



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES  
"IZTACALA"

CARACTERIZACION DE LA MONODESYODACION  
HEPATICA Y NEURAL DE TIRONINAS DURANTE  
LA EMBRIOGENESIS EN AVES.

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER LA LICENCIATURA EN

**B I O L O G I A**

P R E S E N T A :

Silvia Elizabeth Reyes Zárate



MEXICO, D. F.

1990



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.

A MIS ADORABLES Y QUERIDISIMOS

PADRES

A Pipe  
Hector  
Miriam  
Erick  
y  
Pita

Con todo mi Amor  
a tí Adrián

AGRADECIMIENTOS:

A la Universidad Nacional Autónoma de México.

A la Escuela Nacional de Estudios Profesionales Iztacala.

El apoyo brindado de CoNacyT por su Beca-Tesis.

Al Dr. Enrique Pedernera y la Biol. Carmen Méndez por la obtención y mantenimiento del material biológico.

Con gran aprecio a los Doctores Carmen Aceves y Carlos Valverde-R por su valiosa asesoría, ayuda y amistad.

A mis amigas Brenda, Gaby y GR por el compañerismo brindado a lo largo de éste trabajo.

La presente Tesis se realizó en el Laboratorio de Fisiología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, bajo la dirección de los Dres. Carmen Aceves y Carlos Valverde-R; patrocinado parcialmente por el donativo G101 - 7233; PRDCyT-OEA/CoNaCyT.

## INDICE

I.	INTRODUCCION	2
II.	ANTECEDENTES	
	A. LA GLANDULA TIROIDES Y LAS HORMONAS TIROIDEAS	
	1. Aspectos Filogenéticos	5
	2. Consideraciones Anatómicas	6
	3. Biosíntesis y Secreción de Hormonas Tiroideas	9
	a) Tiroglobulina	10
	b) Metabolismo de Yodo	11
	c) Síntesis y Secreción de Tironinas	12
	4. Control y Regulación de la Glándula Tiroides	15
	5. Tironinas Circulantes	18
	6. Mecanismos de Acción	20
	7. Metabolismo y Biotransformación Periférica	24
	B. ESTRATEGIAS DE DESARROLLO EMBRIOGENICO	33
III.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	38
IV.	RESULTADOS	44
V.	DISCUSION	51
VI.	CONCLUSIONES	55
VII.	REFERENCIAS	58

## I. INTRODUCCION

Una de las peculiaridades mas obvias de los organismos multicelulares es la diferenciación y especialización celular. Esta característica les permite llevar a cabo funciones específicas y diferentes, aumentando así la versatilidad del organismo como un todo. Sin embargo, la operación óptima de estos diversos tipos celulares requiere el desarrollo concomitante de un medio eficaz de comunicación interna que permita coordinar y regular sus múltiples actividades (Hardy, 1984).

A este respecto existe, entre otros, un sistema de comunicación cuyas células influyen sobre el resto liberando a la sangre productos químicos específicos llamados hormonas. Este término proviene de la palabra griega *hormon* que significa excitar o mover. En los animales superiores las hormonas son producidas por glándulas endócrinas, que no tienen conductos excretores y vierten sus productos directamente a la sangre. Aunque esta forma de transmisión es más lenta que la que se logra con el impulso nervioso, los efectos hormonales abarcan la mayoría de órganos y tejidos en todo el cuerpo (Malkinson, 1975; Valverde-R y col., 1988; Hardy, 1984). Esta característica de "mensajería a distancia" aunada a su especificidad en relación a su órgano

blanco, permite entender porque las hormonas no son solo importantes, sino absolutamente indispensables para la vida del organismo (Romer, 1973; Malkinson, 1975; Valverde-R y col, 1988).

Dentro de este sistema de comunicación, las hormonas tiroideas (HT) tienen un papel preponderante puesto que regulan diversos procesos celulares, que involucran entre otros, la regulación calorígenica y metabólica de practicamente todas las células del organismo (Tata, 1980; Iwai, 1987). Además en diversas especies su acción es particularmente significativa durante el desarrollo fetal, donde la maduración de organos esenciales como el cerebro, dependen de un adecuado aporte de estas hormonas (Iwai, 1987; Kitagawa y col, 1987; Bellabarba y col, 1988).

Recientemente se ha reconocido que la magnitud del efecto biológico de las HT esta relacionado a mecanismos de monodesyodación periférica que son organo - específicos. A través de esta monodesyodación, la tiroxina ( $T_4$ ) es biotransformada en una hormona 5 veces más activa, la triyodotironina ( $T_3$ ); o bien, en una tironina sin actividad biológica reconocida, la triyodotironina reversa ( $rT_3$ ). Por sus implicaciones biológicas, a una y otra biotransformación se les conoce, respectivamente, como vía de activación o 5'-D y de desactivación o 5-D (Kaplan, 1984).

