

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS



**DETERMINACION RADIOINMUNOMETRICA DE
VALORES NORMALES DE TRIYODOTIRONINA
(T₃) Y TIROXINA (T₄) EN DOS GRUPOS VER-
TEBRADOS DE CONSUMO HUMANO: BOVINOS
Y CAPRINOS.**

T E S I S P R O F E S I O N A L

P A R A O B T E N E R E L T I T U L O D E

L I C E N C I A D A S E N B I O L O G I A

P R E S E N T A N

**CARMEN Y. ACEVES VELASCO
GUADALUPE LEGARRETA FADRIQUE**

1 9 8 2



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

OBJETIVOS

I FISILOGIA Y FILOGENIA DE LA GLANDULA TIROIDES

A. Aspectos Morfofuncionales

A.1. Metabolismo del Yodo y Síntesis de las Hormonas Tiroideas

A.2. Secreción de Hormonas Tiroideas

A.3. Mecanismos de Acción

A.4. Regulación de la Función Tiroidea

B. Aspectos Filogenéticos

B.1. Vegetales

B.2. Invertebrados

B.3. Precordados y Vertebrados

II RADIOINMUNOANALISIS

A. Aspectos Generales y Antecedentes

B. Principios del Radioinmunoanálisis

B.1. Aspectos Físicoquímicos

B.2. Bases Cinéticas del RIA

C. Metodología

C.1. Radiomarcaje del Antígeno

C.2. Obtención de Anticuerpos

C.3. Separación de las Fracciones Unida y Libre

C.4. Representación Gráfica

D. Estandarización y Control de Calidad del RIA

D.1. Precisión

D.2. Sensibilidad

D.3. Especificidad

D.4. Exactitud

D.5. Reproducibilidad

E. Radioinmunoanálisis de Hormonas Tiroideas

E.1. Antecedentes

E.2. RIA en Mamíferos

III MATERIAL Y METODO

A. Material

A.1. Material Biológico

A.2. Material Químico

A.3. Material de Cristal y Aparatos

B. Metodo

B.1. Curva Estandar

B.2. Concentración Empleada del Antígeno Marcado

B.3. Empleo del Anticuerpo

C. Metodología

C.1. Titulación del Anticuerpo

C.2. Preparación de Muestras

C.3. Preparación de Solución Estándar

C.4. Preparación de Soluciones ^{125}I -Tiroxina y ^{125}I -Triyodotironina

D. Realización del RIA

D.1. Terminología Utilizada en el RIA

D.2. Separación de Fracciones Unida (U) y Libre (L)

D.3. Graficado

IV RESULTADOS

A. Validación del RIA

B. Valores Normales de Hormonas Tiroideas

C. Variaciones Fisiológicas de Tiroxina en Ganado Bovino

V DISCUSION

VI CONCLUSIONES

VII BIBLIOGRAFIA

OBJETIVOS.

El propósito de este trabajo, implícito en su título, es establecer los valores normales de las hormonas tiroideas (HT) en el suero de dos grupos vertebrados de consumo humano: Bovinos y Caprinos. Conocer los valores normales de éstas hormonas no sólo satisface un interés meramente académico, tiene como objetivo inmediato el sentar bases experimentales concretas para realizar estudios posteriores encaminados a conocer la probable participación de las HT en los procesos de producción animal. Varios autores (1-5) han sugerido la participación de éstas, además de otras hormonas, en el proceso de la lactación en diversas especies mamíferas.

Las hormonas tiroideas ejercen un amplio número de acciones y efectos biológicos, sin embargo su principal papel fisiológico es la regulación del metabolismo celular en la mayoría de los tejidos corporales. Actualmente se reconoce que las HT regulan la oxidación de carbohidratos y grasas, la formación de componentes enzimáticos esenciales y la síntesis de proteínas estructurales y de "exportación", dando como resultado el crecimiento, desarrollo y conservación óptima de los organismos (6-9). Conviene aclarar que el proceso de la lactación es multifactorial y se conoce la participación de cuando menos los siguientes: 1 factores hormonales; 2 factores nutricionales; 3 factores conductuales y 4 factores ambientales. Además entre los factores endócrinos se ha estudiado con mayor detalle la participación de hormonas hipofisarias, por ejemplo, prolactina y hormona de

crecimiento; o bien, de algunos esteroides, como son, estrógenos y cortisol (10-12).

Con el propósito de hacer más clara la importancia del trabajo, se decidió revisar en una primera sección y de manera breve, algunos aspectos sobre la fisiología y filogenia de la glándula tiroides. A continuación se describen los principios fundamentales del Radioinmunoanálisis (RIA). Posteriormente se desglosa el protocolo de trabajo y la metodología específica. Así, en la siguiente sección se presentan los resultados obtenidos, para terminar con su análisis y discusión en el contexto de la información pertinente que existe en la literatura científica sobre éste particular.

I. FISILOGIA Y FILOGENIA DE LA GLANDULA TIROIDES

Cabe hacer notar que prácticamente todos los conocimientos actuales sobre la glándula, así como los detalles respecto a la síntesis, metabolismo y mecanismos de acción de las hormonas tiroideas, se han derivado de estudios realizados en roedores y en primates, principalmente en el hombre. Y no es, sino hasta hace pocos años, cuando la endocrinología comparada ha tomado un papel importante en el aporte de conocimiento en esta rama de la investigación, por lo cual el material bibliográfico es muy escaso con respecto a otros organismos que no sean el hombre o bien animales de laboratorio.

A. Aspectos Morfofuncionales.

La primera descripción de la glándula tiroides fué hecha en China hace más de 3000 años. Sin embargo es hasta 1520 cuando la cultura occidental retema este conocimiento e introduce entre otros, los términos, cretinismo, para referirse a aquellos pacientes con el síndrome caracterizado por anomalías somáticas y retraso psicomotor; hipotermia, para referirse a una baja en la temperatura corporal y mixedema, para definir la retención anormal de agua y proteínas en el cuerpo de algunos adultos, además de otras alteraciones en el metabolismo general (6).

En la mayoría de los mamíferos la glándula está formada por folículos encapsulados por tejido conectivo ricamente vascularizado por una densa red capilar que los rodea. La glándula tiroides que tiene un origen endodérmico se deriva de la formación de un botón ventral en el piso de la faringe embrionaria, entre la primera y segunda bolsa faríngea. La glándula inicialmente se diferencia como un cordón celular que después se separa formando un acino que dará origen a los folículos tiroideos. Las células del acino secretan un fluido llamado "coloide tiroideo" cuyo componente principal es la tiroglobulina que se acumula extracelularmente en el centro del acini. Al espacio donde es secretado este coloide se le conoce como luz del folículo. A las células del epitelio folicular se les puede distinguir dos porciones: la porción apical que rodea la luz del folículo y la porción basal que está en contacto con la red capilar. (ver fig. 1). Adyacentes a los foli

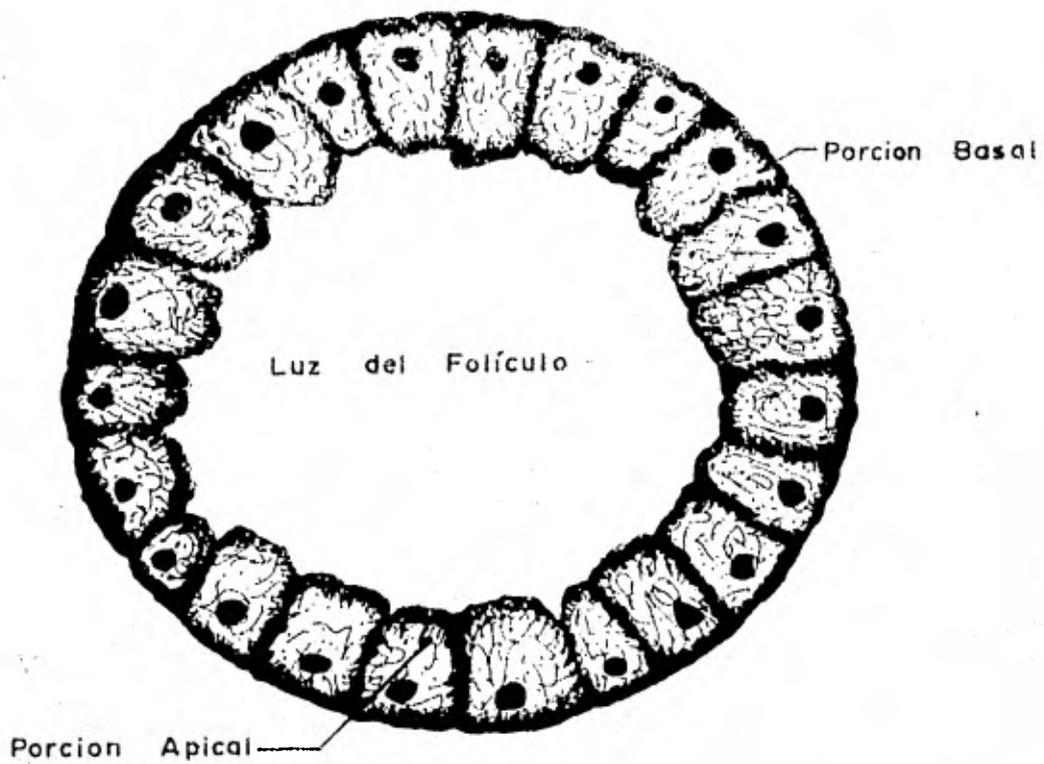


FIGURA 1. Folículo tiroideo

culas se encuentran las células parafoliculares o células "C" que se originan de otro derivado faríngeo: el cuerpo último branquial. Estas células sintetizan y secretan la hormona calcitonina que participa en el metabolismo del Ca^{++} . En algunos mamíferos la glándula paratiroides puede estar embebida en el tejido tiroideo o bien formar otra glándula como tal (13).

A.1. Metabolismo del Yodo y Síntesis de las Hormonas Tiroideas. El aporte principal del yodo inorgánico es la dieta. El yodo es absorbido por el intestino para pasar a la sangre y posteriormente es acumulado por las células foliculares tiroideas mediante un mecanismo de transporte activo conocido como "bomba de yodo". Una vez que el yodo es capturado a nivel de la membrana basal de las células del epitelio folicular, se convierte en yodo orgánico y posteriormente se une a los residuos de tirosina que se encuentran en la tiroglobulina (6, 13).

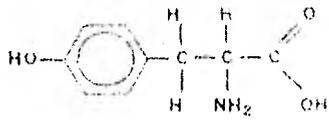
La tiroglobulina (Tgb) es una glucoproteína globular de peso molecular de aproximadamente 600,000 d. se conoce que cada molécula de Tgb contiene 115 residuos de tirosina y que su síntesis ocurre en el retículo endoplásmico rugoso de las células foliculares. Aparentemente los residuos de tirosina son incorporados a la tiroglobulina y luego son yodados. La naturaleza química del yodo orgánico u "yodo activo" no ha sido determinada con certeza, pero se cree que es formado en las células foliculares por un sistema enzimático de peroxidasas que involucra la oxidación de glucosa y la reducción de nucleótidos pirimídicos para formar peróxido de hidrógeno (H_2O_2). El yodo reacciona con el peróxido y se forma

el yodo activo, el cual es unido inmediatamente a los residuos de tirosina contenidos en la molécula de tiroglobulina (6) ver figura 2.

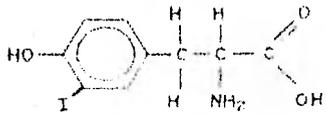
La unión del yodo a la tirosina en posición 3 da como resultado la formación de 3-monoyodotirosina (MIT), un segundo yodo puede ocupar la posición 5 en la misma MIT dando la conversión a 3, 5-diyodotirosina (DIT).

Se cree que por la conjunción de una molécula de MIT y una de DIT por medio de una unión covalente se origina la 3,5,3'-triyodotironina (T_3). Y de igual manera la unión de dos moléculas de DIT dan por resultado a la tiroxina (T_4). La T_3 y la T_4 son las dos formas que presentan actividad hormonal. Se conoce que la glándula sintetiza otra tironina: un isómero de la T_3 , el cual aparentemente se forma en mayor cantidad en el hígado a partir de la desyodación de la tiroxina. En este isómero el yodo ocupa la posición 3,3',5 y por esta razón se le conoce como T_3 reversa (rT_3). Hasta la fecha no se le ha detectado actividad biológica (6). (Ver fig. 3). Unicamente el 30% del yodo total combinado con tirosina en la tiroides está en forma de T_3 y T_4 , el resto está en forma de MIT y DIT.

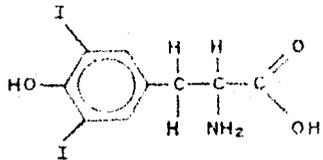
A.2. Secreción de Hormonas Tiroideas. La síntesis y secreción de las hormonas tiroideas está regulada por una hormona de la hipófisis anterior conocida como: hormona estimulante de la tiroides o tirotropina (TSH). Esta hormona además de regular el metabolismo de las células tiroideas, estimula la captación y oxidación del yodo, así como la síntesis y la secreción de T_3 y T_4 . Se ha observado que al estimular a la tiroides con TSH, las células foliculares endocitan par



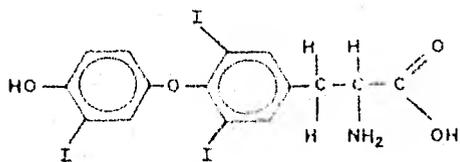
Tirosina



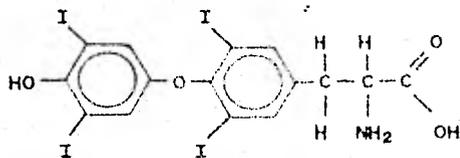
3-Monoyodotyrosina (MIT)



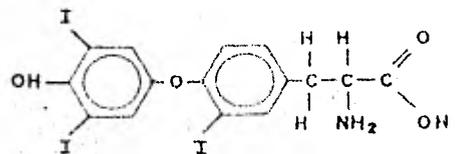
3,5-Diiodotyrosina (DIT)



3,5,3'-Triiodotironina (T_3)

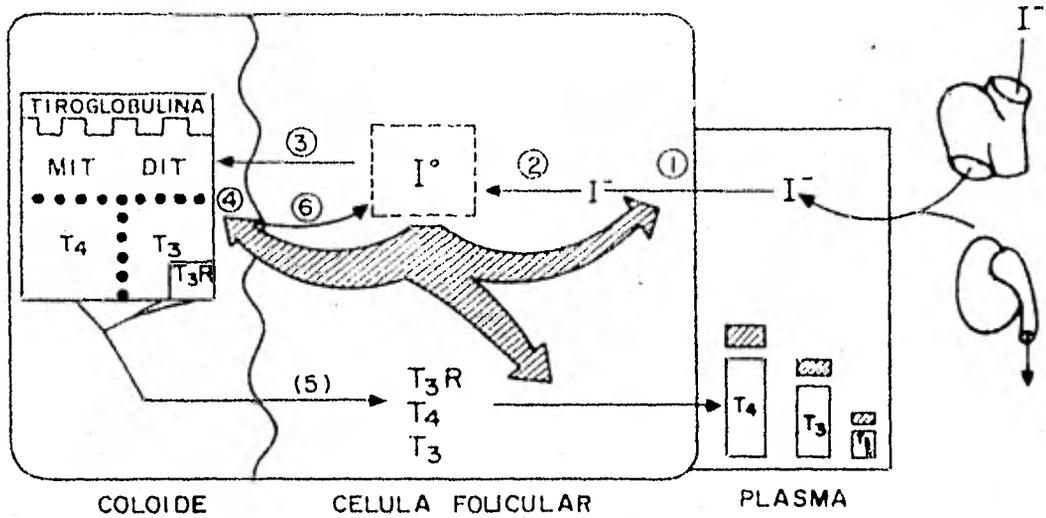


3,5,3',5'-Tetraiodotironina (T_4)



3,3',5'-Triiodotironina reversa (rT_3)

FIGURA 2. Biosíntesis de las Hormonas Tiroideas.



- | | |
|-----------------------------------|--|
| 1.-CAPTACION YODO (BOMBA DE YODO) | 6.- DESYODACION |
| 2.-OXIDACION |  EFECTO INHIBIDOR YODO |
| 3.-ORGANIFICACION | I ⁻ YODO INORGANICO |
| 4.-ACOPLAMIENTO | T3R TRIYODO TIRONINA INVERSA |
| 5.-PROTEOLISIS |  HORMONA TIROIDEA LIBRE |

FIGURA 3. Estructura química de los compuestos yodados elaborados por la glándula tiroides.

te del coloide en donde se encuentran la tiroglobulina yodada (MIT, DIT, T_3 y T_4) y aminoácidos. Estas gotas de coloide migran de la posición apical hacia la porción basal de las células foliculares donde se asocian a lisosomas formando fagolisosomas. Se cree que dentro de estos se lleva a cabo la hidrólisis de la tiroglobulina (Tgb), lo que ocasiona la liberación de MIT, DIT, T_3 y T_4 , las cuales difunden dentro del citosol. Esencialmente solo la Tgb, la T_3 y la T_4 son liberadas de la célula hacia los vasos capilares que rodean el folículo (6). Se conoce que una enzima citoplásmica desyoda e hidroliza MIT y DIT para formar yodo inorgánico y tirosina. Esta desyodación de MIT y DIT es aparentemente un mecanismo de conservación de yodo para después reutilizarlo en la formación de nuevas hormonas, ya que la tirosina yodada no puede ser usada en la síntesis de la tiroglobulina (9).

Una vez secretadas, las hormonas tiroideas son transportadas en la sangre por tres proteínas plasmáticas: la proteína fijadora de tiroxina (TBG) que une cerca del 75% de las hormonas, la prealbúmina y la albúmina que unen el 15 y 10% de la hormona respectivamente, en esta forma solamente una fracción muy pequeña (menor del 1%) de T_3 y T_4 circulan en forma libre (9).

En contraste con las hormonas peptídicas, las cuales presentan un recambio metabólico rápido con una vida media biológica de minutos, las hormonas tiroideas al igual que los esteroides, presentan un recambio metabólico lento y una vida media biológica larga.

En el hombre (14) se ha demostrado que el recambio total de T_4 se realiza en una semana aproximadamente, mientras que el de T_3 ocurre aproximadamente cada 24 horas. Estudios semejantes en bovinos han mostrado que el recambio de las hormonas tiroideas, es más rápido cuando estos animales se encuentran lactando (15).

Estos estudios sobre la velocidad de recambio hormonal, así como el hecho de que la T_3 tenga una menor afinidad a las proteínas plasmáticas; permite comprender por qué esta hormona penetra más rápidamente a las células (cerca de 20 veces más rápido que la T_4) (6), y por qué aunque sus niveles circulantes son más bajos, la T_3 es de 3 a 5 veces más activa.

A. 3. Mecanismos de Acción. Las hormonas tiroideas penetran a las células por difusión pasiva al igual que los esteroides, pero difieren de éstos en que las hormonas tiroideas no parecen unirse a ningún receptor citoplásmico, sino que penetran directamente al núcleo, en donde estimulan la síntesis de mRNA específico fig. 4.

Se ha postulado (16, 17), que esta estimulación puede llevarse a cabo al unirse la T_3 a las histonas y no a las no histonas, y así llevar a cabo la acción de la RNA-polimerasa, que iniciará la síntesis de mRNA.

Se ha encontrado hasta el momento, que la única hormona tiroidea que puede penetrar al núcleo es la T_3 y por tal razón se sugiere que la T_4 sufre una -

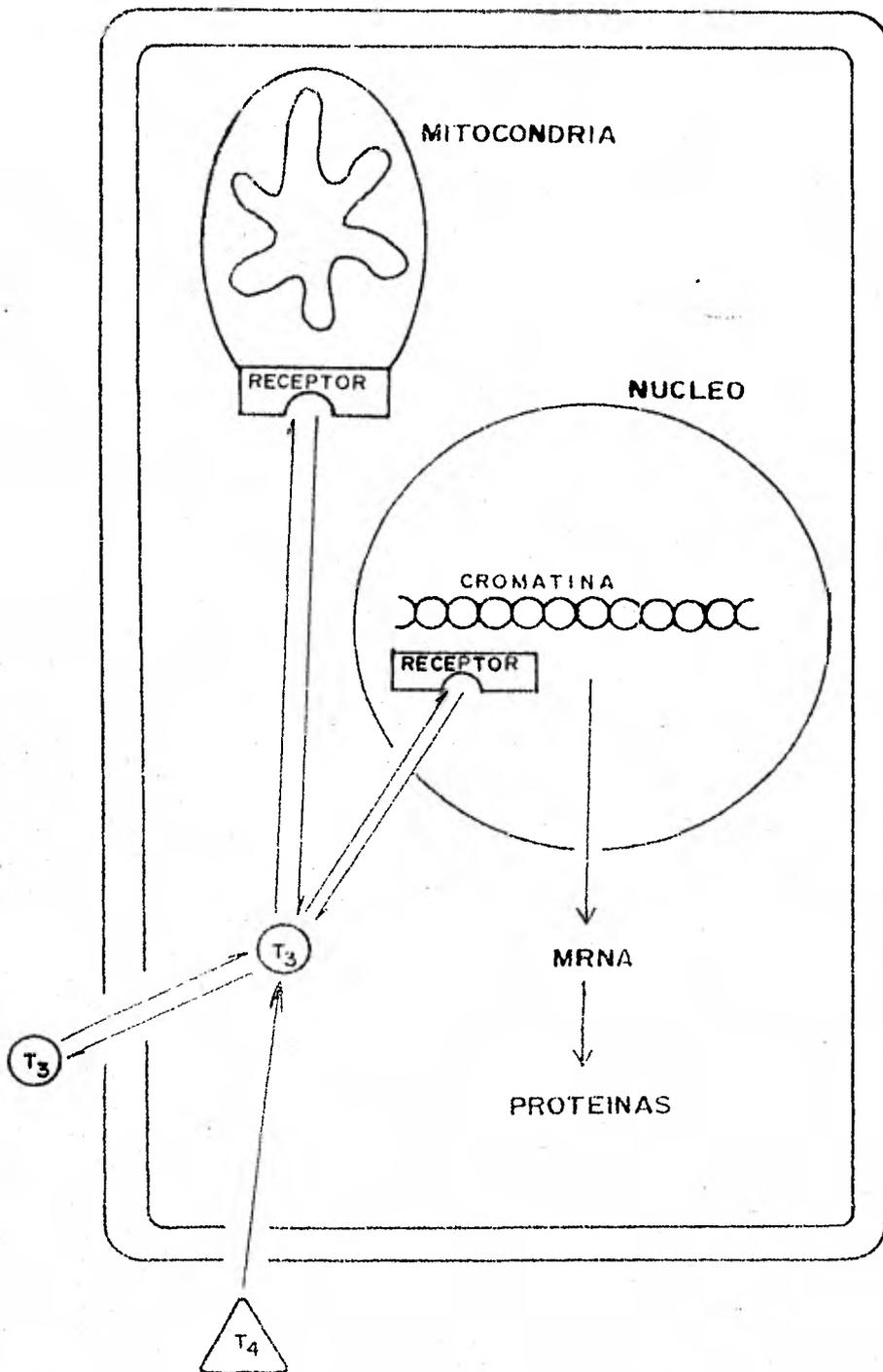


FIGURA 4. Mecanismos de acción de las hormonas tiroideas.

desyodación en el citoplasma transformándose en la forma activa, y así puede - penetrar al núcleo (17). Sin embargo se ha comprobado que solamente de un 33 a 40 % de la T_4 que se desyoda se convierte a T_3 , de un 15 a 20 % a ácido tetrayodotiroacético (TA_4), y cerca de un 50 % se convierte a rT_3 . En las dos últimas no se ha encontrado significancia fisiológica.

