyronine concentration in serum. *Scand. J. Clin. Lab. Invest. 35: 237-244 (1975).*
- **Weinstein SP, O'Boyle E, Fisher M and Haber RS.** Regulation of GLUT2 glucose transporter expression in liver by thyroid hormone: evidence for hormonal regulation of the hepatic glucose transport system. *Endocrinology 135: 649-654 (1994).*
- **Weinstein SP and Haber RS.** Differential regulation of glucose transporter isoform by thyroid hormone in rat heart. *Biochem. Biophys. Acta 1136: 302-308 (1992).*
- **Weinstein SP, Watts J, Graves PN and Haber RS.** Stimulation of glucose transport by thyroid hormone in ARL15 cells: increased abundance of glucose transporter protein and messenger ribonucleic acid. *Endocrinology 126: 1421-1429 (1990).*
- **Weinstein SP, Watts J and Haber RS.** Thyroid hormone increases muscle/fat glucose transporter gene expression in rat skeletal muscle. *Endocrinology 129: 455-464 (1991).*

- **Westermarck K, Alm J, Skottner A and Karlsson A.** Growth factors and the thyroid: effects of treatment for hyper- and hypothyroidism on serum IGF-I and urinary epidermal growth factor concentrations. *Acta Endocrinol.* 118: 415-421 (1988).
- **Wolf M, Ingbar SH and Moses AC.** Thyroid hormone and growth hormone interact to regulate insulin-like growth factor-I messenger ribonucleic acid and circulating levels in the rat. *Endocrinology* 125: 2905-2914 (1989).