Es bien sabido que en los animales altriciales (inmaduros neuralmente al nacimiento), la actividad desyodativa 5'-D hepática esta deprimida durante todo el desarrollo fetal. En contraste, estudios recientes han mostrado que en el caso de las especies precociales (maduros neuralmente al nacimiento), esta actividad se presenta desde etapas embrionarias tempranas (15vo día de incubación), y que en el caso específico de los pollo esta actividad enzimática parece ser primordial para la eclosión (Galton e Hiebert, 1987).

Esta información aunque aun es escasa, ha permitido proponer a las vías desyodativas como una de las "señales neuroendocrinas" marcadoras de maduración y funcionalidad en los diferentes organos fetales (Borges y col, 1980).

Por todo lo anterior, este trabajo se diseñó con el propósito de caracterizar la instalación y ontogenia de las vías desyodativas hepática y neural durante la embriogénesis del pollo. Así, y para ubicar esta tesis en su contexto fisiológico mas amplio, se revisan en una primera sección información referente a la fisiología de la glándula tiroides, así como su participación durante la embriogénesis tanto en animales precociales como altriciales. La segunda sección corresponde al planteamiento del problema experimental y a la descripción del material y métodos. Finalmente, la tercera sección contiene los resultados, la discusión y las conclusiones del trabajo.

## II. ANTECEDENTES

### A. LA GLANDULA TIROIDES Y LAS HORMONAS TIROIDEAS

#### 1. Aspectos Filogenéticos

La evolución de la glándula tiroides se remonta a épocas lejanas en la historia de los cordados. En el piso de la faringe de los cordados no vertebrados, como en *Amphioxus* (Cephalochordata) y en los tunicados (Urochordata), existe una estructura glandular y ciliada que captura y dirige las partículas alimenticias extraídas de la corriente del agua a la región del intestino. En esta estructura denominada endostilo se producen compuestos yodados que son llevados al tubo digestivo junto con las sustancias alimenticias (Romer, 1973). Las larvas amnocetas de las lampreas (Cyclostomata) tienen una alimentación similar y también poseen un endostilo muy semejante al de *Amphioxus* y tunicados. En este caso, el surco ventral termina hacia atrás en una bolsa profunda en el piso de la faringe, donde se produce una sustancia yodada que también desciende por el tubo digestivo (Romer, 1973; Gordon, 1982). En el momento de la metamorfosis, la bolsa endostílica de la larva se separa del

intestino y se divide en una serie de folículos de naturaleza indiscutiblemente tiroidea (Gordon, 1982; Hardy, 1984).

## 2. Consideraciones Anatómicas

El tejido tiroideo se encuentra presente en todos los vertebrados. Proviene del piso de la faringe del embrión y en la mayor parte de los vertebrados es una estructura única si bien a menudo bilobulada (Romer, 1973; Gordon, 1982). En el caso particular de las aves, la glándula tiroidea es un órgano par que se localiza en la línea media en la cara anterior del cuello. En el embrión de pollo el primordio tiroideo se divide en dos lóbulos separados a partir del 50. día de incubación (Astier, 1980).

La unidad funcional de la glándula tiroidea está constituida por pequeñas estructuras saculares denominadas acini o folículos tiroideos. Las células foliculares son similares a otras células secretoras en que poseen un retículo endoplásmico y un aparato de Golgi bien desarrollados; sin embargo, no contienen granulos secretorios. Cada folículo esférico está rodeado por una sola capa de células laminares a cuboidales y está lleno de un material proteico llamado coloide. Las células foliculares contienen un gran cantidad de microvellosidades en su superficie apical que penetran al líquido coloidal (Klinck, 1964; Ganong, 1980; Gordon, 1982; Hardy, 1984).

Los folículos tienen un tamaño muy variable según su estado funcional y la cantidad de coloide que contienen. El coloide

esta constituido principalmente por un heterodimero proteínico complejo llamado tiroglobulina (TGB), que despues de ser sintetizado por la célula folicular es secretada extracelularmente dentro del lumen o luz del folículo (Malkinson, 1975). El coloide esta constituido entre un 75 a 90% por TGB, y el 10 o 25% restante por otras proteínas (Gonzalez y col, 1984). Cuando la glándula esta inactiva, el coloide es abundante, los folículos son grandes y las células que lo tapizan son planas. En cambio cuando esta activa, los folículos son pequeños, las células cuboidales o columnares y el borde del coloide esta festoneado formando muchas pequeñas lagunas de resorción (Ganong, 1980; Gordon, 1982). Estos cambios se relacionan con la capacidad trifuncional unica de las células foliculares: a) como células exocrinas que secretan productos hacia la luz del folículo; b) cómo células absorbentes, ya que por pinocitosis estas secreciones reingresan a la célula y c) como una verdadera célula endócrina, que libera hormonas directamente a la circulación sanguínea (Hardy, 1984; Valverde-R y col, 1989).