Con ésta información, se ha planteado que la T_4 pueda ser un precur sor hormonal, la T_3 la hormona activa y finalmente, que la rT_3 y el TA_4 , puedan tener algún significado fisiológico aún desconocido (5).

También se ha propuesto que las hormonas tiroideas tengan un papel extranuclear, ya que a altas concentraciones influyen en el transporte de amino ácidos cuando la síntesis de proteínas está bloqueada (6).

Se ha comprobado que las hormonas tiroideas tienen sitios de unión en las membranas de la mitocondria, por lo tanto, es probable que se trate de re ceptores específicos que produzcan efectos en la fosforilación oxidativa y en la síntesis de proteínas mitocondriales (17) ver figura 4.

A. 4. Regulación de la Función Tiraidea. Como se mencionó anteriormen te, la TSH regula la función de la glándula tiroides; a su vez, la TSH está regula da por una hormona hipotalámica denominada hormona liberadora de tirotropina (TRH). El control de este mecanismo o eje funcional hipotálamo-hipófisis-tiroi des, es realizado en parte por las mismas hormonas tiroideas, que parecen actuar

a través de procesos de retroalimentación en dos niveles: 1, por acción directa sobre la hipófisis, mediante un mecanismo de retroalimentación (que puede ser positivo o negativo según el caso). Se ha postulado que la T_3 al entrar al núcleo del tirotrópo ó célula tiroidea, regula la síntesis de una proteína inhibidora del efecto estimulante del TRH (18); 2, por acción indirecta actuando a nivel del hipotálamo, este mecanismo considera que el aumento del metabolismo celular provocado por las hormonas tiroideas, aumenta la temperatura de las células del centro termorregulador hipotalámico. La hipotermia en éste centro disminuye la producción de TSH y de tiroxina, de manera que así se restablecen los niveles normales y viceversa (18). Sin embargo, existen evidencias experimentales, que sugieren que las hormonas tiroideas estimulan a nivel hipotalámico la síntesis y secreción de TRH. Este efecto puede ser a nivel tanto de las neuronas TRH-érgicas, como de las neuronas aminérgicas que "inervan" a las primeras (14).

Otro control de la función tiroidea que se deriva de los estudios anatómicos y fisiológicos de Melander y col. (19) es la regulación simpática ejercida por las fibras nerviosas adrenérgicas que rodean los folículos tiroideos, lo cual sugiere que estas monoaminas aromáticas (norepinefrina y dopamina) pueden estimular la síntesis de hormonas tiroideas por acción directa en los receptores α -adrenérgicos en las células foliculares de la glándula.

B. Aspectos Filogenéticos

En esta sección se propone hacer una síntesis de los conocimientos

que se han obtenido acerca de la glándula tiroidea y sus hormonas en los diferentes grupos de la escala zoológica.

En los cuadros 1 y 2 se resume la información disponible sobre éste particular. Sin embargo, hemos considerado pertinente hacer notar algunos puntos importantes:

- Hemos observado que la información además de ser escasa, se encuentra dispersa, ya que no existe ningún estudio sistemático que hable de la función de las hormonas o bien de los compuestos encontrados en los diferentes organismos, - principalmente en invertebrados (20 - 23).
- Existe información sobre algunos organismos que contienen compuestos yodados y/u hormonas, sin mencionar su localización anatómica (20 - 24).
- En la mayoría de las publicaciones sólo se identifica la morfología de la glándula y la presencia de hormonas (20 - 26) y en aquellas en las que se cuantifican las hormonas (1-5, 26, 27), solamente se incluyen peces óseos, aves y - mamíferos.
- Casi en todas las publicaciones, los métodos utilizados cualitativos y/o semi-cuantitativos son: cromatografía en papel, rastreo de yodo radioactivo, electroforesis en gel de agarosa, electroforesis en papel y muy pocos trabajos emplean métodos cuantitativos como el radioinmunoanálisis (2-5, 28).

B.1. Vegetales. El grupo más primitivo en el cual se han encontrado compuestos yodados, como MIT y DIT, son las algas (6).

CUADRO 1.
 PRESENCIA DE YODOTIROSINAS Y/O YODOTIRONINAS EN
 DIFERENTES GRUPOS DE INVERTEBRADOS Y ALGAS *

SUBPHYLUM	CLASE	GLANDULA U OTROS	SINTESIS DE YODO TIROSINAS Y YODO TIRONINAS
ALGAS		NO SE CONOCE	MIT y DIT
PORIFEROS	ESPONJAS	NO SE CONOCE	MIT y DIT
CNIDARIOS	CORALES	NO SE CONOCE	MIT, DIT
CNIDARIOS	CELENTERADOS (MEDUSA)	NO SE CONOCE	MIT, DIT, T ₃ y T ₄
MOLUSCOS	PLANORBIS	NO SE CONOCE	MIT, DIT, T ₃ y T ₄
ANNELIDOS	POLIQUETOS (NEREIS)	NO SE CONOCE	MIT, DIT, T ₃ y T ₄
ARTROPODOS	INSECTOS	NO SE CONOCE	MIT, DIT y T ₄

* En ninguna de ellas se hace referencia a la fijación de yodo inorgánico por otros tejidos.

CUADRO 2

PRESENCIA DE ENDOSTILO O DE GLANDULA TIROIDES, ASI COMO FIJACION DE YODO INORGANICO EN PRECORDADOS Y VERTEBRADOS

SUBPHYLUM	CLASE	GLANDULA U OTROS	SINTESIS DE YODO TIROSINA Y YODO TIRONINA	FIJACION DE YODO INORGANICO
Hemicordados	Balanoglossus	Endostilo	No se conoce	No se conoce
Urocordado	Ascideas	Endostilo	MIT, DIT, T ₃ y T ₄	No se conoce
Cephalocordados	Amphioxo	Endostilo	MIT, DIT, T ₃ y T ₄	No se conoce
V	Ciclostomos L. Ammocoete	Endostilo	MIT, DIT, T ₃ y T ₄	Notocorda
E	Lamprea	Tiroides	MIT, DIT, T ₃ y T ₄	Notocordada, ovarios y testículo.
R				
T	Condriictios	Tiroides	MIT, DIT, T ₃ y T ₄	Estómago, Branquias Bilis
E				
B	Osteictios	Tiroides y tejidos paratiroides funcionales	MIT, DIT, T ₃ y T ₄	Yoduro plasmático; ovario; unión a prot. plasmáticas (en migración).
R	Anfibios	Tiroides	MIT, DIT, T ₃ y T ₄	Ovarios y capas pigmentadas de la piel
A				
D	Reptiles	Tiroides	MIT, DIT, T ₃ y T ₄	Vejiga urinaria
O	Aves	Tiroides (2)	MIT, DIT, T ₃ y T ₄	No se conoce
S	Mamíferos	Tiroides	MIT, DIT, T ₃ y T ₄	Glándulas salivales.

B.2. Invertebrados. En los poríferos, celenterados, turbelarios, nemertinos y nemátodos no existen glándulas epiteliales y las neurosecreciones son el único coordinador hormonal (20). Sin embargo se ha reportado que existen MIT y DIT en los celenterados y poríferos.

Por otra parte, se ha visto que en algunos celenterados como es el caso de Aurelia aurita (21, 22) el yodo es capaz de producir el proceso de estrobilación (el pólipo sésil se desarrolla hasta el estado de medusa, que es de vida libre). Por métodos como la cromatografía en papel, e hidrólisis parcial, se encontró formación y liberación de MIT, DIT y T_3 , sin encontrar indicios de T_4 al administrar ^{125}I ; por lo cual se postula que la T_4 no es el agente responsable de la estrobilación en Aurelia aurita, sin embargo, estos estudios se encuentran en contraposición con lo informado por Spangenberg (23), quien reporta la formación de T_3 y T_4 . En toda esta información no se encuentra ninguna referencia que indique el sitio anatómico donde se realiza la biosíntesis de éstos compuestos.

Anélidos; Se ha encontrado TRH (20), así como MIT, DIT, T_3 y T_4 (6).

Artrópodos; Medda y col. (31) ha reportado que existen T_3 y T_4 , sin embargo Norris (6) reporta haber encontrado MIT, DIT, así como T_4 , pero sin haber localizado a la T_3 .

Moluscos; Se han encontrado todos los compuestos yodados; MIT, DIT, T_3 y T_4 (20, 6).

B. 3. Precordados y Vertebrados. En ascidias, amphioxus y en la larva ammocoete de las lampreas, se encuentra una evaginación de la faringe, la cual se le denomina endostilo o glándula subfaríngea. Figura 5.

El endostilo no contiene folículos como la glándula tiroides, sin embargo es capaz de acumular y concentrar selectivamente yodo radioactivo (25, 32). El yodo se liga en forma orgánica con tirosina para formar yodotironinas, incluyendo posiblemente pequeñas cantidades de tiroxina. Se ha observado que en la larva ammocoete, en el momento de la metamorfosis, el endostilo se separa de la faringe y adquiere características de una glándula tiroides típica.

Existen dos teorías que explican la fijación e hidrólisis de yodo en la larva ammocoete (25):

1. La tiroglobulina se forma en el endostilo, y éste lo libera hacia el intestino, donde posteriormente es hidrolizado por enzimas intestinales. En esta forma es como se lleva a cabo la absorción de la hormona por el epitelio intestinal.
2. La tiroglobulina es hidrolizada en el endostilo y la hormona es transportada por secreciones mucosas hacia el intestino en donde es absorbida.

En las lampreas macho, durante la migración, se encontró gran cantidad de yodo fijado a la notocorda, mientras que en las hembras, la mayor cantidad de yodo se encontró en el ovario. El yodo se acumula en las células muy vacuoladas de la notocorda y permanece como yoduro inorgánico.

También se encontró un pequeño porcentaje de yoduro fijado a las proteínas y de yoduro plasmático y con una excreción del yodo mínima (26).

Se ha encontrado que la captura de yodo por el endostilo (en larvas), y por la tiroides en adultos machos, es reducida, debido a que la mayor porción es captada por la notocorda, y en las hembras por el ovario; además, que el volumen glandular es pequeño. Sin embargo la síntesis de hormonas es muy rápido. Otra característica que se ha observado es que en la larva existe más captación - que en el adulto, pero la síntesis es igual en ambos (26).

En los mixímeros, la tiroides aparece como un surco en el fondo de la faringe. En individuos de éste grupo, se encontró fijación de yodo extratiroideo en la notocorda, ovario y una pequeña cantidad en el testículo. (13, 26).

Elasmobranquios. La glándula tiroides es impar, situada delante de la horquilla de las arterias branquiales aferentes, y tiene aspecto maciso (15). Existe fijación extratiroidea en las branquias y bilis.

Se ha encontrado, que éstos organismos poseen una bomba gástrica, la cual acumula yoduros en el estómago, y por esto, se le ha nombrado como homóloga a la que existe en los mamíferos, asimismo se ha visto que la distribución de los yoduros sanguíneos y plasmáticos son similares a los encontrados en aves y mamíferos (13).

Se ha reportado que en el embrión de tiburón, el yodo penetra en la



FIGURA 5. Morfología del endostilo y glándula tiroides en diferentes grupos vertebrados (1) Endostilo de la larva ammocoete, (2) Endostilo de ascideas, (3) Tejido tiroideo en teleosteos, (4) Tiroides en lampreas, (5) Tiroides en elasmobranquios, (6) Tiroides en anfibios, (7) Tiroides en lacertilios, (8) Tiroides en quelonios, (9) Tiroides en ofidios, (10) Tiroides en aves, (11) Tiroides en roedores, (12) Tiroides en bóvidos.

tiroides uniéndose a las células epiteliales, operando con las primeras gotas de coloide el yodo orgánico.

Se realizaron experimentos sobre la captación de yodo, síntesis y excreción de hormonas en tiburones del Mediterráneo, y se observó que era muy lenta comparada con los tiburones del Atlántico. Esto es debido a la gran cantidad de yodo presente en las branquias (26).

Teleosteos. La glándula tiroides puede encontrarse en diferentes regiones del organismo (13, 25):

1. Difusa a lo largo de la aorta ventral y aortas branquiales;
2. Concentrada en dos lóbulos situados a nivel de la arteria anterior;
3. En algunos casos parte del tejido tiroideo abandona la región faríngea y ocupan otras partes del cuerpo, como son la cabeza y los riñones.

Este grupo de vertebrados presenta gran cantidad de captación de yodo extratiroideo en el ovario (26). En las especies migratorias (33) se observa una elevada fijación de yoduros a proteínas plasmáticas cuando comienza la migración, esto es debido al alto gasto metabólico por nadar en contracorriente. En las especies que no migran, la secreción de yodo depende de la temperatura del medio ambiente; a temperaturas elevadas (24° C) es muy rápida, y a temperaturas normales es generalmente lenta.

En los tejidos tiroideos funcionales (cabeza y riñones), la síntesis de

las hormonas es más rápida que en la misma glándula.

En los peces marinos la fijación es menor que en los de agua dulce, sin embargo éstos últimos acumulan yodo inorgánico en tejidos no glandulares, cuando la temperatura ambiental es baja. El yodo inorgánico se acumula en gran cantidad y sin recambio por algún tiempo. Las concentraciones de MIT y DIT son las más importantes y las de T_3 y T_4 son variables.

Se ha encontrado que cuando está presente la T_4 , la relación MIT y DIT es igual, mientras que cuando se encuentra T_3 , existe más cantidad de DIT.

Peces pulmonados. La glándula tiroides es bilobulada, con una fina conexión central por encima del aparato hioideo. El yoduro se acumula en los ovocitos en pequeñas cantidades y su excreción es muy lenta; sin embargo la fijación intratiroidea es muy rápida.

Se ha observado que en los peces en general es muy común la hiperplasia tumoral de la glándula, y se ha sugerido que probablemente se deba a una base genética (26). Estos tumores se han llegado a encontrar en riñones, ventrículo, glándulas coroideas del ojo, hígado, cerebro y glándulas de la vejiga natatoria. Es frecuente observar que con la edad aumenta la incidencia de hiperplasia funcional.

Se cree que la función de la tiroides es de osmorregulación, ya que las especies marinas que inician la migración muestran mayor actividad tiroidea.

Anfibios. La glándula tiroides está dividida en dos porciones, las cuales se encuentran anexas a los bordes del aparato hioideo (26). Ver figura 5.

Existe captación de yoduros en las capas más pigmentadas de la piel y en el ovario que acumula cerca del 43% y es controlado por TSH. Con drogas antitiroideas el yoduro es fijado, igual que en los tiburones en los músculos y su excreción es muy lenta; se ha visto que en la tiroides se capta poco yodo, pero este se utiliza casi íntegramente en la síntesis de hormonas (26).

Se ha observado que la hormona es necesaria para la caída de las capas córneas y que intervienen en la metamorfosis de algunos anfibios (la extirpación de la glándula inhibe la metamorfosis, mientras que la administración de T_4 la provoca o acelera). En particular en el ajolote americano de grandes altitudes, el tratamiento con tiroxina desencadena la transformación en adulto. Estos organismos, sin embargo conservan sus branquias y su aspecto neoténico durante toda su vida (9, 32).

Reptiles. Los lacertilios tienen una glándula tiroides par, situada cerca de la tráquea. En los quelonios, ofidios y cocodrilos existe un órgano impar situado cerca del corazón (26, 27). Ver figura 5.

La acumulación de yodo extratiroideo se ha estudiado solamente en quelonios, observándose poca captación (27). La excreción depende del medio donde se encuentre el animal; en medios húmedos es rápida y en los secos es len-

ta, debido a que estos compuestos son reabsorbidos nuevamente de la orina. Se han encontrado MIT, DIT, T_4 y pequeñas cantidades de T_3 . La captura en medio seco es muy pequeña y casi toda es transformada en T_4 .

En los reptiles en general, la muda depende de las secreciones tiroideas, y existen evidencias que la ablación de la glándula favorece la caída de la epidemis vieja en las serpientes, mientras que lo impide en los lagartos. La acción de las hormonas tiroideas puede depender de la temperatura, en las iguanas no tienen efecto a los $24^{\circ} C$, pero si lo tienen a los $30^{\circ} C$. En los lagartos la tiroides se activa más durante la época de reproducción (27).

Aves. Poseen dos glándulas tiroides situadas a uno y otro lado de la tráquea (fig. 5), cerca de la raíz de los bronquios. La forma y el color de las plumas puede ser afectada por la secreción tiroidea. Se cree que también está relacionada con la modificación fisiológica característica de la época de la migración (27).

Mamíferos. La glándula tiroides deriva de la faringe por una evaginación ventral que forma un cordón celular que dará origen a las vesículas secretoras. En los mamíferos se forma entre la primera y segunda bolsa branquiales y está constituida a menudo por dos lóbulos laterales reunidos por una banda transversal, denominada "istmo", cuya amplitud es muy variable. Los lóbulos están por lo general pegados lateralmente a la faringe y el istmo se extiende sobre la tráquea.

