

Estudio de la función tiroidea en conejos inmunizados con membrana plasmática tiroidea heteróloga y homóloga

Dra. María E. Rodríguez, Dr. Francisco Baldor

Rodríguez, M.; F. Baldor: *Estudio de la función tiroidea en conejos inmunizados con membrana plasmática tiroidea heteróloga y homóloga.*

Se estudia la función tiroidea en conejos inmunizados con preparaciones de membrana tiroidea heteróloga y homóloga, mediante las determinaciones tiroxina sérica (T_4) y captación de triiodotironina por suero (T_3RU). Se determinan además los niveles de anticuerpos antitiroglobulina (TRC^*) y se analiza histológicamente las glándulas tiroideas de los animales inmunizados. Los resultados obtenidos se comparan con los valores basales, para lo que se utiliza la prueba de rangos con signo de Wilcoxon para una significación $\alpha = 0,05$. Se encontró que los niveles de T_4 comienzan a disminuir significativamente a partir de los 30 días de la inmunización con membrana tiroidea heteróloga, para caer bruscamente hasta valores de $0,02 \mu g/dl$ a los 20, 30 y 45 días de la inmunización con membrana tiroidea homóloga. Los niveles de T_3RU aumentan paralelamente a la disminución de T_4 y los títulos del TRC fueron altamente positivos ($^1: 10\ 000$). No se encontraron cambios evidentes en el examen histológico de las glándulas tiroideas. Se discuten los posibles mecanismos que pudieran explicar el hipotiroidismo autoinmune desarrollado en los animales inmunizados.

INTRODUCCION

En el suero de los pacientes con bocio tóxico difuso (BTD) se ha demostrado la presencia de inmunoglobulinas anormales dirigidas contra el receptor de TSH de la membrana folicular tiroidea, las cuales se consideran de importancia en la patogenia de esta enfermedad.^{1,2}

Por otro lado, se considera actualmente que el BTD y la tiroiditis de Hashimoto son enfermedades autoinmunes y que un defecto en la inmunorregulación pudiera explicar la aparición de las mismas.³

Weigle,⁴ Nakamura⁵ y Kotani,⁶ entre otros investigadores han descrito distintos procedimientos para reproducir tiroiditis autoinmune en animales de laboratorio, sin embargo, no ha sido posible desarrollar hasta el presente un modelo experimental para el estudio del BTD.

⁵ Especialista en Fisiología.

⁶ Especialista en Bioquímica.

El objetivo de nuestro trabajo fue evaluar la función tiroidea en conejos inmunizados con membrana tiroidea, como paso previo en los estudios encaminados al desarrollo de un modelo experimental de BTB.

MATERIAL Y METODO

ANIMALES DE EXPERIMENTACION

Se utilizaron para la inmunización 4 conejos de aproximadamente 3 kg de peso corporal procedentes del centro de cría para animales de experimentación del MINSAP. Los animales fueron mantenidos en jaulas separadas, alimentándoseles con agua y pienso *ad libitum*.

PREPARACION DE MEMBRANA PLASMATICA TIROIDEA

Las membranas se obtuvieron de tiroides frescos de conejo y bovino, los cuales fueron procesados a 4°C, se eliminó el tejido conectivo, cortándolo en pequeños fragmentos que fueron suspendidos en solución amortiguadora TRIS-CLH 3mM, 0,25 sucrosa, 1mMEGTA, 1mM MgCl₂; pH 7,4 [5 ml de solución amortiguadora por gramo de tejido húmedo). La suspensión fue inicialmente homogenizada y en ella se empleó un Polytron (10 s posición 5) y posteriormente en un DOUNCE (10 golpes). A continuación, la suspensión resultante fue filtrada a través de gasa.

El homogenizado se centrifugó a 1 000 x g (10 min) para remover detritus celulares. El sobrenadante obtenido se centrifugó a 5 000 x g (10 min) para remover mitocondrias y núcleos. El nuevo sobrenadante fue centrifugado a 37 000 x g (30 min) para remover las enzimas solubles que pudieran dañar las membranas y el peílet que contenía las membranas fue resuspendido en 1 ml de la misma solución amortiguadora TRIS-CLH 3mM.