En el embrión de pollo los folículos son pequeños y redondos (alrededor de 10 a 15 u de diámetro) y durante la primera semana postnatal alcanzan un diámetro de 40 - 50 u. En el adulto es comun observar una estructura heterogénea con folículos pequeños y grandes rodeados por una lamina folicular basal (Astier, 1980).

La actividad de la glándula tiroides en el embrión de pollo comienza en estadios muy tempranos de embriogénesis y se resumen en el cuadro 1.

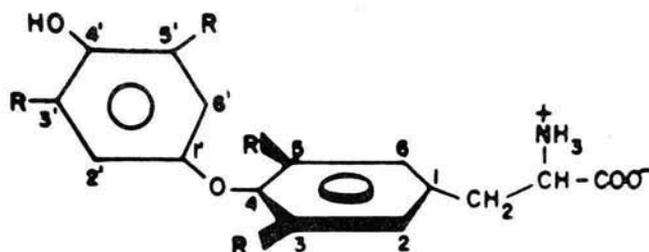
CUADRO 1. ONTOGENIA DE LA FUNCION TIROIDEA EN EL EMBRION DE POLLO

D I A	P A R A M E T R O	REFERENCIA
2.0	Primordio tiroideo	Romanoff, 1960
4.5	Tiroxina intratiroidea	Thommes, 1987
5.0	Captación de yodo e incremento progresivo a partir del día 7 al 20	Trunell y Brayer, 1953; Daugeras y col, 1976
5.0	Glándula tiroides bien diferenciada, con sus dos lóbulos divididos	Astier, 1960
6.5	Tiroxina circulante	Thommes e Hylka, 1978
7.0	Producción de coloide (formación del folículo tiroideo)	Hilfer, 1964

La ultraestructura de las células foliculares que han sido investigadas en pocas especies de aves domésticas, muestra que todos los diferentes organelos y estructuras involucradas en la formación y almacenaje de TGB, así como en la producción de HT, son muy similares a lo descrito en mamíferos (Astier, 1960; Gordon, 1982).

### 3. Biosíntesis y Secreción de las Hormonas Tiroideas

La función principal de la glándula tiroides es la producción y secreción de HT (derivados yodados de tirosina). Estas hormonas llamadas genericamente tironinas, constituyen una familia cuyos miembros más importantes son: las tiroxina o  $T_4$ , la triyodotironina o  $T_3$  y la triyodotironina reversa o  $rT_3$  (figura 1).



TIRONINA	$R_3$	$R_5$	$R_{3'}$	$R_{5'}$
$T_4$	I	I	I	I
$T_3$	I	I	I	H
$T_3 \gamma$	I	H	I	I
$T_2$	I	H	I	H
$T_2 \gamma$	H	H	I	I
$T_1$	H	H	I	H
$T_0$	H	H	H	H

Figura 1. Configuración y nomenclatura de la molécula de tironina en relación al número y posición de los átomos de yodo que contiene.

Las dos primeras son biológicamente activas y ejercen sus acciones en prácticamente todas las células del organismo, a diferencia de la  $rT_3$  a la cual, hasta la fecha, no se le ha reconocido actividad biológica (Lehmann, 1982; Gomez y col, 1982; Sterling y Lazarus, 1977).

A continuación se describen los pasos secuenciales involucrados en la síntesis intratiroidea de las HT.

a) Tiroglobulina. La  $T_4$  y la  $T_3$  son sintetizadas en el coloide por yodación y condensación de los residuos de tirosilo que forman parte de la molécula de TGB. Esta glucoproteína globular tiene 4 cadenas peptídicas, contiene un 20% de carbohidratos y un peso molecular aproximado de 650,000 a 700 000 D. Cada molécula de TGB contiene 115 residuos de tirosilo que están particularmente en disposición a ser yodados. (Ganong, 1980; De Groot y Taurog, 1979; Grodsky, 1984).

En el caso de las especies altriciales la síntesis de TGB se inicia en el periodo perinatal, mientras que en las especies precociales, como el pollo, se encuentra coloide, TGB y HT desde el día 7 de embriogénesis (Dauger y col, 1976).

b) Metabolismo de Yodo. El yoduro inorgánico (forma iónica:  $I^-$ ) de la dieta es captado por las células foliculares (Grotsky, 1984). En todos los vertebrados, las células foliculares han desarrollado un mecanismo muy eficiente y específico denominado genericamente bomba de yodo (Valverde-R y col, 1989). El yodo es el elemento esencial de las hormonas tiroides y su metabolismo se encuentra íntimamente relacionado con los mecanismo de síntesis de dichas hormonas (Gomez y col, 1982; Phillips y col, 1988).