Como se muestra en el cuadro 3 algunos investigadores han medido la

CUADRO 3

CUANTIFICACION DE HORMONAS TIROIDEAS EN EL SUERO DE GANADO BOVINO Y CAPRINO UTILIZANDO DIFERENTES TECNICAS

GANADO BOVINO

M E T O D O	T ₄ TOTAL (ug/100 ml)	T ₃ (ng/100 ml)	REFERENCIA
PROTEIN BOUND IODINE (PBI) Y CBPA	7.41	-	(15)
	5.3	-	(27)
DIALISIS Y CROMATO- GRAFIA DE GAS	-	149	(15)
	4.5	230	(11)
R I A	7.0	-	(29)
	7.1 ± 0.56	140 ± 10	(30)

GANADO CAPRINO

M E T O D O	T ₄ TOTAL (ug/100 ml)	REFERENCIA
P B I	5.8	(27)

CUADRO 4

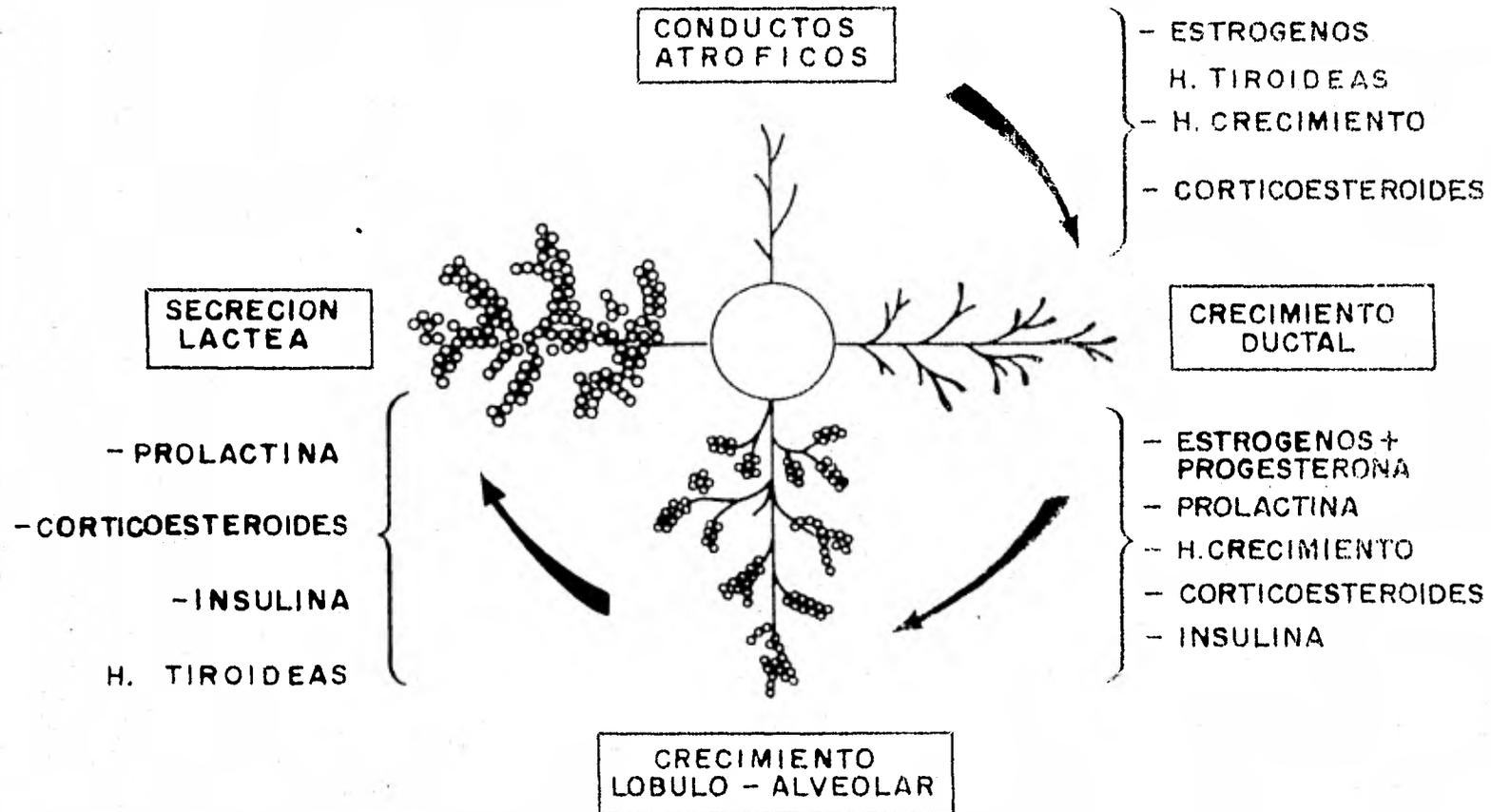
CUANTIFICACION RADIOINMUNOMETRICA DE HT EN EL SUERO
DE GANADO BOVINO

T ₄ TOTAL ($\mu\text{g}/100 \text{ ml}$)	T ₃ ($\text{ng}/100 \text{ ml}$)	LECHE Lt/día	TEMPERATURA ABIENTAL °C	REFERENCIA BIBLIOGRAFICA
3.07	-	bueno productora	-	-
3.98	-	mala productora	-	(4)
4.22 \pm 0.18	138 \pm 8.0	31.4 \pm 1.4	18	(3)
5.18 \pm 0.16	157 \pm 9.0	17.0 \pm 1.2	18	
5.32	-	30.0	15	(2)
6.32	-	21.3	15	
6.78	-	12.3	15	
4.84	-	28.6	30	
6.22	-	20.4	30	
71.7	-	11.5	30	

concentración de las hormonas tiroideas circulantes en ganado bovino y caprino, utilizando diferentes métodos. Se puede observar que la cifra promedio de T_4 difiere considerablemente dependiendo del método, pero ésta variación persiste aún utilizando procedimientos de RIA.

Son pocos los autores que utilizando el radioinmunoanálisis toman en cuenta la producción láctea y/o la temperatura ambiental. En el cuadro 4 se resume esta información.

Hay que hacer énfasis en que las hormonas tiroideas no son las únicas que intervienen en el proceso de lactogénesis y lactación. En la figura 6 se ilustran las relaciones endócrinas de algunas hormonas que intervienen en este proceso.



* MODIFICADO DE LYONS, W.R. PROC. R. SOC. B, 149: 303 (1958)

FIGURA 6. Hormonas involucradas en la mamogénesis y lactogénesis de mamíferos.

II. RADIOINMUNOANALISIS

A. Aspectos Generales y Antecedentes.

Diversas técnicas desarrolladas en otras áreas de la fisiología y de la bioquímica, se han aplicado al estudio de los sistemas endócrinos (6).

Uno de los primeros métodos utilizados, al cual se le denomina: Técnica Clásica, consiste (en términos generales), en la extirpación-reimplantación de la posible glándula, o en la inyección de los extractos preparados de ésta misma; "cuantificando" los efectos producidos, simplemente por medio de la observación.

Posteriormente se desarrollaron técnicas más avanzadas, como es el caso del Bioensayo; el cual se basa en la respuesta fisiológica de los organismos completos, en los tejidos o en grupos celulares, producidos por la inyección de compuestos ya purificados y en concentraciones conocidas. Este método presenta una gran desventaja, ya que la variación de la respuesta producida de un organismo a otro es muy grande, dando como resultado ser inespecífica y poco sensible.

A fines de la década de los 40's, un isótopo del yodo (el ^{131}I) empezó a utilizarse para el tratamiento de la tirotoxicosis y se empleaba la técnica de electroforesis de zona para estudiar la unión de la ^{131}I -tiroxina endógena a las proteínas séricas sintetizada en la tiroides de los pacientes tratados con este isótopo. Se encontró que la mayor parte de la T_4 del suero (sea endógena o exógena),

normalmente se une a una proteína específica: la TBG y el remanente se une a la albúmina. Sin embargo también se observó que cuando existían cantidades relativamente grandes de tiroxina en el suero, la TBG era "saturada" y el exceso de T_4 se unía a la albúmina. La proporción entre la cantidad de tiroxina unida a la TBG y la unida a la albúmina era, por lo tanto, inversamente proporcional a la cantidad total de tiroxina presente en el suero. Con éste conocimiento, se necesitaron unas cuantas modificaciones para desarrollar un método electroforético simple y específico para medir la concentración de tiroxina en muestras de suero. Este método fué utilizado para medir otras sustancias, para las cuales se podía obtener una proteína específica a la que se pudiera unir la sustancia en estudio; a ésta técnica se le denominó Análisis de Saturación o Unión Protéica Competitiva (CPBA). El refinamiento de ésta técnica dió origen a la técnica de Radioinmunoanálisis (RIA) (34).

B. Principios del Radioinmunoanálisis

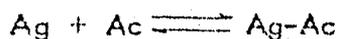
B. 1. Aspectos Físicoquímicos. El RIA, es una técnica de análisis físico-químico, que deriva del CPBA, estableciendo en 1960 por Ekins (35) y modificado posteriormente por Berson y Yalow (36).

El término de RIA, se emplea para designar de manera genérica a las técnicas que utilizan anticuerpos (Ac) como proteínas receptoras. El proceso se rige por la ley de acción de masas y, dependiendo de la naturaleza química del elemento saturable se denomina a éstas técnicas como: CPBA, REA (ensayo radioen

zimático) y RRA (análisis de radiorreceptores). Además, estos procedimientos tienen como común denominador el empleo de antígeno o su equivalente radioactivo; y el principio fundamental en todas es el mismo (37, 38). Este principio se basa en la reactividad entre un anticuerpo (Ac), cuya concentración fija en el sistema limita el número de sitios de acoplamiento por los que compiten: el antígeno radioactivo (Ag'), presente en concentraciones limitadas y escasa masa, y el antígeno no marcado (Ag) que se agrega en cantidades conocidas (puntos de la curva estándar) y en cantidades desconocidas (muestras problema). Así a medida que se incrementa la concentración del antígeno no marcado, disminuye la posibilidad de que el antígeno radioactivo se acople al anticuerpo y forme el complejo $Ag'-Ac$, siendo cada vez mayor la proporción de complejos $Ag-Ac$ formados, lo que da lugar a una menor cantidad de radioactividad medible en el complejo.

B. 2. Bases Cinéticas del RIA. La ley de acción de masas establece que las velocidades de reacción son proporcionales a los productos de las concentraciones activas de los reactantes elevadas a una potencia igual a su coeficiente en la ecuación balanceada de la reacción.

Para la reacción general $Ag-Ac$ en el equilibrio (si la relación es - mol a mol) se tiene lo siguiente:



La velocidad a la derecha:

$$R_1 \propto [Ag] [Ac]$$

y la velocidad hacia la izquierda:

$$R_2 \sim [Ag-Ac]$$

En donde [] significan concentraciones en moles/litro, y el \propto significa proporcionalidad.

Para convertir las en ecuaciones se introducen constantes de velocidad K_1 y K_2 , los cuales representan los efectos de la naturaleza de los reactantes, catalizadores, temperatura y otros factores, con excepción de las concentraciones, las cuales afectan la velocidad de la reacción.

$$R_1 = K_1 [Ag] [Ac]$$

$$R_2 = K_2 [Ag-Ac]$$

Puesto que en equilibrio R_1 y R_2 son iguales y dos cantidades iguales a una tercera, son iguales entre sí, se puede decir:

$$K_1 [Ag] [Ac] = K_2 [Ag-Ac]$$

Pasando todas las constantes a un lado y todas las variables del otro

$$K_1/K_2 = [Ag-Ac] / [Ag] [Ac]$$

Yo que la relación entre dos constantes es a su vez otra constante la relación $K_1/K_2 = K_e$, por tanto tenemos:

$$K_e = \frac{[Ag-Ac]}{[Ag][Ac]}$$

Esta es la constante de equilibrio en el caso de una reacción inmunológica Ag-Ac y fundamenta la cinética del RIA.

Ya que la reacción alcanza el equilibrio, se definen las constantes de equilibrio:

$$K_e [Ag] [Ac] = [Ag-Ac]$$

La relación del Ag unido y el Ag libre en equilibrio:

$$U/L = [Ag-Ac] / [Ag]$$

Suponemos que las constantes de equilibrio para los Ag', así como los estándares y problemas son iguales.

Bajo las condiciones del RIA, los componentes Ag y Ac están relacionados a la constante de equilibrio observado:

$$[Ag] = [Agi - Ag-Ac]$$

en donde Agi es la concentración inicial del Ag, y por tanto:

$$[Ac] = [Aci - Ag-Ac]$$

en donde Aci es la concentración inicial del Ac.

Por esto la relación entre el Ag libre y Ag unido es:

$$U/L = [Ag-Ac] / [Agi - Ag-Ac]$$

$$U/L + [Agi - Ag-Ac] = [Ag-Ac]$$

ó

$$[Ag-Ac] = [Agi] U/L / (U/L + 1)$$

Combinando las ecuaciones tenemos:

$$K_e \left([Agi] - \frac{[Agi] U/L}{(U/L+1)} \right) \left(Aci - \frac{[Agi] U/L}{(U/L+1)} \right) = \frac{[Agi] U/L}{(U/L+1)}$$

$$(U/L)^2 + U/L [1 + K_e Aci - K_e Aci] - K_e Aci = 0$$

Esto nos representa la ecuación de una hipérbola. La relación entre U/L y la concentración del Ag se describe en la fig. 7 que se aproxima la asíntota y cuya pendiente es $-K_e$.

Si se sufre un cambio en la relación U/L , este es proporcional a un cambio en la concentración del Ag unido, siendo la constante de proporcionalidad $-K_e$.

La relación del Ac unido al Ag' disminuye a medida que la concentración de antígeno no marcado aumenta. Los cambios en la relación U/L son mayores cuando la concentración del Ag es pequeña comparada con la concentración del Ac.

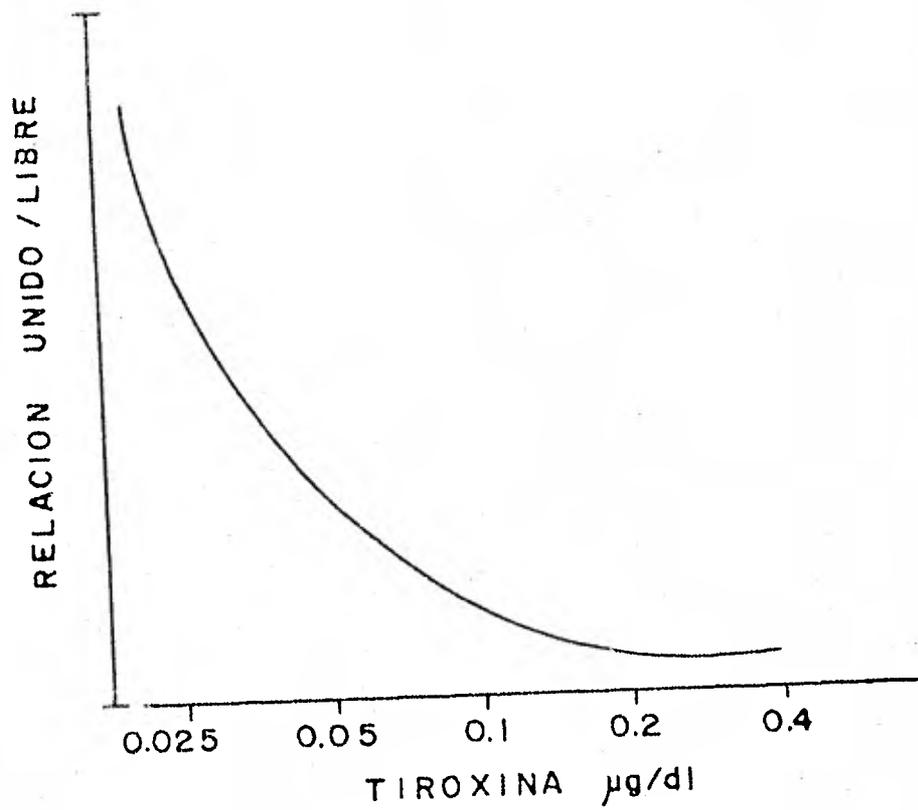


FIGURA 7. Relación entre U/L y la concentración de la hormona.

B. 3. Para que ésta metodología sea más eficiente, se deben de considerar los siguientes puntos.

1. La dilución final del Ac debe ser tal, que permita unir de un 30 a 50% de Ag' en ausencia del Ag no marcado.
2. El comportamiento del Ag (de la curva estándar) y el Ag (contenido en las muestras problema), deben ser semejantes. Es decir, que deben ser capaces de competir con la misma eficacia por el sitio de unión del Ac, e impedir la unión del Ag' al Ac y por lo tanto, la formación del complejo (Ag'-Ac).
3. Después de poner en contacto a los reactantes, se dejan en incubación para que se lleve a cabo la reacción. Aunque ésta puede realizarse a temperatura ambiente, es preferible hacer la incubación a 4° C, durante 24 horas; ésto es con el objetivo de tener mayor afinidad y estabilidad de la reacción.
4. Después de la incubación se agrega una sustancia que separe a los complejos Ag-Ac y Ag'-Ac (fracción unida) de la fracción que no se unió al Ac (fracción libre) óptimamente.

C. Metodología

El RIA requiere de la obtención, purificación y radiomarcaje del antígeno que se desea medir; así como de la inducción de anticuerpos específicos para dicho antígeno, además de la disponibilidad de un buen método de separación de las fracciones obtenidas.

C. 1. Radiomarcaje del Antígeno. Los principales requisitos y objetivos de un buen marcaje del antígeno son:

- Obtención y preparación de un antígeno altamente purificado para que pueda

- ser marcado sin perder sus propiedades inmunológicas.
- Que se logre suficiente actividad específica para detectarlo (a.e. = radioactividad/masa) aún añadiéndolo en el sistema con el mínimo de masa (idealmente entre 5 000 a 20 000 cuentas por minuto, y menos de 100 picogramos por tubo).

Los lineamientos generales para la yodación de hormonas peptídicas (según el método de Greenwood y Hunter: (37) son los siguientes: Este método se basa en que la mayoría de las hormonas peptídicas contienen generalmente uno o más residuos tirosilo, los cuales pueden marcarse mediante una reacción de oxidación, y así introducir átomos de núclidos de yodo (^{125}I ó ^{131}I). En la reacción de radioyodación es importante que el yodo radioactivo esté presente como yoduro, que la solución esté en un pH neutro y que la preparación radioactiva resultante - tenga una actividad específica alta con buena estabilidad y que produzca inmunoreactividad inalterada.

La oxidación del yoduro de sodio marcado se lleva a cabo usando un exceso de cloramina T; tanto el tiempo como la cantidad de agente oxidante deben ser limitados, con el objeto de no dañar a la proteína. La reacción se detiene con un exceso de metabisulfito de sodio. Para disminuir el daño potencial causado por el isótopo, cloramina T o el metabisulfito, el antígeno marcado debe separarse del antígeno no marcado y/o degradado, de las sales, y del material isotópico que no reaccionó. Esto generalmente se logra filtrando a través de matrices inertes tipo sephadex, que en función del peso molecular de los productos, permite su separa

ción.

C. 2. Obtención de Anticuerpos. El método general para la inducción de anticuerpos, llamado inmunización, se efectúa inoculando el antígeno (que puede ser la hormona pura o un extracto natural de la misma) a alguna especie animal (conejo, cayo, carnero, etc.), que sea diferente de la que se obtuvo el antígeno.

En algunos casos el Ag se mezcla antes de inocularse con adyuvante de Freund (mezcla de aceite mineral, ceras y bacilos de Mycobacterium tuberculosis muertos) con el objeto de aumentar y prolongar la respuesta antigénica.

Cuando las moléculas son demasiado pequeñas para inducir la formación de anticuerpos, deben ser tratadas como haptenos, es decir, deben ser acopladas a moléculas acarreadoras como proteínas o polipéptidos sintéticos.

La dilución óptima del anticuerpo, se determina por un ensayo específico en el cual se mide la unión del Ag al Ac en diversas diluciones, siendo la más apropiada, aquella donde aproximadamente la mitad del Ag marcado se une al anticuerpo.

C. 3. Separación de las Fracciones Unida y Libre. Existen diversos métodos de separación, los dos más usados son: El carbón cubierto con dextranos para adsorber estructuras con pesos moleculares menores de 5 000, y el método del segundo anticuerpo, que utiliza antiglobulina gamma de conejo, obtenida general-

mente de ovejas. Los métodos de separación deben reunir ciertas cualidades, como: a. La separación completa de las fracciones unida y libre; b. Un volumen que pueda ser manejado fácilmente; c. La rapidez de la separación de las dos fracciones (U y L) y d. Que sea costeable.

C. 4. Representación Gráfica. Existen diversos tipos de representaciones gráficas, todas ellas confiables y útiles. Aquí solamente describiremos el graficado basado en % U/T el cual se realiza:

Cuentas del sobrenadante = cuentas unidas (fracción unida)

Cuentas del precipitado = cuentas libres (fracción libre)

Daño = unión inespecífica = $\frac{\text{cuentas sobrenadante}}{\text{cuentas sobrenadante} + \text{cuentas del pp.}} \times 100$

$\% \text{ U/T} = \frac{\text{cuentas sobrenadante} - \text{daño}}{\text{cuentas totales} - \text{daño}} \times 100$

El % U/T, se grafica en la ordenada y las diferentes concentraciones de hormona (puntos de la curva estándar), en la abscisa, utilizando papel milimétrico o semilogarítmico. Los valores de los problemas se interpolan en los de la curva estándar para establecer la concentración hormonal en las muestra problema.

D. Estandarización y Control de Calidad del RIA

Para lograr la estandarización y un buen control de calidad esta técnica, se requiere cumplir los siguientes requisitos:

D. 1. Precisión. Se define como la capacidad del sistema para distinguir entre dos concentraciones de antígeno en cualquier posición de la curva estándar o de inhibición. Se valora cuantitativamente por medio del coeficiente de variación $CV = S/\bar{X}$; en donde S = a la desviación estándar y \bar{X} = al promedio de las mediciones.

D. 2. Sensibilidad. Es la cantidad más pequeña de antígeno no mar-
cado que puede ser detectado. La sensibilidad máxima depende de la afinidad del anticuerpo y se obtiene cuando la concentración del antígeno marcado es insigni-
ficante y la concentración del antígeno no marcado se aproxima a cero.

Una de las ventajas del RIA, es la alta sensibilidad que resulta de la interacción del Ag-Ac, y hace posible medir concentraciones de antígeno muy pequeñas.

D. 3. Especificidad. Es el grado de interferencia creado por otras sustan-
cias que sean diferentes a la que se desea medir. La especificidad del anticuerpo para el antígeno se encuentra influenciada por la heterogeneidad de anticuerpos -
específicos, reactividad cruzada con antígenos similares o moléculas que puedan ocupar los sitios inmunoreactivos, y la interferencia de la reacción debida al bajo peso molecular del material que altera el medio o las condiciones de la reacción.

La heterogeneidad significa que un antígeno inducirá la formación de varios tipos de anticuerpos, también se refiere al número y localización de si-
tios de unión en un anticuerpo particular. El antígeno se combina con los anticuero

pos de acuerdo con su respectiva constante de equilibrio.

La reactividad cruzada se refiere, por ejemplo, a hormona que comparten determinantes antigénicos en una de sus cadenas; como puede ser el caso - de las hormonas adenohipofisarias: hormona estimulante del fólculo (FSH), lutei- nizante (LH) y estimulante del tiroides (TSH). Por ésto es recomendable purificar las muestras de plasma, suero, orina o adsorber los Ac que cruzan, y con ésto evi- tar la reactividad cruzada.

La interferencia de factores no específicos presentes en los fluidos biológicos modifican la velocidad de la reacción; otros factores como el pH, urea, fuerza iónica, temperatura elevada y naturaleza química del medio amortiguador usado para la incubación pueden afectar la reacción.

D. 4. Exactitud. Es el grado en el cual la medición de una sustancia - coincide con el valor de la medición estándar. Para poder evaluarlo, se comparan los resultados obtenidos en un número (estadísticamente aceptable) de ensajos semejantes.