Se realizaron determinaciones de proteínas por el método de Lowry y de la enzima de membrana 5' nucleotidasa^a a las fracciones de precipitado y sobrenadante obtenidas de cada centrifugación.

Inmunización

Las preparaciones de membrana de bovino (heteróloga) y de conejo (homóloga) parcialmente purificadas fueron utilizadas como antígeno, preparadas en emulsión con adyuvante completo de Freund (1:1,5) el cual se le inyectó a los animales en múltiples sitios por vía subcutánea.⁹

El esquema de inmunización fue el siguiente: Los conejos recibieron una inyección que contenía aproximadamente 1 mg de proteína de membrana. Después de la inyección inicial fueron inmunizados a los 10 y 21 días con 0,5 mg de proteína por vía intramuscular. Estas inmunizaciones se hicieron con las preparaciones de membrana heteróloga tiroidea. Terminada ésta, se descansa un período de 3 semanas y se Inmunizaron nuevamente en igual forma, pero utilizando membrana de tiroidea homóloga.

Valoración de la función tiroidea

A cada animal se le realizó extracción de sangre por punción de la vena del lóbulo de la oreja antes de comenzar la inmunización, a los 20 y 30 días de la inmunización con membrana homóloga.

Los sueros obtenidos fueron almacenados a -20°C hasta su procesamiento.

Se determinaron los niveles séricos de tiroxina (CT_4) por RIA¹⁰ y captación sérica de triiodotironina (T_3RU)^U en condiciones basales y posinmunización para evaluar la función tiroidea del animal.

Se realizaron, además, determinaciones de anticuerpos antitiroglobulina (TRC) por el método de Fulthorpe¹² A los 21 días de terminada la última inmunización los animales fueron sacrificados y se les extrajo la glándula tiroidea para su estudio histológico.

El análisis estadístico de los resultados se realizó mediante la prueba de los rangos signo de Wilcoxon para una significación de $\alpha = 0,05$.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos para la tiroxina sérica y captación sérica de triiodotironina se muestran en la tabla y en las figuras 1 y 2. Como puede observarse los valores en los niveles de T_4 , antes de comenzar la inmunización fueron de 1,1; 2,9; 1,9; 1,7 $\mu\text{g/dl}$ para los conejos 1, 2, 3 y 4 respectivamente. A los 20 días de la primera inmunización los niveles séricos se mantuvieron similares, pero a partir de los 30 días de inmunizados con membrana tiroidea heteróloga, 2 veces, los valores de T_4 disminuyeron significativamente y observamos una caída brusca en los niveles de T_4 a los 20 días de iniciada la inmunización con membrana tiroidea homóloga, los cuales se mantuvieron muy bajos (0,02 $\mu\text{g/dl}$) a los 30 y 45 días posinmunización.

Tabla. Niveles de tiroxina (T_4) y captación sérica de triiodotironina (T_3RU) en conejos inmunizados con membrana tiroidea heteróloga y homóloga.

Días inmunización [^]	Conejo No. 1		No. 2		No. 3		No. 4		
	T_4 ($\mu\text{g/dl}$)	T_3RU (%)	T_4 ($\mu\text{g/dl}$)	T_3RU (%)	T_4 ($\mu\text{g/dl}$)	T_3RU (%)	T_4 ($\mu\text{g/dl}$)	T_3RU (%)	
0	1,1	80	2,9	72	1,9	74	1,7	76	
Heteróloga									
20	1,0	82	2,4	81	1,8	83	1,3	88	
30	0,92	101	0,87	107	0,98	97	0,81	106	
Homóloga									
20	0,02	182	0,02	117	0,02	188	0,02	182	
30	0,02	191	0,02	174	0,02	188	0,02	179	
45	0,02	191	0,02	181	0,02	191	0,02	182	

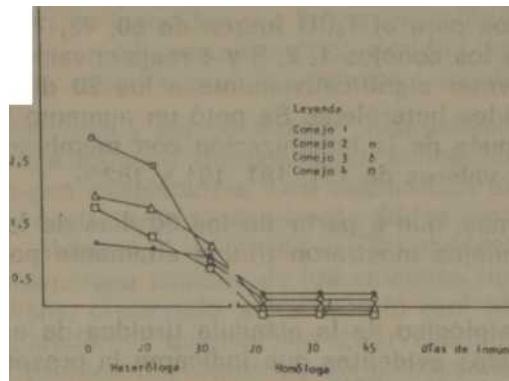


Figura 1. Niveles de tiroxina sérica (T₄) en conejos inmunizados con membrana plasmática tiroidea homologa y heteróloga.