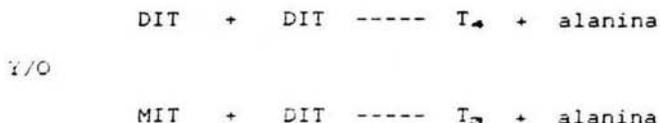
A partir del día 7 de incubación, en el embrión de pollo ocurre un incremento progresivo en la cantidad de yodo capturado por la glándula tiroides. El valor máximo de captación durante la embriogénesis, se observa en el día 20 (Daugeras y col, 1976).

El yoduro atraviesa la membrana basal de las células foliculares, contra gradientes de concentración y eléctricos. El factor mas importante que regula el transporte de yoduro es la hormona estimulante de la tiroides o tiotropina (TSH), ya que después de una hipofisectomia, la captación de este elemento por la tiroides disminuye notablemente. El mecanismo de captación es por medio de transporte activo y se le denomina "bomba de yodo". Este mecanismo esta asociado al sistema de ATPasa dependiente de Na - K (Hardy, 1984; Sterling y Lazarus, 1977). Una vez captado, el yodo es oxidado y transferido a los abundantes residuos tiroilo de la TGB mediante una peroxidasa, enzima que se encuentra en la superficie apical de la célula folicular. Los

fármacos como el propiltiouracilo (PTU) pueden inhibir la peroxidasa. Esta enzima es un tetrámero con un peso molecular de 60,000 d y requiere peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) como agente oxidante. El  $H_2O_2$  es producido por una enzima dependiente del NADPH (De Groot, 1979; Gomez y col, 1982; Grodsky, 1984; Hardy, 1984).

La TGB en el embrión de pollo tiene un coeficiente de sedimentación que va desde 19.4 a 21 s. Este valor es más elevado que el de la TGB de mamíferos (19.2 s) (Daugeras y col, 1976).

c) Síntesis de las Hormonas Tiroideas y Secreción. La yodación de los residuos tirosilo de la TGB, que ocurre primero en la posición 3 del núcleo aromático, produce monoyodotirosina (MIT). Una yodación posterior en la posición 5 da lugar a la diyodotirosina (DIT). Ambas moléculas carecen de actividad biológica (Hardy, 1984; Grodsky, 1984; Gomez y col, 1982). Como se esquematiza a continuación, esta organificación inicial del yodo para formar MIT y DIT, es seguida por el acoplamiento de dos de estas moléculas, que por un enlace éster forma las yodotironinas hormonalmente activas:



La TGB yodada o "madura", es la forma almacenada de hormona tiroidea. Los residuos de  $T_4$  y de  $T_3$ , todavía unidos a la TGB, se almacenan en la luz como parte del coloide (figura 2). Desde el punto de vista morfofuncional, la tiroides es la única glándula endócrina conocida que almacena su producto de secreción en el espacio extracelular (Hardy, 1984; Grodsky, 1984, Gomez y col., 1982; Valverde-R y col, 1989).

La primera etapa en la secreción de HT es la pinocitosis del coloide y su inclusión en vacuolas fagocíticas. La pinocitosis se lleva a cabo en las microvellosidades que surgen de la membrana apical de las células foliculares y la TSH estimula este proceso (De Groot, 1979; Ganong, 1980; Hardy, 1984).

Después de la pinocitosis, la TGB aparece en el citoplasma apical como "gotitas de coloide". Estas vacuolas fagocíticas de coloide se fusionan con vesículas lisosomales para formar fagolisosomas, dentro de los cuales ocurre la degradación proteolítica de la TGB. Este proceso libera aminoácidos, MIT y DIT (que posteriormente se desyodan por la acción de una desyodasa microsomal específica NADH-dependiente y parte de este yodo es reutilizado por la glándula), así como  $T_4$  y  $T_3$ . Estas últimas son secretadas posteriormente a la circulación (De Groot y Taurog, 1979; Hardy, 1984; Grodsky, 1984; Valverde-R y col, 1989).