D. 5. Reproducibilidad. Se basa en la variación intra-ensayo y en la variación inter-ensayo. Esto se logra minimizando las variables usadas en los ensa-yos.

Los requisitos para obtener un buen control de calidad son: 1. Cuan- tificación de la unión inespecífica o daño; 2. La pendiente de la curva estándar

a una concentración cero del Ag y el 50% del punto de inhibición; 3. La dosis de estándar en el 50 % del punto de inhibición; 4. La variación intra-ensayo y 5. La variación inter-ensayo.

E. Radioinmunoanálisis de Hormonas Tiroideas.

E. 1. Antecedentes. En 1963 Murphy y Patte, desarrollaron el primer método de CPBA, para la cuantificación de tiroxina plasmática, empleando como sustrato de unión a la globulina transportadora de tiroxina, éste método con algunas modificaciones es usado hasta la fecha, sin embargo por presentar los inconvenientes de una gran pérdida de material en el proceso de extracción y la relativa y escasa capacidad de unión del material saturable, ésta técnica resulta poco sensible e inespecífica (40).

Mas tarde en los años 70's, Chopra y colaboradores (38) lograron obtener anticuerpos específicos de tiroxina y desarrollaron el método del RIA para la cuantificación de dicha hormona. Posteriormente y basándose en los resultados de Chopra y colaboradores, Beltrán y col. (39), en 1973, implementaron un método semejante que permitió cuantificar los niveles de tiroxina total en forma directa.

Sin embargo, el desarrollo de un método de RIA para la cuantificación de los niveles séricos de triyodotironina (T_3), es aún más reciente (Gharib y col.) en 1971 y posteriormente en 1972 Gharib y Wahner. Esto es de mucha utilidad, ya que ayudó a precisar la existencia del cuadro clínico de la "Toxicosis por T_3 ".

(Hollander y col. 1972) y que tal vez, permita establecer en forma rápida el diagnóstico de hipo e hipertiroidismo (Ríos y col. 1973; Hollander y col. 1971).

E. 2. Radioinmunoanálisis en Mamíferos. Como ya se mencionó anteriormente, el RIA ha sido utilizado para la cuantificación hormonal principalmente - en el hombre, el primer RIA para hormonas tiroideas de equinos fué establecido por Irvine (28), el cual posteriormente se modificó para la cuantificación en ovinos, bovinos y caninos.

Irvine en 1980, realizó un estudio comparativo de cuantificación de hormonas tiroideas con diferentes métodos y con diferentes grupos de mamíferos - (equinos, bovinos, ovinos, caprinos y el hombre), encontrando que el RIA es el método más específico y reproducible hasta ahora. También observó, al igual que otros autores (41) que para llevarse a cabo una buena medición de dicha hormona, es necesario utilizar el suero homólogo hipotiroideo de cada especie para la curva estándar, debido a que las variaciones ocasionadas por los componentes del suero pueden falsear los resultados obtenidos.

El suero hipotiroideo puede ser obtenido al agregar una proporción de 5g. de carbón por cada 10 ml de suero, a un "pool" de sueros de la misma especie, colocándolo en agitación durante 24 horas a una temperatura de 4° C. El principio de ésta separación se basa en que el carbón adsorbe las estructuras con peso molecular menor de 5 000; posteriormente se separa el carbón del suero (por medio de centrifugación). El suero obtenido es procesado, para confirmar la ausencia de Hormonas Tiroideas.

III. MATERIAL Y METODO

A. Material

A. 1. Material Biológico. Se obtuvieron 210 muestras de suero de ganado Holstein (hembras) a las cuales se les muestreó en dos diferentes periodos del año: mayo y octubre. Mantenidas con una alimentación semiestabulado y con una producción láctea variable, además de encontrarse en diferentes estadios de gestación.

Este material fué obtenido gracias a la colaboración del Maestro en Veterinaria y Zootecnia José Luis Solís, el cual es colaborador del Colegio Superior de Agricultura Tropical de la S.A.G., ubicado en Cárdenas, Tabasco.

Se obtuvieron 50 muestras de suero de ganado caprino (hembras), de diferentes razas: Alpina, Granadina, Toggenbeer, Saaner y Nubia, siendo la alimentación estabulada y encontrándose en diferentes estadios de gestación y con una producción láctea variable.

Estas muestras fueron obtenidas del Centro Caprino de Tlahualilo, Durango de la S.A.R.H. gracias a la colaboración de la maestra en Veterinaria y Zootecnia Guadalupe Reyes Rivera.

La clasificación biológica de bovinos y caprinos es la siguiente:

Bovinos

FILO: Chordata
 SUBFILO: Vertebrata
 CLASE: Mamalia
 SUBCLASE: Theria
 INFRACLASE: Eutheria
 ORDEN: Artiodactyla
 SUBORDEN: Rumiantia
 INFRAORDEN: Pecora
 FAMILIA: Bovidae

Caprinos

FILO: Chordata
 SUBFILO: Vertebrata
 CLASE: Mamalia
 SUBCLASE: Theria
 INFRACLASE: Eutheria
 ORDEN: Artiodactyla
 SUBORDEN: Rumiantia
 INFRAORDEN: Pecora
 FAMILIA: Bovidae

Condiciones Experimentales.

Ganado Bovino:

Alimentación: Semiestabulada

Peso: 350 kg. aproximadamente

Sexo: Hembras

Edad: 3 a 5 años

Zona Geográfica: Cárdenas, Tabasco

Clima:

Mayo:

Temperatura máxima 42°C

Humedad ambiental alta

Precipitación pluvial regular alta

Fotoperíodo máximo

Forraje suficiente en calidad y cantidad.

Octubre:

Temperatura máxima 36° C

Humedad ambiental alta

Precipitación pluvial máxima

Fotoperíodo regular

Forraje suficiente en cantidad, pero no en calidad.

El estrés nutricional en el mes de octubre se anula porque es ganado semiestabulado.

Ganado Caprino:

Alimentación: Estabulada

Peso: 35 kg. aproximadamente

Edad: 3 a 5 años

Sexo: Hembras

Zona Geográfica: Tlahualilo, Durango

Clima: Cálido seco, Temperatura de 12 a 22°C.

A.2 . Material Químico .

Reactivos:

Tris (hidroximetil) aminometano (tris). R.A.

Sal disódica de ácido (etilendinitrilo) tetracético (Na₂EDTA)

Tiroxina (sal sódica)

Triyodotironina (sal sódica)

Acido 8-anilino-1-naftalensulfónico (ANS)

Acido clorhídrico concentrado

Carbón activado (Norit A)

Dextrán, grado clínico (P.M. 83 300)

Alcohol etílico

^{125}I -tiroxina

^{125}I -triyodotironina

Suero inmune anti-tiroxina (conejo)

Suero inmune anti-triyodotironina (conejo)

Sueros controles hipotiroideos de ambas especies

Soluciones:

Solución amortiguadora de Tris-HCl 0.05 M, pH 8.6 (Tris-HCl)

Solución Na_2EDTA al 0.6 % en amortiguador Tris-HCl (solución de trabajo)

Solución madre de tiroxina. (100 mg/100 ml)

Solución de ^{125}I -tiroxina (NEN)

Solución de ^{125}I -Triyodotironina (NEN)

Solución madre de Triyodotironina (10 mg/100 ml)

Solución de suero inmune anti-tiroxina

Solución de suero inmune anti-triyodotironina

Suspensión de Carbón -Dextrán (0.5/0.5 g)/ 100 ml. de Tris-HCl

A. 3. Material de Cristal y Aparatos.

Tubos de ensayo de 12 x 75 mm.

Tubos de ensayo de 18 x 150 mm.

Pipetas de 10 ml, 5ml. y 1 ml.

Matraces aforados de 100 ml.

Probetas de 100 ml.

Probetas de 25 ml.

Pipetas de micromedición (Beckton - Dickson) de 1 a 200 ul.

Puntas de plástico para pipeta de micromedición

Jeringas de medición de 0.1 ml. (Hamilton)

Micropipeta automática (Micromedic)

Agitador mecánico excéntrico (Vortex)

Agitador magnético con barra magnética

Vasos de precipitado de 100 ml.

Vasos de precipitado de 250 ml.

Centrífuga refrigerada

Contador de centelleo para radiaciones gamma.

Papel parafilm

Gradillas.

B. Método

La técnica usada para la determinación de tiroxina sérica total en estas 2 especies de bóvidos, es una modificación de la establecida por M. Beltrán y col. (39).

Las modificaciones se realizaron principalmente con el objeto de alcanzar mayor precisión y sensibilidad, así como un ahorro en los reactivos. Las modificaciones fueron las siguientes:

B. 1. Curva estándar: Se diseñó para cubrir un intervalo de 0.025 a 0.41 ng/100 ul. El intervalo original es de 0.25 a 2.5 ng/100 ul. informes previos indicaron que el valor promedio en estos animales es de 0.65 ng por 100 ul. Con el propósito de ahorrar reactivos, el suero problema se diluyó con suero homólogo hipotiroideo en relación 1:4, que presenta según lo esperado la zona más sensible de nuestra curva estándar.

B. 2. Concentración Empleada de Antígeno Marcado: El método original emplea 25 pg en un volumen final de 500 ul. En el caso presente se redujo a 7 pg en un volumen final de 350 ul. Se seleccionó esta cantidad de ^{125}I -Tiroxina, debido a que observaciones empíricas en este laboratorio indican que la masa radioactiva debe corresponder a una tercera parte de la concentración más pequeña de T_4 del estándar para obtener un efecto significativo en el análisis.

B. 3. Empleo de Anticuerpo. Para obtener un mejor control de calidad del método, es conveniente trabajar todas las muestras problema con un mismo lote de Ac. Con las modificaciones anteriores, logramos reducir la cantidad de Ac utilizado a una dilución de 1:300, que nos permitirá analizar todas las muestras con el mismo lote.

C. Metodología

C. 1. Titulación del Anticuerpo. De acuerdo a lo señalado con los principios básicos del RIA, la dilución teóricamente útil, es aquella que une del 30 al 50% de la cantidad de marca radioactiva.

El análisis se efectuó de la siguiente manera.

Se probó el anticuerpo a diferentes diluciones (1:50, 1:100, 1:200, 1:250 y 1:300) en Tris-HCl. Colocando en cada tubo:

- 1). Dilución del Ac. correspondiente (100 ul)
- 2). Solución de T_4 marcada (7 pg/100 ul + ANS 0.3 mg/100 ul).
- 3). Suero hipotiroideo (10 ul)
- 4). Solución amortiguadora (EDTA) para completar 350 ul.

Todos los ensayos se realizaron colocando tubos de daño y cero, efectuándose por triplicado (ver técnica).

Las diluciones que cumplieron los requisitos anteriores fueron: 1:200 1:250 y 1:300.

Posteriormente se analizó la sensibilidad de las diluciones del Ac. escogidas a concentraciones variables de T_4 (estándares), para cubrir el intervalo de concentración deseado colocando en cada tubo:

- 1) Dilución del Ac. correspondiente (100 ul.)
- 2) Dilución de T_4 + ANS (100 ul).
- 3) Suero hipotiroideo (10 ul)
- 4) Concentraciones variables de T_4 (estándares) (100 ul)
- 5) Solución amortiguadora EDTA. para completar 350 ul.

La figura 1 muestra las curvas obtenidas de este análisis de acuerdo a los criterios anteriormente estipulados, la dilución óptima del Ac. en las condiciones descritas fué la de 1:300.

De acuerdo a lo anterior el sistema del RIA quedó establecido en las siguientes condiciones:

- | | |
|---|---------|
| - Volumen total | 350 ul. |
| - T_4 7 pg 0.3 mg de ANS | 100 ul. |
| - Estándares (intervalo 0.025 a 0.41 ng). | 100 ul. |
| - Ac a dilución 1:300 | 100 ul. |
| - Suero hipotiroideo homólogo | 10 ul. |
| - Solución amortiguadora EDTA. (Para completar) | 350 ul. |

Las condiciones fisico-químicas, así como el método de separación,

se realizaron de la misma manera que en la técnica original.

Para la determinación de triyodotironina (T_3), se utilizó el método de RIA establecido en la Clínica de Tiroides para cuantificación en humanos. Este método reúne las siguientes condiciones (42)

- Volumen total	500 ul.
- T_3 17.2 pg/100 ul + 0.3 mg de ANS	100 ul.
- Estándares (intervalo 50 a 1000 pg.)	100 ul.
- Ac. a la dilución 1:3000	100 ul.
- Suero hipotiroideo homólogo	25 ul.
- Solución amortiguadora EDTA para completar	500 ul.

La incubación de los reactivos es de 72 horas y el método de separación es el mismo (carbón-dextrán al 0.5 %).

C. 2. Preparación de Muestras: Se toman por punción venosa o arterial 10 ml. de sangre, se deja coagular y se centrifuga a temperatura ambiente a 2000 rpm durante 15 min.; posteriormente se separa el suero y se guarda a 4° C hasta el momento de su análisis. El volumen mínimo de suero para el análisis es de 0.1 ml.

C. 3. Preparación de Soluciones Estándar. A partir de la solución madre de tiroxina (110 mg/100 ml) se preparan los estándares necesarios para la curva de desplazamiento; que en este caso son: 0.025, 0.051, 0.10, 0.21 y 0.41 ng/100 ul. Las diluciones se realizan con Tris-HCl.

La preparación de los estándares para el RIA de T_3 se realizan de la misma manera para cubrir el intervalo: 50, 100, 200, 300, 500 y 1000 pg/100ul. a partir de la solución madre de 10 mg/100 ml.

C.4. Preparación de las Soluciones ^{125}I - tiroxina y ^{125}I -triyodotironina.

Conocida la actividad específica y la concentración del isótopo radioactiva, se toma el volumen determinado de éste, aforándolo con Tris-HCl para obtener las concentraciones: 7 pg/100 ul. en el caso de T_4' y 17.2 pg/100 ul. en el caso de T_3' .

Al momento de usarse se adicionan 30 mg de ANS por cada 10 ml de la solución radioactiva. El ANS actúa como agente bloqueador de las proteínas séricas con afinidad a las hormonas tiroideas.

Una vez preparadas las muestras y las soluciones estándar, se llevan a temperatura ambiente los siguientes reactivos:

Solución de trabajo Tris-HCl-EDTA.

Salución de ^{125}I -tiroxina o ^{125}I -triyodotironina (según el caso).

Salución de Ac a la dilución apropiada.

Sueros hipotiroideos controles.

D. Realización del RIA

D. 1. Terminología utilizada en el RIA.

Daño; Unión inespecífica.

Cero; Es el porcentaje de unión del antígeno marcado al anticuerpo.

Curva Estándar: Es el intervalo de concentraciones conocidas de antígeno no marcado, con el cual se elabora la curva de desplazamiento.

Problemas: Es el conjunto de muestras que se desean medir.

En el RIA se realiza el daño, el cero y la curva estándar por triplicado y las muestras problema por duplicado en tubos numerados de 12 x 75 mm, adicionando los reactivos con pipetas Oxford o con la micropipeta automática, de acuerdo con el protocolo siguiente:

TUBO	AC.	STD.	S. HIPO.	S. PROB.	BUFFER	Ag ¹
Daño	-	-	si	-	si	si
Cero	si	-	si	-	si	si
Cva. Std.	si	si	si	-	si	si
Prob.	si	-	-	si	si	si

D. 2. Separación de las Fracciones Unida (U) y Libre (L). Llevada a cabo la reacción inmunológica (24 hrs.), se procede a separar las fracciones U y L mediante la adsorción de ésta última a una mezcla de Carbón-Dextrán (0.5 g/0.5 g) en 100 ml de TRIS-HCl.

La suspensión se mantiene en agitación constante y se añade 1 ml. a cada tubo; se agitan en el vortex dos o tres segundos y posteriormente se incuban a 4°C durante 20 min. se centrifugan a 2500 rpm durante 30 min., se decanta el sobrenadante y se colocan en el contador de centelleo ajustado al voltaje de máxima

eficiencia de detección para 125μ , colocando primero el sobrenadante (U) y después el precipitado (L) de cada uno de los tubos.

D. 3. Cálculos. Al término del conteo, se calcula el porcentaje de unión de los tubos de Daño, que se descontará al porcentaje de unión de los tubos de Coro Cva. Std. y Problemas. Este cálculo se realiza de la siguiente manera:

$$\frac{\text{cpm en U (sobrenadante)}}{\text{cpm en U + cpm en L (pp.)}} = \% \text{ Daño.}$$

Para el cálculo del porcentaje de unión de la curva estándar y problemas, se utiliza la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{cpm en U}}{\text{cpm en U + cpm en L}} = \% \text{ Daño} = \% \text{ U/T.}$$

Graficado:

Una vez obtenidos los porcentajes de unión para la curva estándar y los problemas, se procede a graficar la curva estándar en papel semi-log., colocando en el eje de las ordenadas el porcentaje de unión y en el de las abscisas la concentración de los estándares.

La lectura de los problemas se realiza interpolando sus porcentajes de unión partiendo de las ordenadas y localizando el punto de intersección con la curva estándar y leyendo la correspondencia de concentración en el eje de las abscisas.

Métodos Estadísticos:

Los resultados se analizaron mediante 2 pruebas estadísticas:

- a) Comparación intra y/o inter grupos, se utilizó la prueba t de student, tomando como nivel de significancia $p = < 0.05$.
- b) Correlaciones entre las diferentes variables analizadas, se usó la prueba de coeficiente de correlación " r ", con una $p < 0.05$.

IV. RESULTADOS

A. Validación del RIA

Como se mostró en la sección III, el sistema RIA empleado en ésta tesis, utiliza el anticuerpo en dilución 1:300, con lo cual la sensibilidad del procedimiento permite detecciones en el intervalo de concentración de 25 hasta 410 pg/100 ul. (Gráfica 1).

Con el total de ensayos realizados ($n = 16$) se calculó la curva promedio que se muestra en la gráfica 2. En ésta se observa que la desviación estándar es mayor en los primeros puntos y menor en los correspondientes a las concentraciones elevadas. Este fenómeno, habitual en los RIAs, se conoce como heterosedasticidad y se debe a la heterogeneidad en la afinidad de las inmunoglobulinas que intervienen en la reacción inmunológica (42). Por esto, en la realización de cualquier RIA se requiere preparar una curva estándar en cada análisis y no es posible contar con una "curva patrón". En consecuencia las características de reproducibilidad y exactitud se analizan teniendo como parámetros las variaciones intra e interensayo.

a). Variación Intraensayo: Se tomaron 6 muestras al azar y se analizaron 6 veces por duplicado en un mismo ensayo. Se obtuvo un coeficiente de variación promedio de 11.3% siendo el mayor de 21% en la concentración menor (2.9 ug/dl) y de 7.5 % en la mayor (8 ug/dl).

b). Variación Interensayo: Se tomaron 6 muestras al azar y se analizaron en 8 ensayos diferentes realizados durante un lapso de 8 semanas. El coeficiente de variación fué de 17.5% en promedio (23 % en la concentración de 5.7 ug/dl y 8.4 % en 3.7 ug/dl). En consecuencia, la reproducibilidad y la exactitud del método utilizado fluctúa entre el 80 y 90 %.

c). Especificidad: Se tomó un suero humano que contenía una concentración conocida de tiroxina y se diluyó con suero hipotiroideo de las especies analizadas en este estudio (bovinos: B1 y caprinos; K1), así como también con suero hipotiroideo humano: H1. Estas diluciones se compararon con una curva estandar preparada con diferentes concentraciones de tiroxina comercial. Como se muestra en la gráfica 3, todas las diluciones presentan paralelismo con la curva estándar, lo cual indica que la medición obtenida en cada curva corresponde específicamente a la hormona tiroxina.

d). Inmunoreactividad Cruzada: En la gráfica 4, se muestra la inmunoreactividad cruzada que el anticuerpo anti-tiroxina C-19-E presenta para la hormona T_3 . Obsérvese que esta última solo a concentraciones por arriba de 3 ng, provoca un desplazamiento semejante al inducido por 0.05 ng de T_4 .

B. Valores Normales de Hormonas Tiroideas.

Tiroxina: Los niveles circulantes de tiroxina en el suero de 210 vacas y 50 cabras variaron de 2 a 8 y de 1 a 9 ug/dl respectivamente. Como se mues

tra en la gráfica 5, en ambas especies los valores de la hormona exhiben una distribución normal.

El valor promedio \pm una desviación estándar ($\bar{X} \pm d.e.$) para una y otra especie fué: 5.2 ± 3.2 y 4.6 ± 2.3 ug/dl.

Triyodotironina; La determinación de T_3 tanto en bovinos como en caprinos muestra también una distribución normal (gráfica 6), obteniéndose como valor promedio para bovinos 129.6 ± 76.6 ng/dl y para caprinos 131.9 ± 25.3 ng/dl.

C. Variaciones Fisiológicas de Tiroxina en Ganado Bovino

Como segundo objetivo se decidió analizar la probable relación de las hormonas tiroideas con algunos factores fisiológicos como son: las variaciones estacionales, la gestación y la lactancia.

Variaciones Estacionales. Al agrupar los valores circulantes de T_4 de acuerdo al mes en que se obtuvo la muestra (gráfica 7, tercio izquierdo) el promedio \pm error estándar ($\bar{X} \pm e.e.$) en mayo y en octubre ($n = 105$) fué de 4.7 ± 0.2 y 4.6 ± 0.3 ug/dl respectivamente.

Influencia de la Gestación. La concentración de T_4 de acuerdo al estado reproductivo de los animales, dividiéndolos en vacas gestantes ($n = 115$) y vacas no gestantes ($n = 95$) se muestra en el tercio medio de la gráfica 7, encontrándose valores de 6.0 ± 0.4 ug/dl para las vacas no gestantes y 5.6 ± 0.3 ug/dl pa

ra las gestantes.