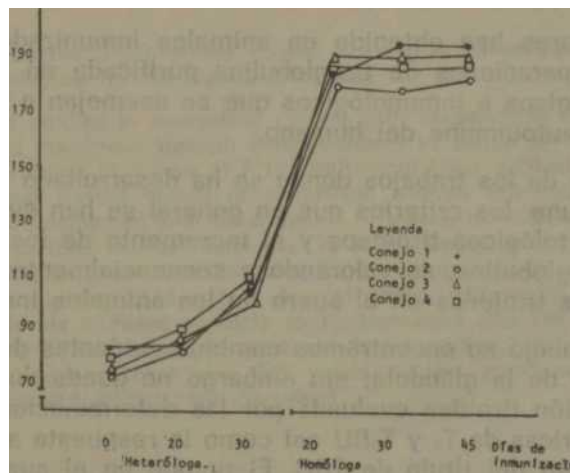


Figura 2 Captación sérica de triiodotironina (T₃FIU) en conejos inmunizados con membrana plasmática tiroidea homologa y heteróloga.

Paralelamente a esta disminución en los niveles de T_4 , observamos que los valores obtenidos para el T_3RU fueron de 80, 72, 74 y 76% en condiciones basales para los conejos 1, 2, 3 y 4 respectivamente. Estos valores comenzaron a aumentar significativamente a los 20 días de inmunizados con membrana tiroidea heteróloga. Se notó un aumento brusco en los niveles de T_3RU después de la inmunización con membrana tiroidea homóloga hasta alcanzar valores de 191, 181, 191 y 182%.

Se encontró, además, que a partir de los 30 días de la primera inmunización todos los conejos mostraron títulos altamente positivos ($1:10\ 000$) del TRC.

En el examen histológico de la glándula tiroidea de estos animales no se observaron cambios evidentes que indicaran la presencia de una tiroiditis ni de estimulación por TSH.

DISCUSION

Los resultados encontrados establecen que los animales inmunizados desarrollan un hipotiroidismo al parecer de causa autoinmune, lo cual se manifiesta por la disminución de los niveles de T_4 , aumento del T_3RU y el TRC positivo en los 4 conejos inmunizados. Las variaciones bruscas en los valores de T_4 y de T_3RU después de la inmunización con membrana tiroidea homóloga pudiera explicarse por el hecho de que la inmunización previa con membrana heteróloga sensibilizó a los animales a la posterior inmunización con membrana homóloga, lo cual coincide con la observación de *Weigle y colaboradores*² en relación con las inmunizaciones con tiro- globulina heteróloga y homóloga.

Distintos autores han obtenido en animales inmunizados con extracto tiroideo¹⁴ y preparaciones de tiroglobulina purificada en grado variable¹⁵ cambios histológicos e inmunológicos que se asemejan a los encontrados en la tiroiditis autoinmune del humano.

En la mayoría de los trabajos donde se ha desarrollado tiroiditis experimental autoinmune, los criterios que en general se han evaluado han sido los cambios histológicos tiroideos y el incremento de los títulos de anticuerpos antitiroglobulina, no valorándose secuencialmente las variaciones de las hormonas tiroideas en el suero de los animales inmunizados.

En nuestro trabajo no encontramos cambios evidentes de la imagen histológica normal de la glándula; sin embargo, no queda duda de la depresión de la función tiroidea evaluada por las determinaciones de las concentraciones séricas de T_4 y T_3RU así como la respuesta autoinmune dada por el incremento del título de TRC. El tiempo en el cual desarrollamos la experiencia, que fue relativamente corto, pudiera, no obstante explicar la ausencia de los cambios histológicos propios de la tiroiditis experimental autoinmune.