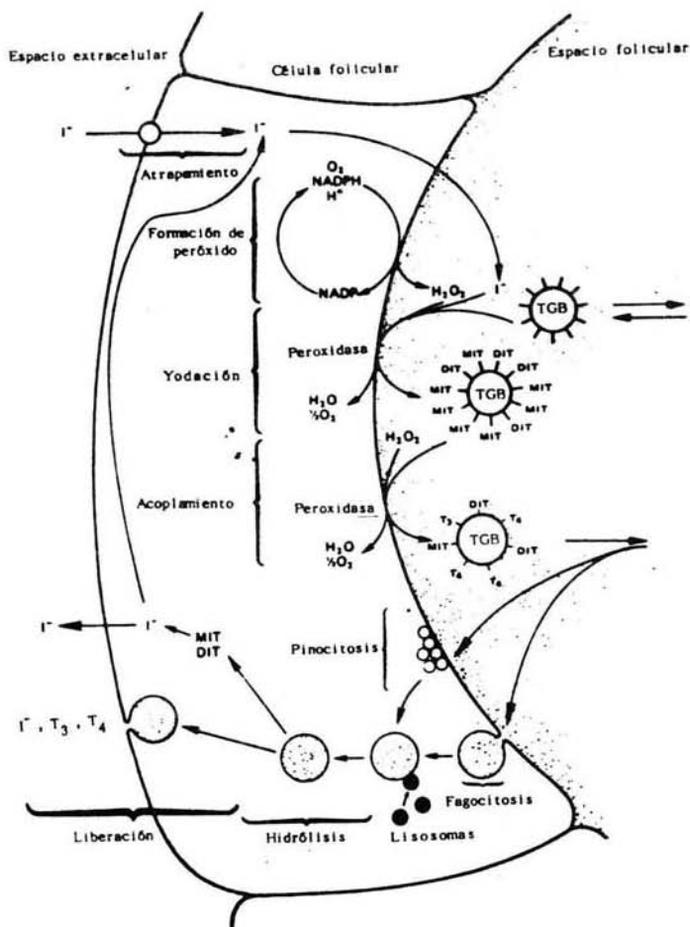


Figura 2. Modelo de la biosíntesis y secreción de las hormonas tiroideas en un folículo. Se esquematiza una célula folicular flanqueada por el lumen folicular (área punteada) y el espacio extracelular.

En el cuadro 2 se resumen los factores que regulan los procesos de síntesis y liberación de las HT.

CUADRO 2. FACTORES QUE INFLUYEN EN LA FUNCION TIROIDEA

	ESTIMULADO	INHIBIDO
Captación de Yoduro	TSH Deficiencia de yodo	hipofisectomía perclorato tiocianato exceso de yoduro
Oxidación del yoduro	TSH	Hipofisectomía Tiocianato
Síntesis de TGB	TSH	Hipofisectomía Inhibidores de la síntesis de proteínas
Yodación y Acoplamiento	TSH	Tiouracilo Carbimazol
Pinocitosis	TSH	Hipofisectomía
Proteólisis	TSH	Hipofisectomía
Secreción	TSH	Hipofisectomía

#### 4. Control y Regulación de la Glándula Tiroides

En todos los vertebrados se reconoce que el control y regulación de la función tiroidea es ejercido por una compleja cascada de señales neuroendócrinas específicas, que desde el punto de vista funcional constituyen el eje

hipotálamo-hipófisis-tiroides (HHT) (Strand, 1982; Acher, 1986; Valverde-R y col, 1989). También se sabe que dependiendo de las características especie-específicas de maduración y desarrollo, el inicio de su funcionamiento ocurre durante el periodo embrionario (especies precociales); o bien, durante el periodo postnatal inmediato (especies altriciales). El eje HHT es un sistema de control dinámico negativo (figura 3), en el cual un incremento del nivel circulante de  $T_3$  y  $T_4$  frena la secreción hipofisiaria de la hormona estimulante de la tiroides o TSH producida a su vez, por el estímulo hipotálmico de la hormona liberadora de tirotrópina (TRH) (Gonzalez y col, 1984).

La TSH es una glicoproteína que contiene 211 aminoácidos, así como carbohidratos (hexosas, hexosaminas y ácido siálico). Se compone de dos subunidades, alfa y beta, siendo la beta la que le confiere especificidad funcional (Franklyn y Sheppard, 1988). Como se muestra en el cuadro 2, esta hormona es capaz de estimular varias fases del metabolismo tiroideo por mediación del 3,5-AMP cíclico. La TSH actúa combinándose con un receptor específico en la membrana de las células foliculares, estimulando la producción y secreción de tironinas (González y col, 1984).