Influencia de la Lactación. En la misma gráfica (tercio derecho) se ilustra el $\bar{X} \pm e.e.$ de T_4 obtenido al separar a los animales de acuerdo a su producción láctea en "vacas secas" ($n = 71$) y vacas lactando ($n = 139$). Con esta agrupación es evidente que la concentración de T_4 (5.9 ± 0.1) en las vacas secas, es significativamente mayor ($P = 0.05$) que la observada en las vacas lactando (4.9 ± 0.2 ug/dl). Por lo anterior y tomando en cuenta su producción láctea, se decidió dividir arbitrariamente a los animales en tres grupos: 1, vacas buenas productoras (producción láctea mayor 9 lt/día), 2, vacas malas productoras (producción láctea menor 9 lt/día) y 3, vacas secas.

En ésta forma y considerando el resto de factores conocidos, las vacas se reagruparon de la siguiente manera:

- Vacas secas no gestantes.
- Vacas secas gestantes.
- Vacas lactando gestantes malas productoras (menor a 9 lt./día)
- Vacas lactando gestantes buenas productoras (mayor a 9 lt./día)
- Vacas lactando no gestantes malas productoras (menor 9 lt./día)
- Vacas lactando no gestantes buenas productoras (mayor 9 lt./día)

Los resultados de este análisis se muestra en la gráfica 8. En el periodo de muestreo correspondiente al mes de mayo, la comparación de los valores circulantes de T_4 para cada grupo solamente mostró una diferencia significativa

($p = 0.05$) en el grupo de animales malos productores gestantes ($LG < 9 \text{ lt/día}$) cuyo promedio fué de $5.9 \pm 0.4 \text{ ug/dl}$.

En el periodo de muestreo correspondiente al mes de octubre, las vacas secas no gestantes cuyo promedio de T_4 fué de $5.3 \pm 0.5 \text{ ug/dl}$, pueden considerarse como el grupo representativo del nivel basal de la hormona para ésta época del año. La comparación intergrupos en este mes solamente mostró una diferencia significativa ($p = 0.05$) en el grupo de animales malos productores no gestantes ($LNG < 9 \text{ lt/día}$). Este grupo además exhibe el nivel más alto de la hormona ($6.6 \pm 0.5 \text{ ug/dl}$) de toda la población estudiada independientemente del mes de muestreo. La diferencia que se observa en las buenas productoras gestantes ($LG > 9 \text{ lt/día}$) no es válida por lo pequeño de la muestra ($n = 2$).

Por otra parte, al comparar los niveles circulantes de la hormona entre el mes de mayo y el mes de octubre, observamos que solamente son significativamente diferentes las vacas malas productoras gestantes ($LG < 9 \text{ lt./día}$) y las vacas malas productoras no gestantes ($LNG < 9 \text{ lt./día}$), con un valor de $p = 0.05$ en ambos grupos.

En las gráficas 9 y 10 se muestran algunos ejemplos individuales de vacas observadas a lo largo de toda la etapa de gestación y postparto, correlacionando la cantidad de leche con las dos muestras de tiroxina analizadas (mayo y octubre). En ellas se intenta ejemplificar que la producción láctea en un mismo animal varía dependiendo del periodo de gestación o del postparto en el cual se en-

cuentre. Así por ejemplo en la gráfica 9 (porción izquierda), la vaca pasa de ma la productora gestante, con una concentración de tiroxina de 6.8 ug/dl en el mes de mayo; a buena productora no gestante con 4.2 ug/dl de la hormona en el mes de octubre. Debido a que de esta manera solamente se pueden comparar dos valo res de T_4 con la cantidad de leche producida, se decidió agrupar a las vacas en buenas y malas productoras, con respecto a los diferentes períodos de gestación y postparto, y considerar como variable independiente el mes en que fué tomada la muestra (mayo y octubre). Así, en la gráfica 11 se muestra la secuencia temporal de estas variables para el grupo de buenas productoras en el mes de mayo.

Es clara, que durante la gestación en estos animales existe una rela- ción inversa entre la concentración de T_4 circulante y la producción láctea ($p = 0.001$); así como una relación directa entre el mes de gestación y tiroxina. La co rrelación inversa (T_4 /leche) tiende a desaparecer conforme progresa la gestación; ya que durante el primer trimestre el valor de $r = -0.60$ ($p = 0.001$), mientras que en el segundo trimestre $r = -0.29$ ($p = ns^*$). La correlación directa (gestación/ T_4) se mantiene en los dos primeros trimestres, $r = 0.61$ y 0.57 respectivamente, con valores de $p = 0.001$ en ambos casos.

Por otra parte obsérvese que cuando las vacas están "secas", la canti dad de T_4 circulante se mantiene y muestra un discreto descenso durante el primer mes postparto. Sin embargo en este periodo ya no existen las correlaciones mencio nadas (T_4 /leche y meses p. parto/ T_4).

* ns = no significativa

Por lo que respecta a los animales buenos productores durante el mes de octubre (gráfica 12), el único periodo en el que se presentan estas correlaciones, es durante el postparto. Así, la correlación inversa T_4 /leche durante los tres primeros meses postparto tiene un valor de $r = -0.29$ ($p = 0.01$) y en el total de meses postparto $r = -0.345$ ($p = 0.001$). La correlación directa (mes p. parto/ T_4) resultó con valores de $r = 0.34$ y 0.46 respectivamente y de $p = 0.01 \geq 0.001$. El número de animales gestantes es insuficiente para realizar cualquier análisis estadístico.

En el caso de las vacas con producción menor a 9 lt/día e independientemente del mes de muestreo, no existe relación entre las distintas variables analizadas. Llama la atención que durante el mes de mayo (gráfica 13) los niveles circulantes de la hormona se encuentren elevados desde el inicio de la gestación y además, como ya se mencionó (gráfica 8), son significativamente mayores ($p = 0.05$) que en el resto de los animales gestantes.

En la gráfica 14 se muestran las vacas malas productoras durante el mes de octubre. En el periodo de gestación la relación entre la concentración de tiroxina y la producción láctea tiende a ser inversa aunque no significativa estadísticamente $p = 0.1$. La concentración de la hormona se mantiene constante durante la seca de las vacas y desciende en el momento del parto, exhibiendo un aumento muy marcado al primer mes postparto. En éste periodo se encontraron grandes variaciones tanto en la cantidad de tiroxina como en la producción láctea.

En la gráfica 15 se muestra la secuencia temporal de T_4 para las vacas secas con respecto al período de gestación en ambos meses. Para el mes de mayo, y a pesar de que el número de animales cursando el primer trimestre es pequeño, la concentración media de tiroxina (4.1 ± 0.15) es significativamente diferente ($p = 0.05$) con respecto a la observada en los dos siguientes trimestres, 4.8 ± 0.29 y 4.75 ± 0.36 ug/dl. respectivamente.

Como se muestra en ésta misma gráfica durante el mes de octubre, no se contó con animales cursando el primer trimestre de gestación, sin embargo el valor circulante de la hormona para el segundo trimestre fué de 6.1 ± 0.57 ug/dl, mientras que para el tercero fué de 4.73 ± 0.25 ug/dl.

Al comparar los valores obtenidos en ambos meses, en el mes de octubre existe una tendencia a mostrar valores más elevados de la hormona, especial-mente en el segundo trimestre, donde la diferencia en la concentración de la hor-mona (6.1 ± 0.57 vs 4.8 ± 0.29 ug/dl) es estadísticamente significativa ($p = 0.05$).

D. Variaciones Fisiológicas de Tiroxina en el Ganado Caprino

Debido a la escasa información recabada acerca de ésta especie en el periodo de gestación, así como de la cantidad de leche producida se agruparon de la siguiente manera:

- Cabras secas no gestantes.

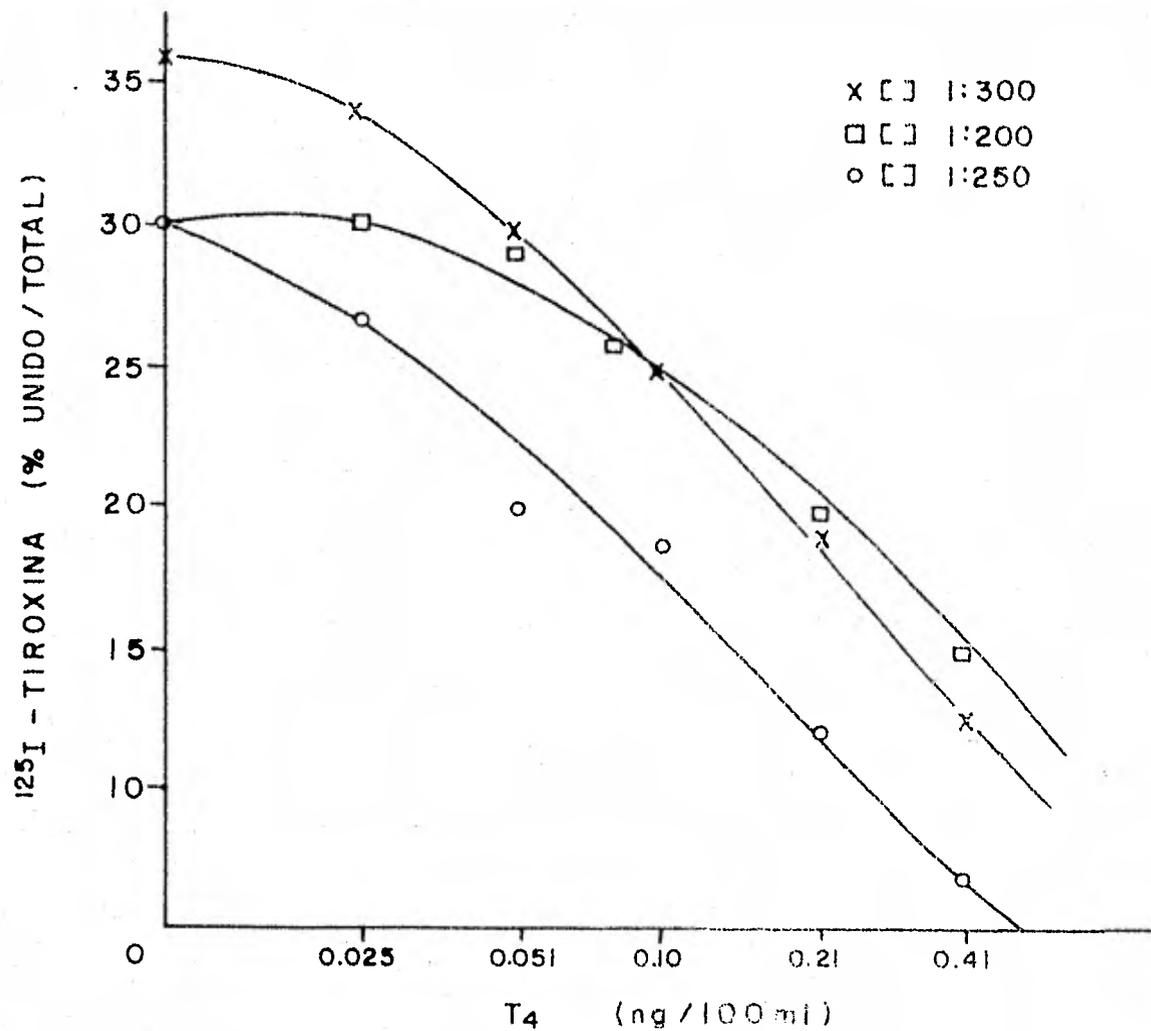
- Cabras secas gestantes
- Cabras lactando no gestantes
- Cabras lactando gestantes

Aunque las muestras analizadas pertenecen a diferentes razas, no presentaron ninguna diferencia significativa en la concentración de tiroxina circulante. Por ésta razón se consideraron como una misma población.

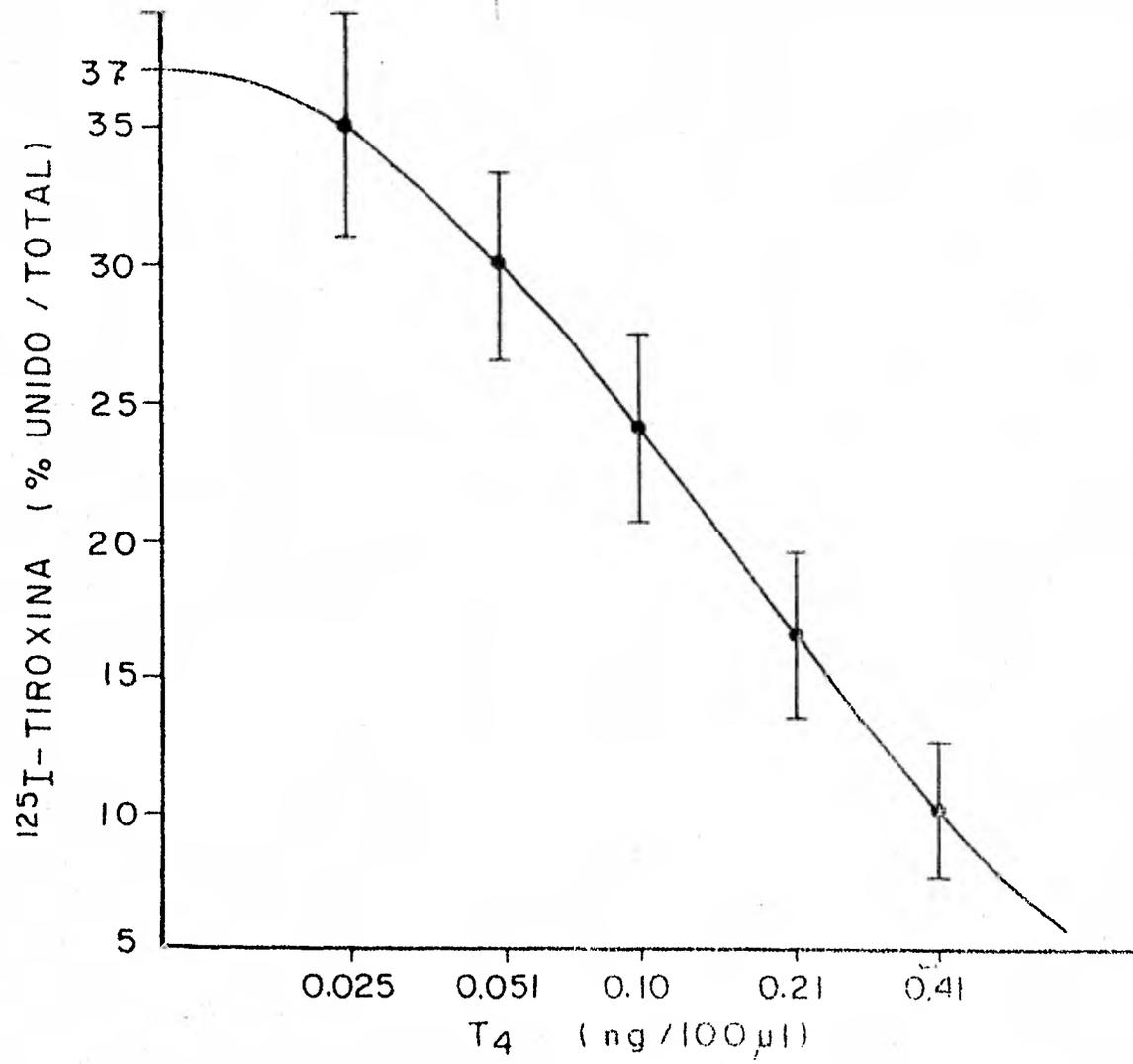
En la gráfica 16 se resumen los valores $\bar{X} \pm e.e.$ correspondientes a los estadios antes mencionados. La concentración de tiroxina más baja del grupo se encontró en las cabras secas no gestantes (3.9 ± 0.3 ug/dl), éste valor puede considerarse representativo del nivel basal para ésta especie. En los grupos de cabras lactando gestantes y no gestantes se observó un aumento significativo ($p = 0.02$) de tiroxina con respecto al nivel basal (4.93 ± 0.4 y 4.85 ± 0.22 ug/dl respectivamente). Las cabras secas gestantes son el único grupo de animales en quienes la concentración de tiroxina (5.6 ± 0.5 ug/dl) es más elevada y significativamente diferente con respecto a los dos primeros grupos ($p = 0.01$).

E. Variaciones Fisiológicas de Triyodotironina en Vacas y Cabras.

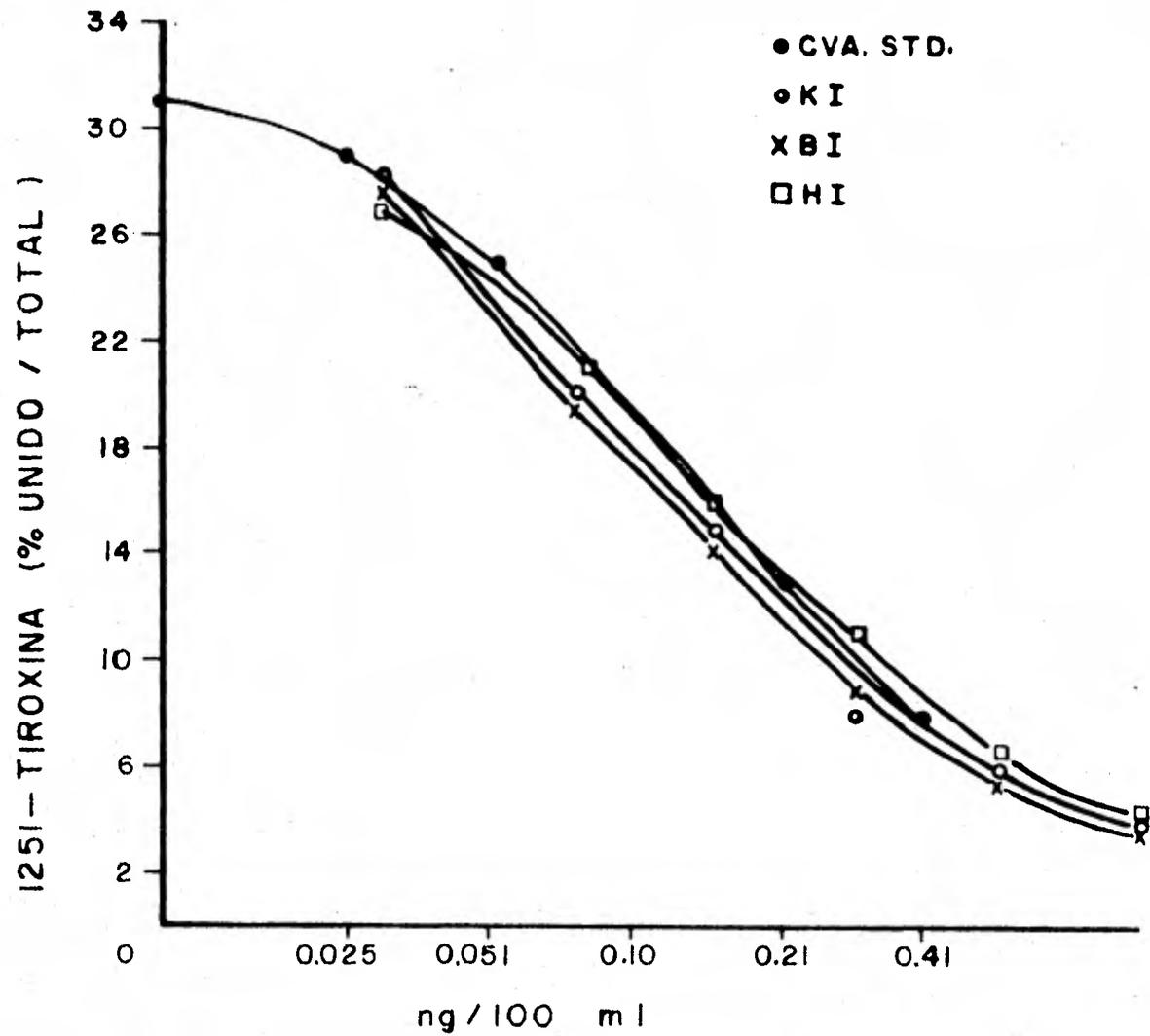
Los resultados obtenidos con la medición de triyodotironina en éstos dos grupos de bóvidos, no mostraron ninguna correlación de la hormona con respecto a los diferentes estados fisiológicos analizados en este estudio. Por lo cual nos limitamos a referir el valor promedio de T_3 en cada uno de los grupos.