*Endo y colaboradores*¹⁶ han detectado en el suero de pacientes, clínicamente hipotiroideos, con tiroiditis de Hashimoto la presencia de inmunoglobulinas inhibitoras del enlace TSH-receptor, pero sin acción estimula-

dora, lo que pudiera sugerir que nuestros animales tuvieran anticuerpos circulantes de este tipo inducidos por la inmunización de los mismos con las preparaciones de membrana plasmática tiroidea, lo que pudiera explicar el hipotiroidismo observado en los conejos inmunizados.

Por otro lado *Consiglio y colaboradores*⁷ han señalado que las preparaciones de membrana folicular tiroidea están contaminadas en un porcentaje no precisado con tiroglobulina. Una explicación alternativa sería que la tiroglobulina presente como contaminante de las preparaciones de membrana bloquee o inhibiera el enlace de la TSH endógena a sus receptores presentes en la membrana tiroidea de los animales inmunizados, que provoca el hipotiroidismo observado, a favor de lo cual están los trabajos de *Hashizume y colaboradores*¹⁸ quienes han observado *in vitro* que en la membrana plasmática tiroidea hay sitios de unión específicos para la tiroglobulina y que el enlace de esta proteína a los mismos inhibe la unión de la TSH por un mecanismo no competitivo.

De acuerdo con estos resultados es necesario poder determinar los niveles de inmunoglobulinas del enlace TSH-receptor así como hallar un método adecuado que permita la completa separación de la tiroglobulina que contamina las preparaciones de membrana folicular tiroidea.

Los trabajos de *Endo y colaboradores*¹⁹ que han demostrado la presencia de receptores de TSH en los adipocitos pudieran ser de fundamental importancia en el desarrollo de un modelo experimental para el estudio del bocio tóxico difuso.

SUMMARY

Rodríguez, M.; F. Baldor. *Study of the thyroid function in immunized rabbits with heterologous and homologous thyroid plasma membrane.*

Thyroid function is studied in immunized rabbits with preparations of heterologous and homologous thyroid membrane through determinations of serum thyroxine (T_4) and cap- tation of triiodothyroxine in serum (T_3RU). Antithyroglobulin antibody levels (TRC) are also determined and thyroid glands of immunized animals are histologically analyzed. Results obtained are compared with basal values of means of Wilcoxon's test for ranges with signs, for $\alpha = 0,05$. It was found that T_4 levels begin to decrease significantly at the 30 days of immunization with heterologous thyroid membrane, falling down abruptly to 0,02 $\mu\text{g/dl}$ values at the 20,30 and 45 days of immunization with homologous thyroid membrane. T_3RU levels increase parallelly to T_4 decrement and TRC titers were highly positive (1: 10 000). Evident changes were not found at the histologic examination of thyroid glands. Possible mechanisms that would explain autoimmune hypothyroidism developed in immunized animals are discussed.

RÉSUMÉ

Rodríguez, M.; F. Baldor. *Etude de la fonction thyroïdienne sur des lapins immunisés avec membrane plasmatique thyroïdienne hétérologue et homologue.*

Il est étudié la fonction thyroïdienne sur des lapins immunisés avec des préparations de membrane thyroïdienne hétérologue et homologue, au moyen du dosage de la thyroxine sérique (T_4) et de la détermination du captage de triiodothyronine par le sérum (T_3RU). Il est aussi réalisé le dosage les taux d'anticorps antithyroglobuline (TRC) et il est analysé les glandes thyroïdes des animaux immunisés du point de vue histologique. Les résultats obtenus sont comparés avec les valeurs basales au moyen de l'épreuve d'amplitude avec signe de Wilcoxon, la significaron étant $\alpha = 0,05$. Il a été constaté que les niveaux de T_4 commencent à diminuer significativement à partir du 30e jour de l'immunisation avec membrane thyroïdienne hétérologue et qu'il se produit une chute brusque vers des valeurs de 0,02 $\mu\text{g/dl}$ au bout de 20, 30 et 45 jours de l'immu- nisation avec membrane thyroïdienne homologue. Les niveaux de T_3RU augmentent parallèlement à la diminution de T_4 et les titres du TRC ont été tres positifs 1: 10,000). Il n'a pas été trouvé de changements évidents lors de l'examen tissulaire des glandes thyroïdes. Les possibles mécanismes qui pourraient expliquer l'hypothyroïde auto-immune développée chez les animaux immunisés sont discutés.