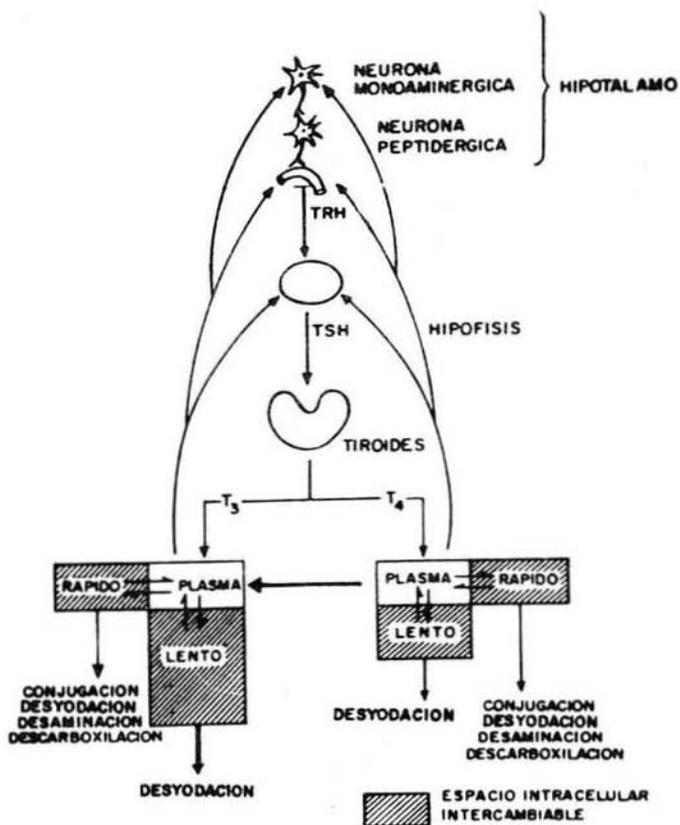


Figura 3. Eje hipotalamo-hipofisis-tiroides. Se indican los efectos estimulantes (flechas hacia abajo), así como los inhibitorios (flechas hacia arriba).

La TRH o tiroliberina, es un tripeptido (piroglutamil - histidil - prolinamida), producido por neuronas del hipotálamo. Se forma a partir de un precursor macromolecular que contiene en su estructura 6 moléculas de TRH (Hardy, 1984). Una vez sintetizada y liberada al sistema porta-hipofisiario, la TRH estimula a las células tirótrofas (localizadas en la hipófisis anterior o adenohipófisis) induciendo tanto la síntesis como la secreción de TSH (Hardy, 1984; González y col, 1984;).

#### Autoregulación de la Función Tiroidea

Aunque la TSH es el principal regulador de la función tiroidea, la glándula posee también capacidad de autorregulación. Esta regulación esta mediada principalmente por la concentración de yodo en la dieta. En la rata el aumento en la ingesta de yodo se acompaña de disminución en la captación del mismo por la tiroides (Gómez y col, 1982). Sin embargo si el yodo se administra en dosis farmacológicas se presenta una inhibición en la síntesis y liberación de hormonas tiroideas (Valverde-R y col, 1988).

#### **5. Tironinas Circulantes**

Como las hormonas tiroideas son moléculas hidrofóbicas, tienen que ser transportadas en el torrente sanguíneo "unidas" a una o más proteínas del suero que hacen las veces de acarreadores. En la mayoría de los vertebrados se han identificado cuando menos dos de las siguientes tres proteínas transportadoras de tironinas: la globulina transportadora de hormonas tiroideas

(TBG), la prealbumina (TBPA) y la albumina (TBA). Estas proteínas enlazan de manera reversible a las hormonas tiroideas y sólo una pequeña fracción (0.03%) de ellas circula en forma libre. Se reconoce además, que la afinidad a estas proteínas no es igual para todas las tiroxinas. Efectivamente, la  $T_4$  presenta una mayor afinidad por la TBG, mientras que la TBPA es mucho más afín a la  $T_3$ . Aunado a lo anterior, el coeficiente de disociación de estos acarreadores es mayor en la TBPA, seguido por la TBA y por último la TBG. Este hecho puede explicar en parte la vida media circulante de las tiroxinas en mamíferos ( $T_3$ ; 24 horas,  $T_4$ ; una semana) (Klinck, 1964; Sterling y Lazarus, 1977; Lehmann, 1982; Valverde y col, 1989).

En algunos mamíferos; vgr., la rata, así como en el resto de vertebrados, las HT son transportadas en la sangre por proteínas diferentes a la TBG. En el caso de los mamíferos la TBPA y la TBA suplen a la TBG. Sin embargo en los reptiles y los peces existen proteínas acarreadoras que por su movilidad electroforética parecen corresponder a un intermedio entre las alfa-1 y alfa-2 globulinas (Tata y Shellabarger, 1959).

La TBG no está presente en la sangre de aves y la  $T_4$  es transportada en un 80% por la TBA, el resto por la TBPA y las alfa y beta-lipoproteínas; estas dos últimas demostradas por Astier y Newcomer (1978) en el suero de patos y mediante inmuno-electroforesis bidimensional utilizando hormonas tiroideas marcadas. La  $T_3$  sólo está asociada a la fracción de albúmina con

la misma afinidad para T<sub>4</sub>. La menor afinidad de estas proteínas por las tironinas parece explicar que en las aves, las hormonas tiroideas tengan una vida media circulante más corta que la observada en mamíferos (22.5 ± 1.0 horas) (Astier, 1978; Astier, 1980; Tata y Shellabarger, 1959; King y col, 1977)

Las hormonas unidas a proteínas son metabólicamente inactivas y constituyen una fuente más, en este caso extratiroidea, de almacenamiento hormonal (Valverde-R y col, 1989a).

## 6. MECANISMOS DE ACCION

Los mecanismos moleculares a través de los cuales las HT ejercen sus efectos han sido investigados con dos diferentes enfoques: a) identificación directa de sitios de unión en órganos blanco y b) actividad celular inferida a partir de la localización de estos sitios (Di Liegro y col, 1987).