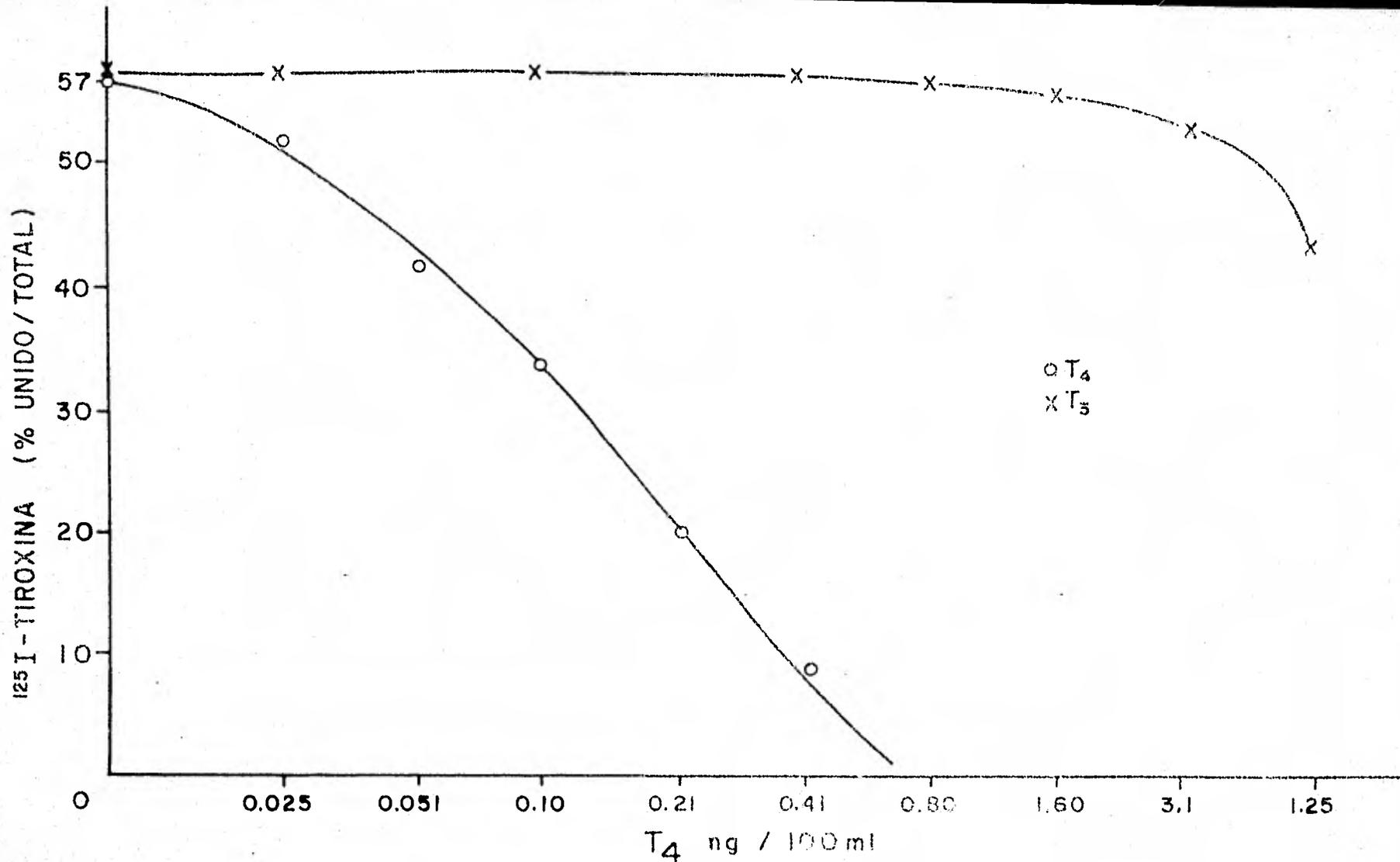
GRAFICA 1. Titulación del Anticuerpo C-19-E. Se tomaron en cuenta tres diluciones diferentes (1:200, 1:250 y 1:300).



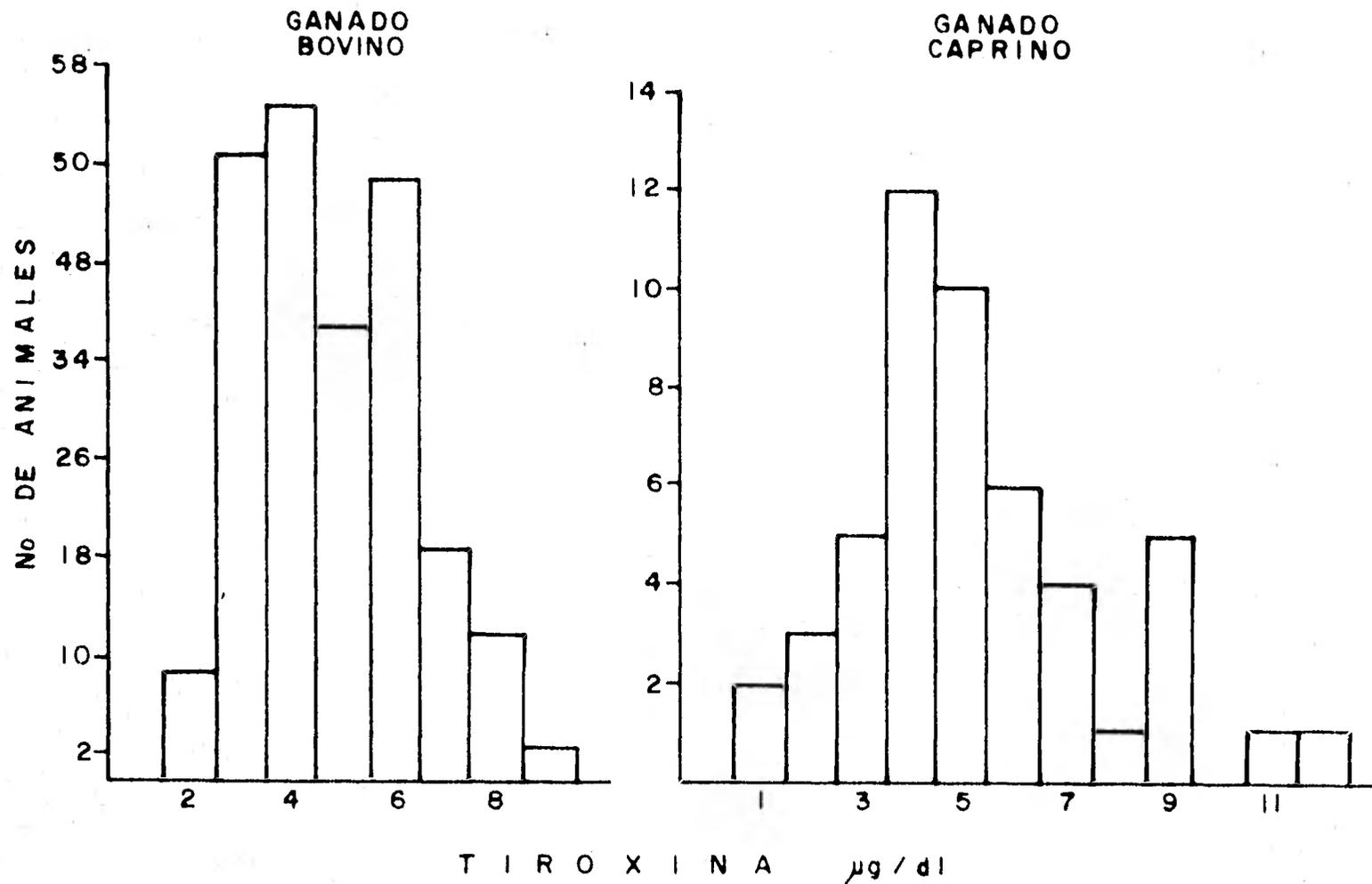
GRAFICA 2. Gráfica promedio de 16 curvas estándar. ($\bar{X} \pm d.e.$)



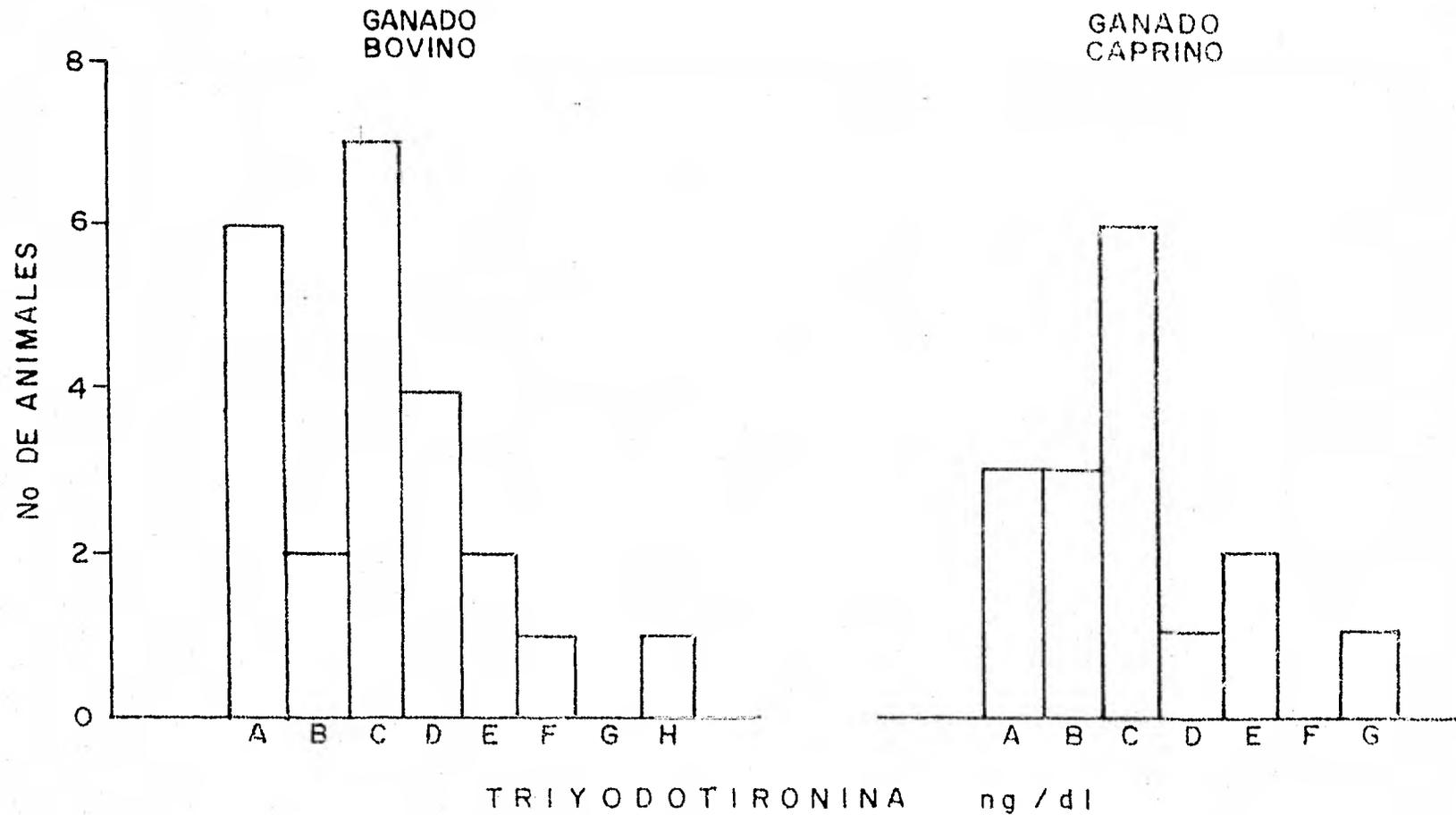
GRAFICA 3. Comparación de curvas estándar empleando diferentes sueros hipotiroideas (bovinos; BI, caprinos; KI, y humano; HI)



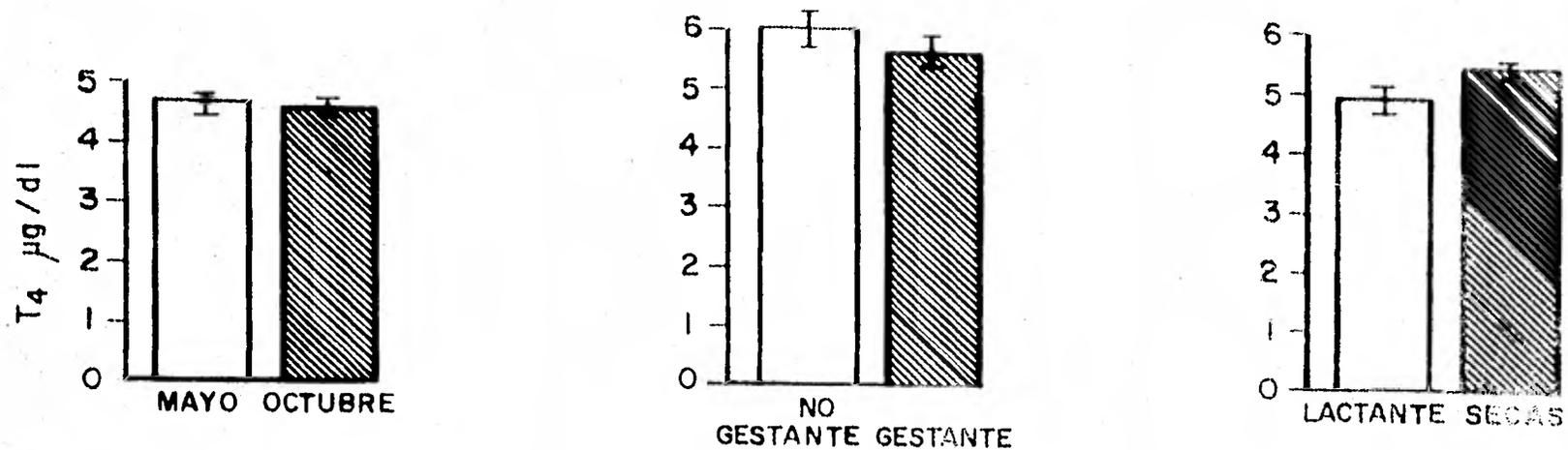
GRAFICA 4. Reactividad cruzada del anticuerpo anti-tiroxina C-19-E con la hormona triyodotironina (T₃).



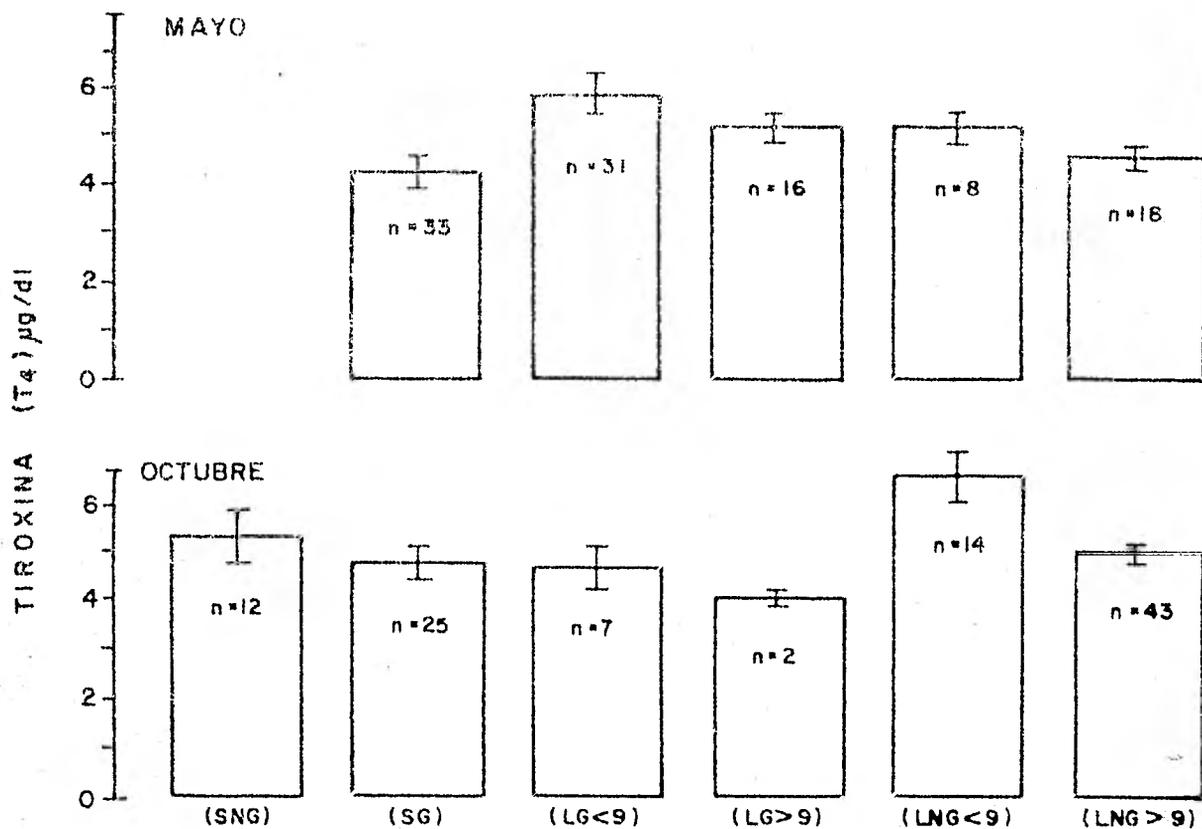
GRAFICA 5. Histogramas de frecuencia de la concentración de T_4 ($\mu\text{g/dl}$) en el suero de ganado bovino (mitad izquierda) y de ganado caprino (mitad derecha).



GRAFICA 6. Histogramas de frecuencia de la concentración de T_3 (ng/dl) en el suero de ganado bovino (mitad izquierda) y de ganado caprino (mitad derecha). Los intervalos de concentración son: A. 100-119, B. 120-139, C. 140-159, D. 160-179, E. 180-199, F. 200-219, G. 220-239 y H. 240-260 ng/dl.

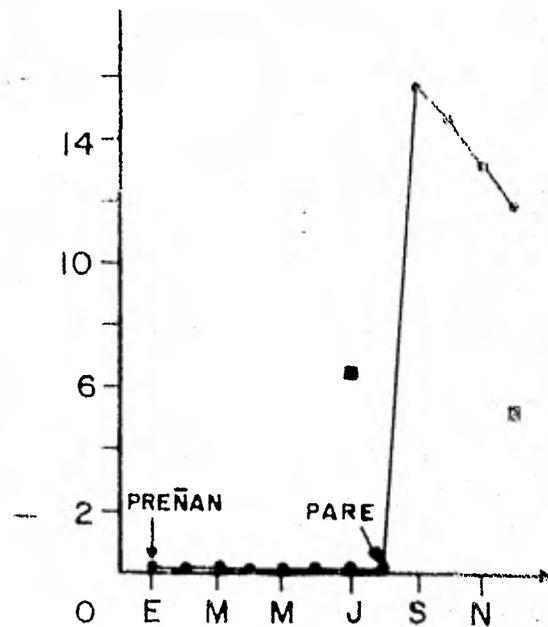
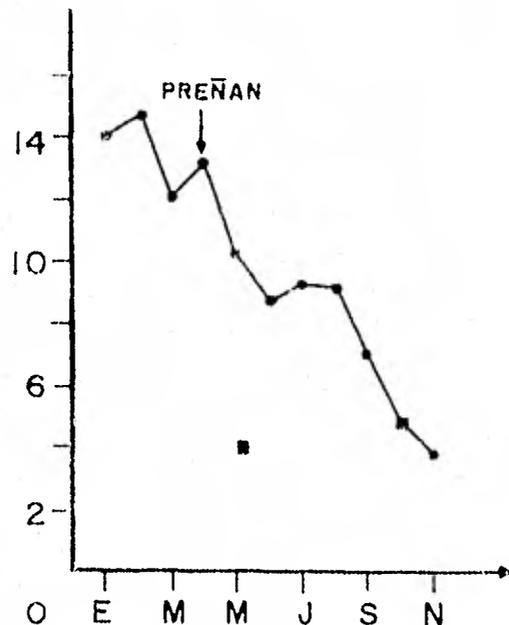
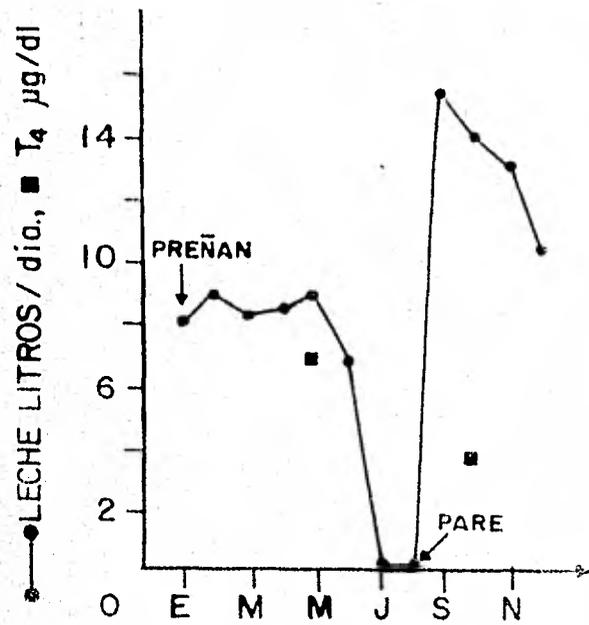


GRAFICA 7. Comparación de la concentración de tiroxina circulante en el suero de las vacas dependiendo de la época del año (tercio izquierdo) estado reproductivo (tercio medio) y la producción láctea (tercio derecho).