BIBLIOGRAFIA

1. *Adams, D. S.; T. H. Kennedy:* Evidence to suggest that LATS-protector stimulates the human thyroid gland. *J Clin Endocrinol Metab* 33: 47, 1971.
2. *Onaya, T. M. et al.:* New in vitro test to detect the thyroid stimulator in sera from hyperthyroid patients by measuring colloid droplet formation and cyclic AMP in human thyroid slices. *J Clin Endocrinol Metab* 36: 859, 1973.
3. *Kidd, A. et al.:* Immunologic aspects of Graves' and Hashimoto's diseases. *Metabolism* 29: 80, 1980.
4. *Weigle, W. O.; R. M. Nakamura:* The development of autoimmune thyroiditis in rabbits following injection of aqueous preparations of heterologous thyroglobulins. *J Immunol* 99: 223, 1967.
5. *Nakamura, R. M.; W. O. Weigle:* Passive transfer of experimental autoimmune thyroiditis from donor rabbits injected with soluble thyroglobulin without adjuvant. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 32: 506, 1967.
6. *Kotani, T. et al.:* Autoimmune thyroiditis in the rat induced by thymectomy and low doses of irradiation. Nature of effector cells and demonstration of antifollicular epithelial cell autoantibodies. *Clin Immunol and Immunopathol* 24: 111, 1982.
7. *Lowry, D. H. et al.:* Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 243: 5385, 1951.
8. *Wattiaux-De Coninck, S.; R. Wattiaux:* Nucleoside diphosphatase activity in plasma membrane of rat liver. *BBA* 183: 119, 1969.
9. *Vaitukaitis, J.; J. B. Robbins; E. Nieschag; G. T. Ross:* A method for producing specific antisera with small doses of immunogen. *J Clin Endocrinol Metab* 33: 988, 1971.
10. *Mitsuma, T. M. et al.:* Rapid simultaneous radioimmunoassay for triiodothyronine and thyroxine in unextracted serum. *Bioch and Biophys Res Com* 46: 2107, 1972.
11. *Baldor, F. y col:* Método para determinar la captación de triiodotironina 1251 por suero. *Revista Ciencias Biológicas* 12: 1, 1981.
12. *Fulthorpe, A. J. et al.:* A stable sheep cell preparation for detecting thyroglobulin auto-antibodies and its clinical applications. *J Clin Pathol* 14: 654, 1961.
13. *Weigle, W. O.; C. C. Romball:* Humoral and cell-mediated immunity in experimental Progressive thyroiditis in rabbits. *Clin Exp Immunol* 21: 351, 1975.
14. *Terplan, K. L. et al.:* Experimental thyroiditis in rabbits, guinea pigs and dogs, following immunization with thyroid extracts of their own and of heterologous species. *Am J Pathol* 36: 213, 1960.
15. *Ringertz, B. et al.:* Cellular and humoral immune responses in experimental autoimmune thyroiditis. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 40: 917, 1971.

16. *Endo, K. et al.*: Detection and properties of TSH-binding inhibition immunoglobulins in patients with Graves' disease and Hashimoto's thyroiditis. *J Clin Endocrinol Metab* 46: 734, 1978.
17. *Consiglio, E. et al.*: Thyroglobulin interaction with thyroid plasma membranes. The existence of specific receptors and their potential role. *J Biol Chem* 254: 5065, 1979.
18. *Hashizume, K. et al.*: Thyroglobulin inhibition of thyrotropin binding to thyroid plasma membrane. *J Clin Endoc Metab* 46: 679, 1978.
19. *Endo, K.; S. M. Amir; S. H. Ingbar*: Development and evaluation of a method for the partial purification of immunoglobulins specific for Graves's disease. *J Clin Endocrinol Metab* 52: 1113, 1981.

Recibido: 12 de julio de 1984.

Aprobado: 8 de enero de 1985.

Dra. *María E. Rodríguez*

Instituto Nacional de Endocrinología

Zapata y D, Vedado

Ciudad de La Habana

Cuba