Por su tamaño e hidrofobicidad se creía que las hormonas tiroideas penetraban a la célula blanco por difusión a través de la bicapa lipídica de la membrana plasmática (Oppenheimer, 1979; Di Liegro y col, 1987). Posteriormente, se sugirió que estas hormonas penetraban a la célula por interacción con una proteína unidora específica y dependiente de energía, localizada en la membrana plasmática (Di Liegro y col, 1987). Actualmente se acepta que las HT entran a la célula por endocitosis mediada por un receptor (Oppenheimer y col, 1987). Estos sitios de unión de la membrana plasmática están involucrados no solamente en la

internalización de la hormona, también parecen participar como mediadores de algunos efectos hormonales, tales como el incremento en la captación de aminoácidos, nucleósidos y glucosa (Samuels y col, 1988).

Se han identificado otros receptores específicos a HT en diferentes compartimentos intracelulares y su función aun no se ha dilucidado completamente (Bellabarba y col, 1988). La mitocondria es considerada como uno de sus blancos primarios y los receptores se encuentran en la membrana interna de este organelo. El principal efecto metabólico mitocondrial de la  $T_3$  es probablemente la estimulación nuclear para la codificación de mRNAs que sintetizan componentes respiratorios. La tasa de síntesis de mRNA para la citocromo c en hígado de ratas tiroidectomizadas aumenta con la administración de  $T_3$  (Gaglia y col, 1981; Di Liegro y col, 1987; Oppenheimer y col, 1987).

El citosol es otro sitio de unión a hormonas tiroideas. Estos sitios aparentemente tienen diferentes afinidades y capacidades (número de sitios de unión) para  $T_3$ , dependiendo del tipo celular. En neuronas en cultivo existen dos clases de sitios: el primero es neuronal y tiene una alta afinidad y baja capacidad, el segundo, en células gliales, tiene una baja afinidad y alta capacidad. Se ha propuesto que estos receptores citosólicos pueden jugar una papel regulador en el almacenamiento y aporte de HT a otros compartimentos celulares (Di Liegro y col, 1987).

Numerosas evidencias experimentales muestran que las hormonas tiroideas predominantemente actúan en los receptores nucleares de alta afinidad y baja capacidad (Oppenheimer, 1985). Esto se ha demostrado en muchos tejidos, y se ha reportado que tienen mayor afinidad para  $T_3$  que para  $T_4$ . En el hígado de rata, aproximadamente el 85% de las hormonas tiroideas unidas corresponde a  $T_3$  y menos del 15% a  $T_4$  (Oppenheimer y col, 1972).

Debido a que dichas proteínas receptoras nucleares presentan una gran similitud con el virus de la eritroblastosis aviaria (c erb-A), se ha logrado obtener anticuerpos específicos que han permitido conocer con mayor detalle la naturaleza y funcionamiento de dichos receptores. Estas proteínas nucleares son ácidas y de naturaleza no histónica, su peso molecular es de 50,500 con una constante de sedimentación de 3.5 s (Oppenheimer y col, 1987). La consecuencia de la unión tironina-receptor es el aumento en la síntesis de mRNA, actividad en la RNA polimerasa, síntesis de proteínas (Tata y Widnell, 1966; Kitagawa y col, 1987).

Los receptores hormonales a nivel del núcleo celular regulan la expresión de genes específicos y parecen ser miembros de una misma familia de proteínas. En efecto, los receptores a esteroides y a hormonas tiroideas exhiben gran similitud y por ello se sugiere que estos son codificados por un gen ancestral común (Oppenheimer y col, 1987; Parker, 1988; Samuels y col, 1988).

Existen pocos estudios acerca de los receptores a HT durante la embriogénesis en aves (Galton y Schaafsma, 1983; Weirich y McNabb, 1984). El receptor de  $T_3$  en el núcleo del cerebro, hígado y pulmón en embriones de pollo exhibe propiedades similares a las del resto de embriones de otras especies: 1) su constante de asociación ( $K_a$ ) varía entre 1 y  $3 \times 10^{-1}$ ; 2) la capacidad máxima de unión entre 0.8 y 3.1 fmoles de  $T_3$ /mg DNA; 3) es una proteína no histona, con peso molecular de 60,000 y con un coeficiente de sedimentación de 3.8 s. Estos sitios de unión están presentes después del día 7 de embriogénesis (Bellabarba y Lehoux, 1981; Bellabarba y col, 1983).

Los estudios sobre la especificidad del receptor muestran que para el ácido 3,5,3'-triyodotiroacético (Triac), tiene una afinidad 3 a 4 veces más alta que para la  $T_3$  (Bellabarba y col, 1983). Este compuesto tiene una potencia biológica baja en mamíferos, pero es equipotente a la  $T_4$  en el músculo cardíaco del pollo (Newcomer y Barret, 1960). Estas observaciones sugieren que este análogo pudiera tener un papel fisiológico en las aves aunque no hay datos precisos sobre su producción y niveles circulantes (Bellabarba y col, 1988).