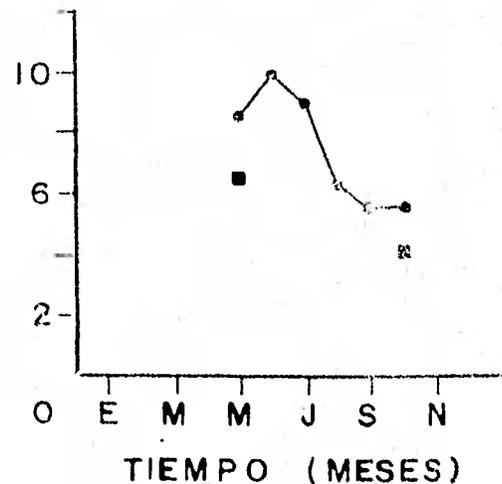
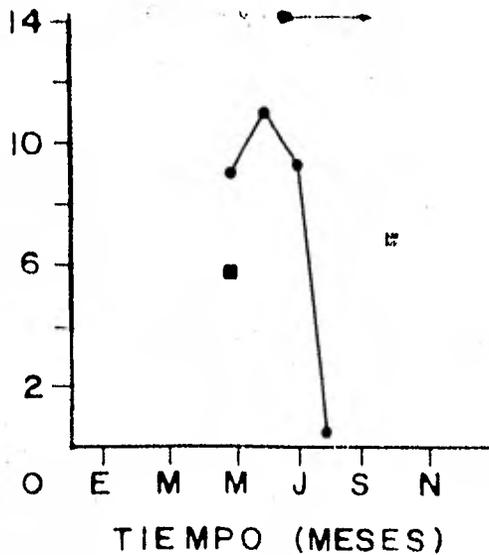
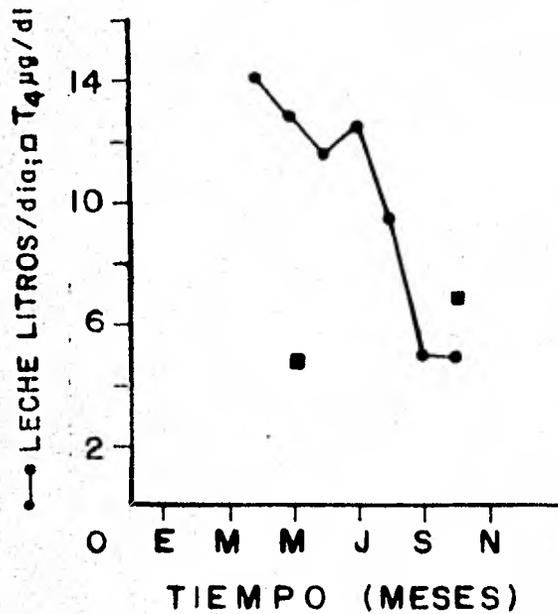
GRAFICA 8. Variaciones en los niveles circulantes de T_4 ($\bar{X} \pm e.e.$) según el estado de producción láctea y el estado reproductivo. Los resultados se dividieron de acuerdo a la época del año en que se obtuvieron las muestras. (Mayo: porción superior. Octubre: porción inferior).

SNG; Secas no gestantes, SG; Secas gestantes, LG > 9; Lactando gestantes con producción menor a 9 litros/día, LG < 9; Lactando gestantes con producción mayor a 9 litros/día, LNG > 9; Lactando no gestantes con producción menor a 9 litros/día, LNG < 9; Lactando no gestantes con producción mayor a 9 litros/día.

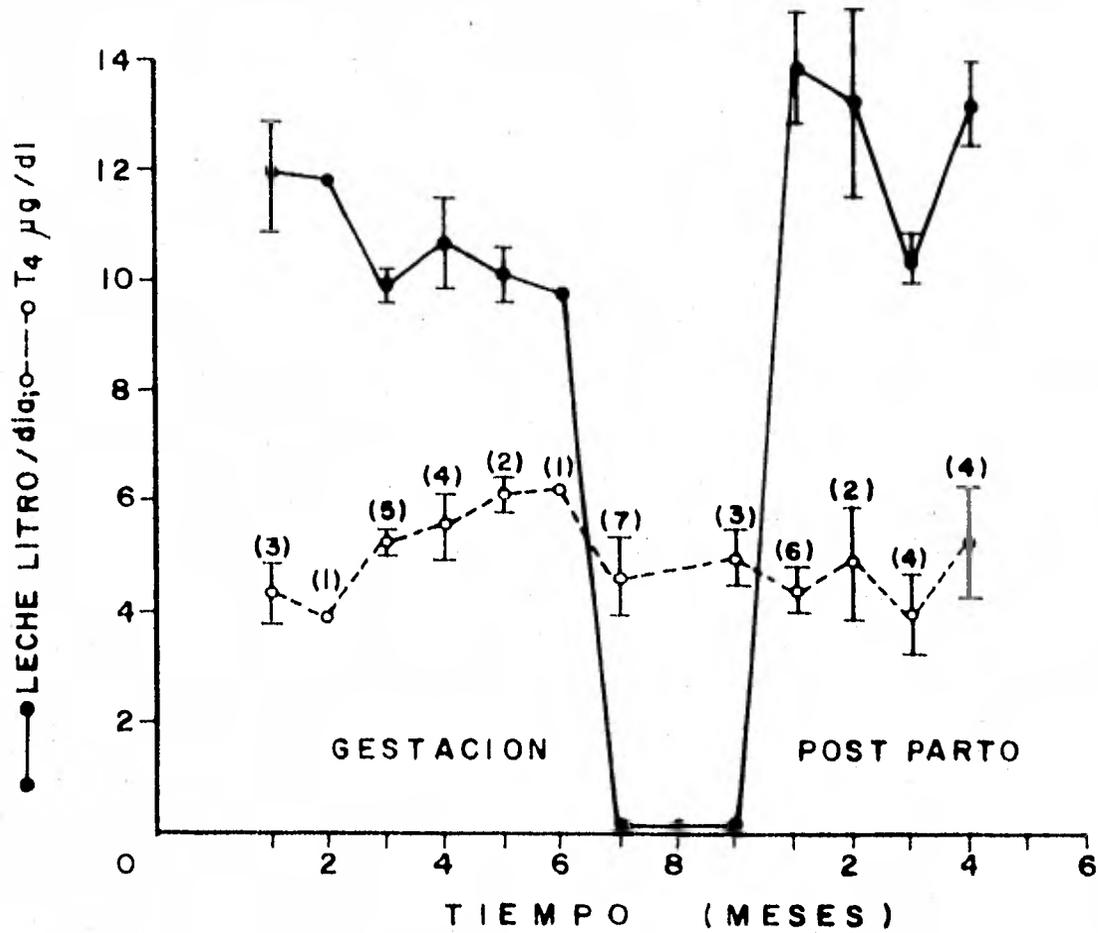


T I E M P O (M E S E S)

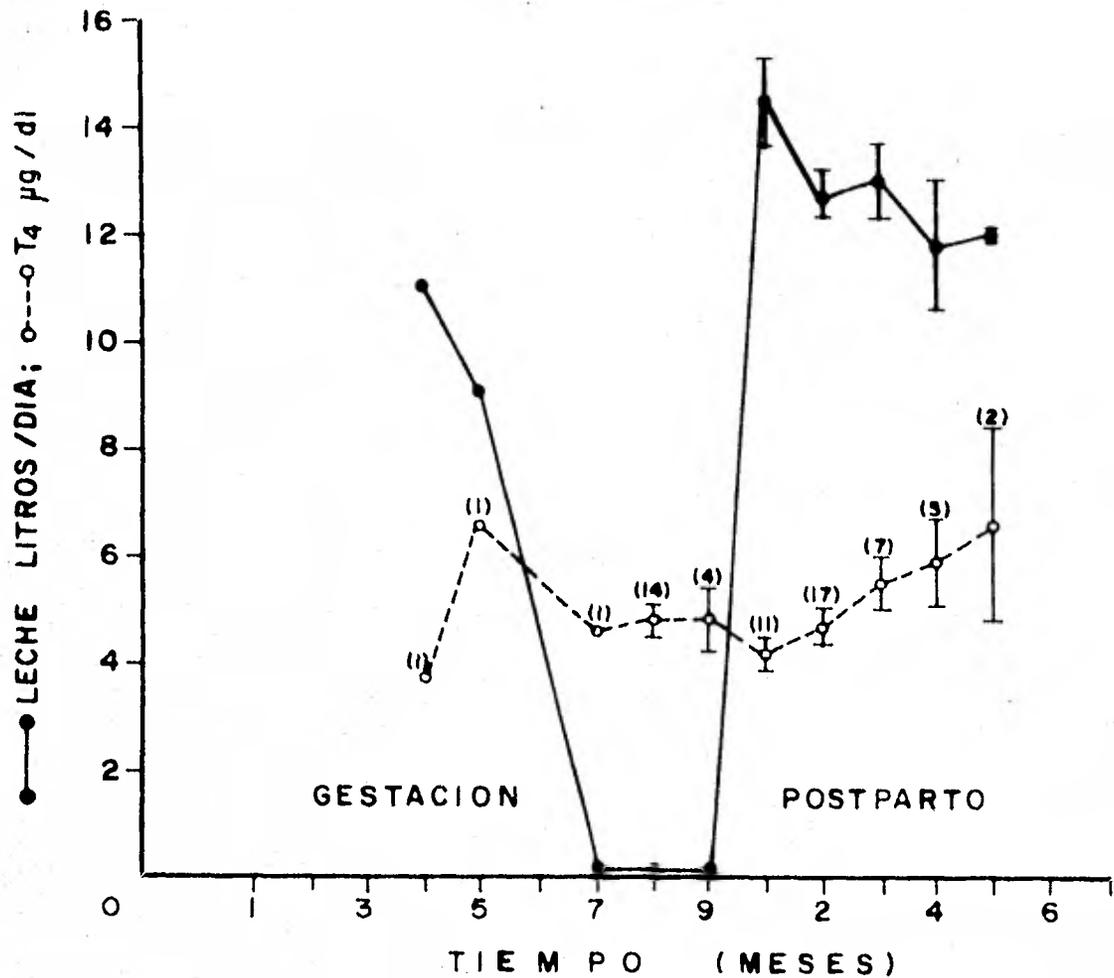
GRAFICA 9. Variaciones de T_4 y producción láctea en secuencia temporal. Ejemplos individuales.



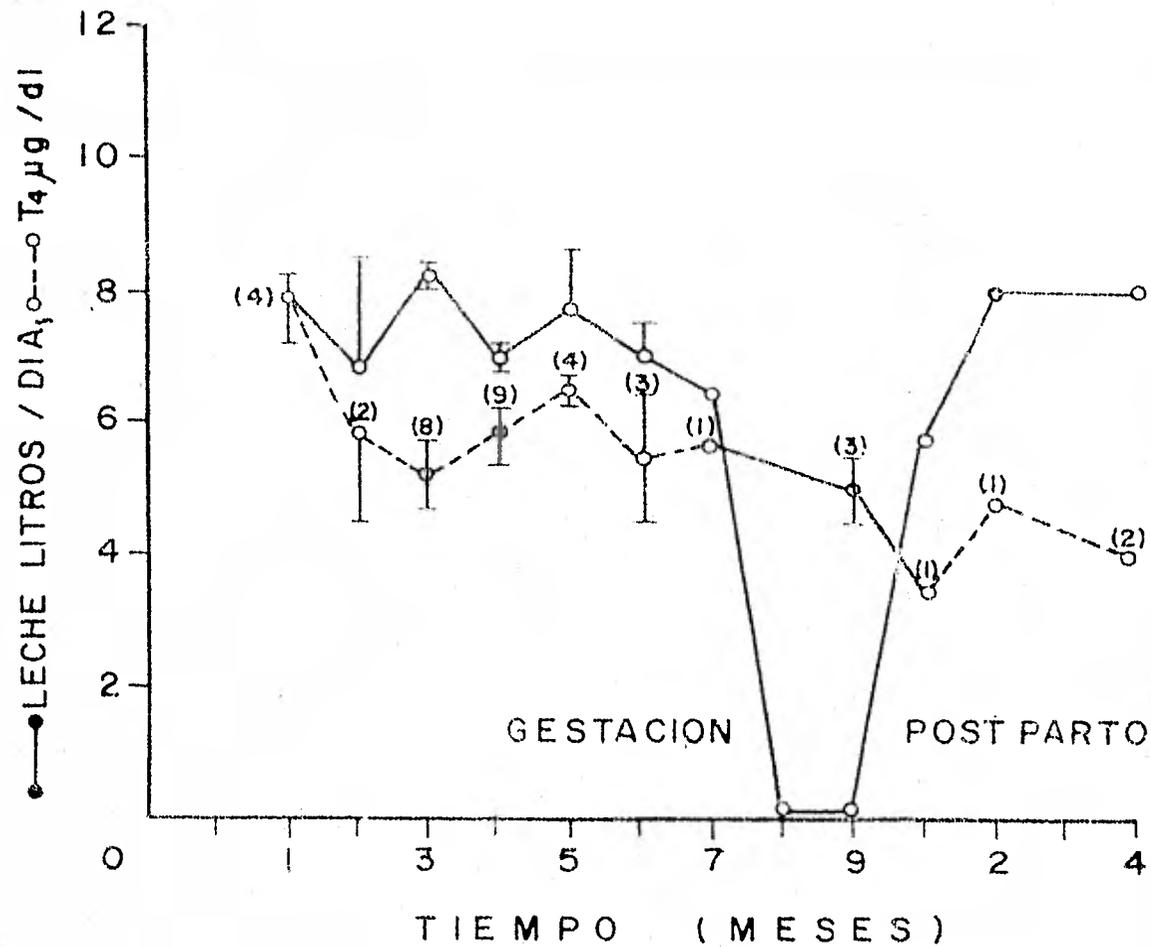
GRAFICA 10. Variaciones de T₄ y producción láctea en secuencia temporal.
Ejemplos individuales.



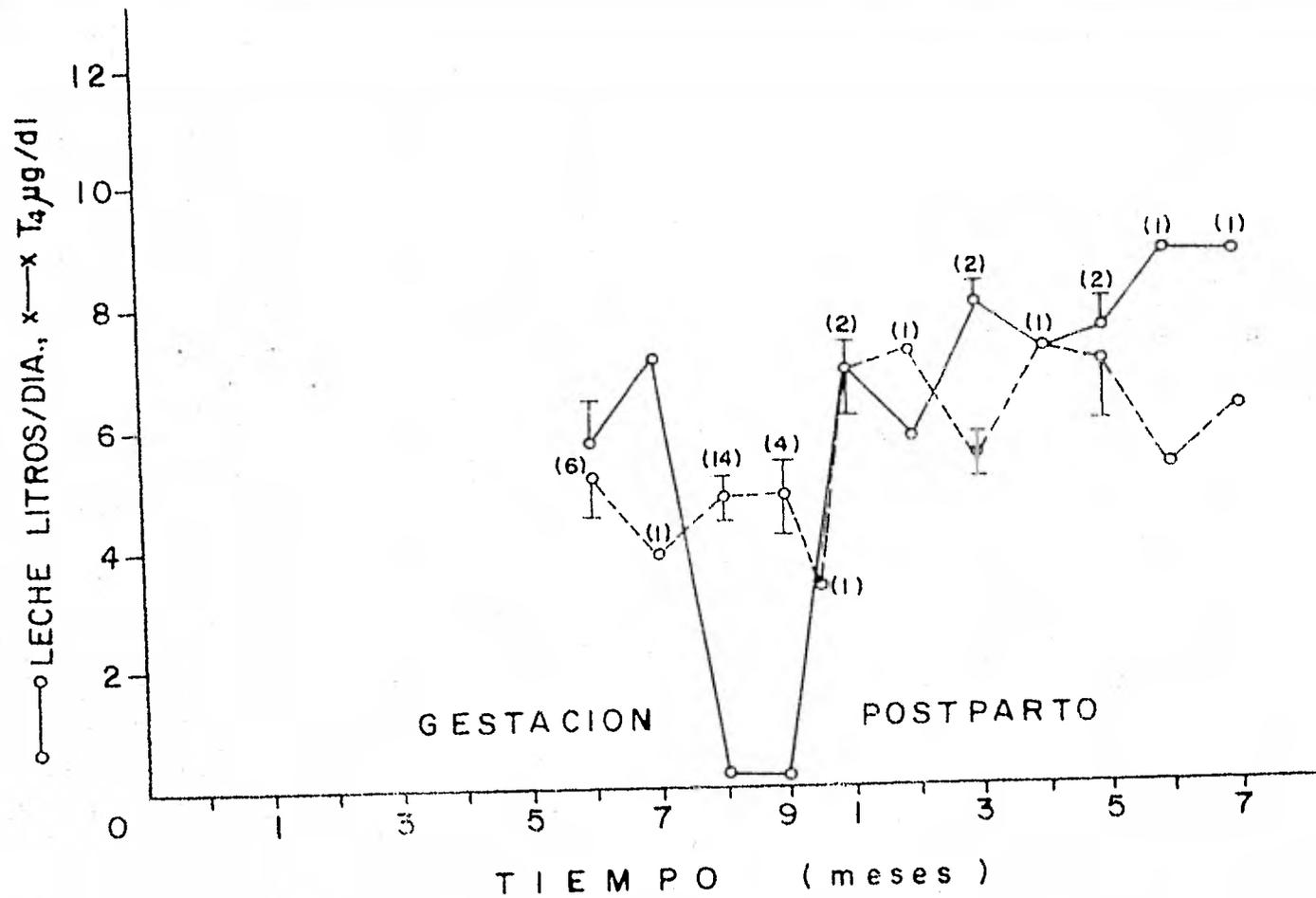
GRAFICA 11. Correlación y secuencia temporal de las variaciones en T_4 y litros de leche con respecto al estado reproductivo en vacas buenas productoras (mayor a 9 Lt/día). Todas las muestras se obtuvieron en el mes de mayo.



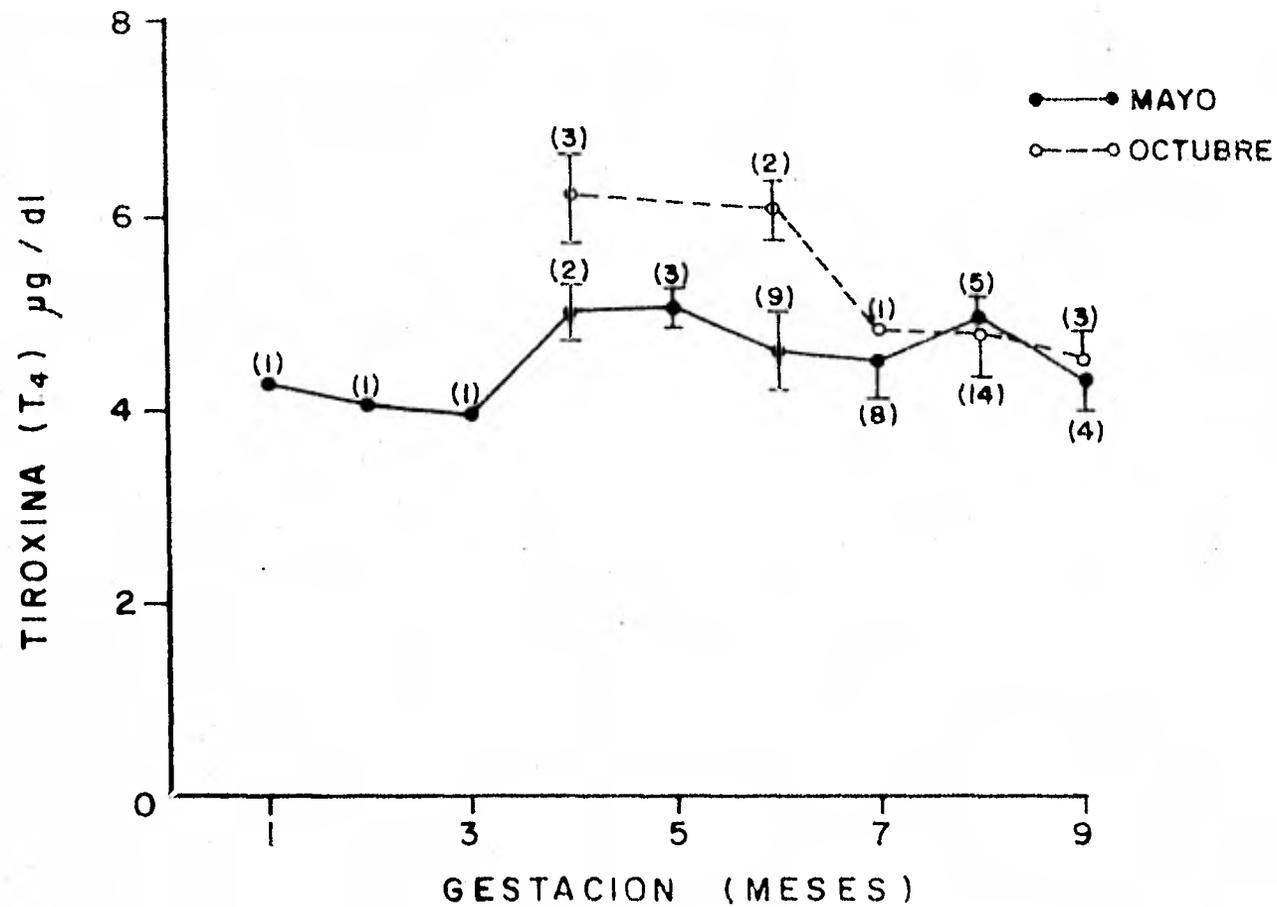
GRAFICA 12. Correlación y secuencia temporal de las variaciones en T₄ y litros de leche con respecto al estado reproductivo en vacas buenas productoras (mayor a 9 Lt/día). Todas las muestras se obtuvieron en el mes de octubre.



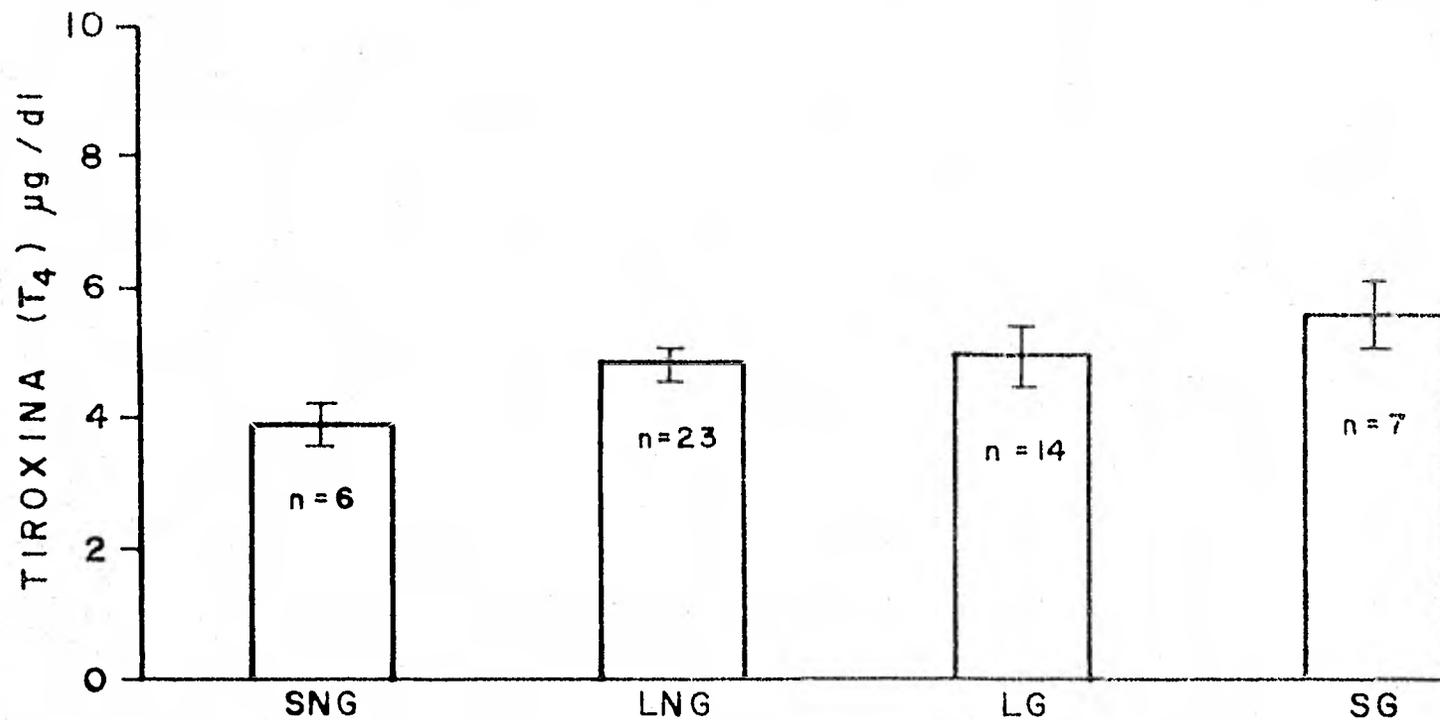
GRAFICA 13. Correlación y secuencia temporal de las variaciones en T_4 y litros de leche con respecto al estado reproductivo en vacas malas productoras (menor a 9 Lt/día). Todas las muestras se obtuvieron en el mes de mayo.



GRAFICA 14. Correlación y secuencia temporal de las variaciones de T₄ y litros de leche con respecto al estado reproductivo en vacas malas productoras (menor a 9 Lt/día). Todas las muestras se obtuvieron en el mes de Octubre.



GRAFICA 15. Secuencia temporal de las variaciones de tiroxina circulante con respecto al estado de gestación en vacas "secas" para ambos meses de muestreo.



GRAFICA 16. Variaciones en los niveles circulantes de T₄ ($\bar{X} \pm e.e.$) según el estado reproductivo y de producción láctea en ganado caprino. Las muestras se tomaron en el mes de abril.

V. DISCUSION

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que con las modificaciones introducidas a la técnica radioinmunométrica original (39), es posible determinar de manera directa los niveles circulantes en el suero de T_3 y T_4 de los bovinos y caprinos. El procedimiento es relativamente sencillo y confiable, y satisface los requerimientos y estándares de calidad habituales a ésta metodología (44). Conviene destacar que tomando en cuenta las observaciones recientes de Irvine - (28), la principal modificación introducida al método fué el empleo de suero homólogo en la curva estándar correspondiente. Aunque esta modificación requiere estudios posteriores que analizen los probables efectos de los solutos contenidos en el suero de cada especie, es evidente que, los resultados y la interpretación de éste autor son razonablemente válidos como para tomarlos en cuenta; así, en ésta forma al menos se descarta una posible fuente de variación.

Sobre éstas bases puede afirmarse que las concentraciones detectadas de T_3 y T_4 en éste estudio son válidas y confiables. Esta afirmación es aún más evidente si se considera que los valores de ambas hormonas son comparables a los informados (para éstas especies) en la literatura consultada (2-4, 11, 15, 27-30). Es importante enfatizar que hasta donde sabemos, este es el primer estudio realizado en México en el que se determinan y relacionan los niveles de T_3 y T_4 en vacas y cabras, con algunos estados fisiológicos de estos organismos. Esta situación obliga a comparar nuestros resultados con aquellos obtenidos en el extranjero. En este

sentido también resulta necesario hacer notar dos hechos:

1. La metodología de RIA empleada por los investigadores consultados no refiere el uso de suero homólogo;
2. Aunque la raza de las vacas es la misma (Holstein), las condiciones ambientales son diferentes y quizás también el cuidado y manejo de los animales.

Nuestro estudio sugiere que existe una relación inversa entre la cantidad de leche producida y la concentración de T_4 circulante. Esta observación concuerda con los datos referidos por Walsh y col. (3), Hart y col. (4) y Vanjonak y col. (2), y es probable que se deba, (al menos en parte), a la "captura" de la hormona por la glándula mamaria como sugieren los datos de Strb'ak y col. en mujeres lactando (4); así como los estudios de recambio hormonal en vacas lactantes (15). Este fenómeno sugiere que la glándula tiroidea es hiperactiva durante la lactación independientemente de que por su "consumo" en la glándula mamaria, las hormonas tiroideas circulantes se encuentran bajas.

Por otra parte ésta correlación inversa (leche/ T_4) contrasta con el bien conocido hecho de que en todos los mamíferos gestantes ocurre un aumento en la concentración circulante de T_4 como el resultado del incremento en la síntesis de las proteínas plasmáticas transportadoras de la hormona. Es decir, se esperaría encontrar concentraciones elevadas de tiroxina circulante en todos los grupos de animales gestantes.

El aumento de tiroxina circulante durante la gestación en bovinos ha sido reportado por Vanjonak (2), como progresivo a lo largo de la misma; mientras que Walsh (3) informa que éste solamente ocurre durante los dos primeros trimestres de gestación y posteriormente tiende a estabilizarse. Nuestros resultados obtenidos de los grupos de vacas secas (en mayo y en octubre) parecen estar más de acuerdo con esta última. Así y a pesar de que no contamos con animales cursando el primer trimestre de gestación en el mes de octubre y de que el número de animales durante éste periodo en el mes de mayo no sea representativo ($n = 3$), se observa un aumento de la hormona en el segundo trimestre ($p = 0.01$) y posteriormente tiende a estabilizarse o incluso a descender. Sin embargo en el mes de octubre, el segundo trimestre de gestación, es el que presenta el valor más alto $p = 0.001$, con respecto al tercer trimestre de este mismo mes; y al comparar los valores entre las dos estaciones del año, y observamos que es significativamente mayor.

Debido a que la gestación y/o lactogénesis y la producción láctea parecen tener un efecto antagónico en la concentración circulante de ésta hormona, es posible proponer que el resultado encontrado en el grupo de vacas malas productoras gestantes en el mes de mayo, en el cual la T_4 se encuentra elevada desde el primer mes de gestación, se deba probablemente a que el efecto esperado de la producción láctea no sea suficiente para contrarrestar la elevación de la hormona por la gestación y/o lactogénesis. Sin embargo el efecto esperado se encuentra en las vacas buenas productoras en el mes de mayo, en donde a pesar de que los valores absolutos de la hormona no son significativamente diferentes al resto de los gru

pos muestreados, si exhiben una correlación directa y significativa conforme progresa la gestación.

En el caso de las vacas gestantes con una producción láctea mayor y menor a 9 litros/día en el mes de octubre, desafortunadamente no se contó con animales cursando los primeros trimestres de la gestación, ya que de hecho, la mayoría de los partos ocurren alrededor de ésta temporada. En el caso de las vacas malas productoras no gestantes en éste mismo mes, el nivel circulante de la hormona es el más elevado y significativo ($p = 0.05$) al resto de los grupos analizados en este mismo mes; sugiriendo que se debe a la elevación de la hormona por la lactación; así como al poco "consumo-captura" dada por la glándula mamaria.

Por otra parte, en nuestro estudio parece intervenir otro factor: la temperatura ambiental, que de acuerdo a lo informado en la literatura (45, 46, 47), deprime tanto los niveles circulantes de la hormona, como la producción diaria de leche. Efectivamente en diversos estudios Yousef y col. (45) han demostrado que en bovinos lactando y gestantes, la exposición crónica (4 semanas) a altas temperaturas (32°C), deprime la producción láctea y la actividad tiroidea. Nuestros resultados están de acuerdo con ésta información y permitirán explicar nuestra observación de que las vacas gestantes y lactando con una producción mayor a 9 litros/día no exhiban niveles más elevados de la hormona durante el mes de mayo.

Por otra parte e independientemente de la diferencia en tiempo y en temperaturas absolutas, nuestro estudio muestra que en las vacas malas productoras

gestantes, las concentraciones de T_4 en ambos meses (mayo y octubre) son menores (5.9 ± 0.4 y 4.8 ± 0.5 ug/dl respectivamente), que los informados por Vanjanak (2) en animales gestantes y malos productores (11 litros, 7.17 ug/dl).

Este efecto "depresor" de la temperatura ambiental también se observa claramente en el período de postparto, tanto en buenas como malas productoras en el mes de mayo. Efectivamente, durante éste mes y en contraste con el período de postparto en octubre, la hormona se mantiene constante en el tiempo y la cantidad de leche sigue el patrón establecido. En apoyo a ésta interpretación, es importante recordar que en el caso de las vacas malas productoras muestreadas en octubre, aunque la hormona presenta los valores mas elevados del grupo, tiende a conservarse la relación inversa entre leche/ T_4 (aunque no sea estadísticamente significativo), reflejando con ésto que en ese mes el estrés calórico (36°C) no es tan drástico. Esta observación permite proponer que el estrés térmico impone en el organismo una demanda "extra" en términos de su capacidad homeostática que se refleja en los niveles de ésta hormona tiroidea. Es decir resulta válido interpretar que durante la temperatura extrema (mayo, 42°C), el patrón de tiroxina en la fase de postparto, refleja un mayor consumo de la hormona para mantener una producción suficiente a la demanda de leche impuesta por la cría.

En el caso del ganado caprino, se observa el aumento de la hormona a lo largo de todo el período comprendido entre las cabras secas no gestantes a las cabras secas gestantes.

Los resultados obtenidos en este estudio muestran que las hormonas tiroideas juegan un papel importante en el proceso de la lactación. Sin embargo se conoce que existen, además un sin número de variables fisiológicas, ambientales e incluso conductuales, que participan también activamente en este proceso. Por esta razón es importante ubicar a nuestros resultados en un contexto multifactorial en el cual se requiere el estudio y la correlación del mayor número de variables que participan en el fenómeno de la lactancia.

VI. CONCLUSIONES

1. Se desarrolló un procedimiento radioinmunométrico que permite determinar en forma directa las concentraciones circulantes de T_3 y T_4 en gonodo bovino y caprino. El procedimiento es altamente específico, sensible y preciso.

2. Este estudio muestra claramente la necesidad de tomar en cuenta la zona geográfica, clima, tipo de alimentación y estado fisiológico en el cual se encuentre el organismo en experimentación. Sobre ésta base, los valores obtenidos de T_3 y T_4 son válidos y específicos para las zonas geográficas y las condiciones fisiológicas y ambientales citadas.

3. Nuestro estudio muestra una relación inversa entre la concentración de T_4 circulante y la cantidad de leche producida. Esto es particularmente claro en los animales con producción láctea mayor a 9 litros/día. Aunque nuestro estudio no lo demuestra, es válido proponer que la "captura-consumo" de la hormona por la glándula mamaria informada por otros autores (5), "enmascara" el aumento en la actividad funcional de la glándula tiroidea secundario a la lactación (15).

4. Es probable que el estrés provocado por las altas temperaturas ambientales ($> 30^\circ\text{C}$), deprime los niveles circulantes de T_4 , así como la producción láctea.

5. Es probable que los niveles circulantes de tiroxina en temperaturas extre

mas (42 °C), reflejen la capacidad homeostática del organismo con respecto a man tener una producción láctea suficiente para la sobrevivencia de la especie.

6. Los factores fisiológicos y ambientales analizados en este estudio tie nen indudable importancia en el proceso productivo. Sin embargo, se requieren estudios más amplios que permitan correlacionar nuestros datos con los demás fac tores que intervienen en el proceso de la lactación.

BIBLIOGRAFIA

1. Schmidt, G.H. (1971) *Biology of Lactation*. W. H. Freeman and Company, San Fco. pp. 77-87.
2. Vanjonak, W.J. y Johnson H.D. (1975). Effects of moderate heat and milk yield on plasma thyroxine in cattle. *J. Dairy Sci.* 58: 507-510.
3. Walsh, D.S. Vasely, J.J. y Mahadevan, S. (1980). Relationship between mil production and circulating hormones in dairy cows. *J. Cairy Sci.* 63: 290-294.
4. Hart, J.C. Benes, J.A. y Morat S.V. (1979). Endocrine control of energy metabolism in the cow. Correlations of hormones and metabolites in high and low yielding cow for stage of lactation. *J. Dairy Sci.* 62: 270-278.
5. Strb'ak V. (1976). Thyroxine (by competitive protein binding analysis) in human and cow milk and infant formulas. *Endocrinol. Exp. (Bratisl.)*. 10: 167-174 .
6. Morris, D.O. (1980). *Vertebrate Endocrinology*. Lea and Febiger, Philadelphia, pp. 180-220.
7. Gray, C.H. (1976). Metabolism of thyroid hormones. En: *Hormones in Blood Vol. 1*. C.H. Gray y A.L. Bacharach (Edits.) Acad. Press, New York, pp. 254-263.
8. Guyton, A.C. (1971). *Tratado de Fisiología Médica*. Editorial Interamericana, México. pp. 952-964.
9. Benthey, P.J. (1976). *Comparative Vertebrate Endocrinology*. Cambridge University Press, New York, pp. 24-27, 369-375.

10. Martínez Escalera G., Grosvenor, C.E. y Mena F. Regulación Neuro-endócrina de la Secreción de Prolactina durante la lactancia. En: Nuevos Conceptos Sobre Fisiología y Patología Hipotálamo-Hipofisiaria. C. Valverde-R., G. Fanghanel, y F. Mena. (Edits.), PRONALSA-CONACYT, (En prensa, 1982).
11. Convey, E.M. (1974). Serum hormone concentration in ruminants during mammary growth, lactogenesis and lactation. A. Review. *J. Dairy Sci.* 57: 905-925
12. Akers, M. (1981). Prolactin regulation of milk secretion and biochemical differentiation of mammary epithelial cells in periparturient cows. *Endocrinology*, 109: 23-29.
13. Pirlot, P.J. (1976). Morfología Evolutiva de los Cordados. Omega, S.A. Barcelona pp. 836-841.
14. Kenneth, S. y Lazarus, J.H. (1971). The Thyroid and its control. *Ann. Rev. Physiol.* 39: 349-371.
15. Pipes, G.W. y Premachandra B.N. (1959). The biological half-life of L-T₄ and L-T₃ in the blood of the dairy cow. *J. Dairy Sci.* 42: 1606-1611.
16. Tata, J.R. (1980). The action of growth and developmental hormones. *Biol. Rev.* 55: 285-319.
17. Motta, M. Piva, F. Tima, L. Zanisi, M. y Martini L. (1969). Feedback mechanisms and control of the secretion of the hipotalamic releasing factors. En: *Hormones and The Environment. Memoirs of the Society for Endocrinology*, Cambridge University Press. 18: 407-422.
18. Melander, A. Ericson, L.E. Sundler F. (1974). Sympathetic innervation of the mouse thyroid and its significance in thyroid hormone secretion. *Endocrinology*, 97: 959-966.

19. Wylie, V., Riviere, C. y Brown, M. (1977). Regulatory peptides of hypothalamus. *Ann. Rev. Physiol.* 39: 473-527.
20. Highnam, K. y Hill, L. (1977). *The Comparative Endocrinology of the Invertebrates*. 2nd Edition Edward Arnold Ltd. London.
21. Spangenberg, D.B. (1965). A study of strobilation in Aurelia aurita under controlled conditions. *J. Exp. Zool.* 160: 1-10.
22. Silverstone, M., Galton V. A. y Ingbar, S.H. (1978). Observations concerning metabolism of iodine by polyps of Aurelia aurita. *Gen. Comp. Endocr.* 34: 132-140.
23. Spangenberg D.B. (1967). Iodine introduction of metamorphosis in Aurelia aurita. *J. Exp. Zool.* 165: 441-449.
24. Novak, V.J.A. (1975). *Insect Hormones*. Chapman y Hall, London. pp. 438-442.
25. Gorbman, A. (1959). *Problems in the Comparative Morphology and Physiology of the Vertebrate Thyroid Gland*. John Wiley and Sons. New York. pp. 22-30.
26. Leup, J., Fontaine M., La Posta, A., Roche, J. (1978). Thyroglobulin biosynthesis in larval (ammocoete) and adult freshwater lamprey (*Lampetra planeri* Bl.). *Comp. Biochem. Physiol.* 60B: 87-91.
27. Refetoff, S., Robin, N.I., Fang, V. S. (1969). Parameters of thyroid function in serum of 16 selected vertebrate species. A study of PBI, serum T₄, free T₄ and the pattern of T₄ and T₃ binding to serum proteins. *Endocrinology* 86: 793-805.
28. Irvine, C.H.G. (1980). Measurement of free and total T₄ and T₃ in domestic animals. *Thyroid Research VIII*, Australian Acad. Science. Canberra pp. 252-255.

29. Leining, K.B. Tucker, H.A. y Hisner, J.S. (1980). Growth hormone, glucocorticoid and thyroxine response to duration, intensity and light in prepuberal bulls. *J. Anim. Sci.* 51: 932-941.
30. Hurley, W.L. Convey, E.M. Lueng, K. Edgerton, L.A. y Hensken, R. W. Bovine prolactin, TSH, T₄ and T₃ concentrations as affected by tall fescues summer toxicosis and temperature. *J. Anim. Sci.* 51: 374-379.
31. Medda, A. K. (1980). Thyroid Hormone Action in magur fish and silkworms. *Thyroid Research VIII. Proceedings of the Eighth International Thyroid Congress, Sydney, Australia, 3-8 february,*
32. Etkin, W. (1978). The thyroid. A gland in search of a function. *Perspective. Biol. Med.* 46: 19-30.
33. Dickhoff, W.W. Folmar, L.C., Gorbman, A. (1978). Changes in plasma thyroxine during smoltification of Coho salmon. *Oncorhynchus kisutch*. *Gen. Comp. Endocr.* 36: 229-232..
34. Odell, Daughaday. (1971). Principles of competitive protein-binding assays *J.V. Lippincott, Co.* 429-432.
35. Ekins, R.P. (1974). Basic principles theory. *Brit. Med. Bull.* 30: 3-11.
36. Yalow, R.S. y Berson, S.A. (1959). Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods. *Nature* 184: 1648-1654.
37. Rufz, J.A. (1976). Implementación y normalización del radioinmunoanálisis de gastrina. Tesis de Licenciatura de Químico. Universidad Iberoamericana Incorporada a la U.N.A.M. Dpto. de Química. México, D.F.
38. Chopra, I.J. Nelson, J. Solomon, D.H. y Beall, G.N. (1971). Production of antibodies specifically binding T3 and T4. *J. Clin. Endocr.* 32: 299-308.

39. Beltrán, M. Nieto, L. Cuelas, L. Ruiz, E. y Valverde-R.C. (1974). Cuantificación directa de tiroxina sérica total por radioinmunoanálisis. *Rev. Invest. Clin. (Méx.)* 26: 125-131.
40. Binoux, M.A. and Odell, W.D. (1973). Use of dextran-coated charcoal to separate antibody-bound from free hormone: A critique. *J. Clin. Endocr. Metab.* 36: 303-310.
41. Hurley, W.L., Convey, E.M., Leung, K., Edgerton, L.A. y Hemkem, R.W. (1981). Bovine prolactin, TSH, T4 and T3 concentrations as affected by tall fescue summer toxicosis and temperature. *J. Anim. Sci.* 51: 374-379.
42. Dutrem, S. T. (1977). Radioinmunoanálisis de Triyodotironina (T₃) Utilidad Clínica. Tesis de Postgrado. División de Estudios Superiores, Facultad de Medicina, U.N.A.M. México, D.F.
43. Rodbard, D. (1974). The validation of assays and the statistical treatment of results. *J. Endocr.* 63: 1-4.
44. Chopra, I.J. (1972). A radioimmunoassay for measurement of thyroxine in unextracted serum. *J. Clin. Endocr. Metab.* 34: 938-947.
45. Yousef, M.K. y Johnson A. D. (1966). Calorigerensis of dairy cattle as influenced by tiroxine and environmental temperature. *J. Anim. Sci.* 25: 150-156.
46. Collins, J.K. y Weiner, J.S. (1968). Endocrinological aspects of exposure to high environmental temperatures. *Physiol. Rev.* 48: 785-839.
47. Dantzer, R. (1982). El stress en los animales de cría. *Ciencia y Desarrollo*, Enero-Febrero 1982. No. 42. Año VII. CONACyT. México. pp. 117-127.