Durante la ontogénesis postnatal, al menos en la rata, el receptor neuronal para  $T_3$  aumenta entre los 10 y 20 días después del nacimiento. Este aumento parece ser específico para el SNC ya que durante el mismo periodo no se observan cambios en otros tejidos (De Naver y Dodin, 1985).

Durante la última década se ha demostrado que la  $T_3$  es la principal tironina responsable del efecto metabólico característico de las HT. Esta noción se basa en las siguientes observaciones (Oppenheimer y col, 1972; Oppeneheimer, 1979; Oppeneheimer y col, 1987).

- La  $T_3$  tiene, en la mayoría de los mamíferos un efecto metabólico de 2 a 10 veces más potente que la  $T_4$ .
- Una gran porción de  $T_4$  es transformada a  $T_3$  en diversos tejidos periféricos por desyodasas específicas.
- La relación  $T_3/T_4$ , que es baja en suero y fluidos extracelulares, es alta en varias fracciones de las células blanco, encontrándose la relación más elevada en el núcleo.
- Los receptores nucleares para hormonas tiroideas presentes en los tejidos blancos tienen mucha mayor afinidad por  $T_3$  que para  $T_4$ .

## 7. Metabolismo y Biotransformación Periférica

Las vías metabólicas de las yodotironinas in vivo incluyen: a) desyodación, b) conjugación c) desaminación y descarboxilación y d) degradación oxidativa.

**Desyodación.** En los últimos años se ha reconocido que a nivel de los diferentes órganos sobre los cuales actúan las HT, opera un mecanismo que parece regular la magnitud de su efecto biológico (Chopra, 1977; Kaplan, 1984). Efectivamente, se conoce que la glándula tiroides secreta al torrente sanguíneo la totalidad de la  $T_4$  circulante, y solamente una pequeña proporción de las otras tironinas presentes en la sangre: 20% de la  $T_3$  y

menos del 1% de la  $rT_3$  y diiodotironina ( $T_2$ ). Estudios experimentales recientes han mostrado que la formación del 80% de la  $T_3$  circulante; o bien, de la totalidad de la  $rT_3$ , ocurre a nivel extratiroideo (Borges y col, 1980; Decuypere y col. 1982; Kaplan, 1984; Leonard y Visser, 1986; Rudas y Pethes, 1986; Edmonds, 1987). Este mecanismo singular de biotransformación de las HT parece ser organo-específico, y en su control recientemente se ha demostrado la participación de algunas hormonas como catecolaminas, insulina y hormona de crecimiento, así como glucosa y/o algunos metabolitos de la respiración celular (Kuhn y col, 1983; Allen, 1986; Leonard y Visser, 1986; Edmonds, 1987; Kuhn y col, 1987; Kuhn y col, 1988).

El análisis de los mecanismos específicos involucrados en esta biotransformación, ha demostrado la operación de dos vías desyodativas independientes. Así, como se ilustra en la figura 4, la primera vía remueve el yodo del anillo fenólico o externo de la molécula de tironina y se le conoce genericamente como **desyodación 5'** (5'-D). Por esta vía, la  $T_4$  es convertida a  $T_3$  y la  $rT_3$  a 3,3'- $T_2$ . La otra vía, denominada **desyodación 5** (5-D), involucra la monodesyodación del anillo tirosilo o interno de la tironina. En esta vía la  $T_4$  es transformada a  $rT_3$  y la  $T_3$  a 3,3'- $T_2$  (Kaplan, 1984; Leonard y Visser, 1986).

Por las implicaciones fisiológicas que ambas monodesyodaciones parecen tener, se ha considerado a la 5'-D como la **vía de activación** tiroidea, ya que da lugar a la formación de la hormona metabólicamente más activa, la  $T_3$ . En contraste, la 5-D se considera la **vía de desactivación** metabólica, ya que por un lado la  $T_4$  es transformada a la triyodotironina sin actividad biológica, la  $rT_3$ , y por el otro, degrada a la  $T_3$  a 3, 3'- $T_2$ , tironina que tampoco presenta actividad metabólica (Kaplan, 1984; Leonard y Visser, 1986; Edmonds, 1987).

Aunque la caracterización de estas vías aun es incompleta, diversos estudios bioquímicos han mostrado la participación de cuando menos tres enzimas diferentes y específicas denominadas: tipo I, II y III (cuadro 3). Esta distinción se ha realizado hasta el momento en base a los siguientes tres criterios: (a) la selectividad del anillo que las enzimas desyodan; (b) la preferencia o afinidad por el sustrato; (c) la susceptibilidad a la inhibición por agentes bloqueadores de grupos tioles como el 6-propil-2-tiouracilo o PTU. A continuación se resumen las características mas importantes de los tres tipos enzimáticos (Kaplan, 1984; Leonard y Visser, 1986).

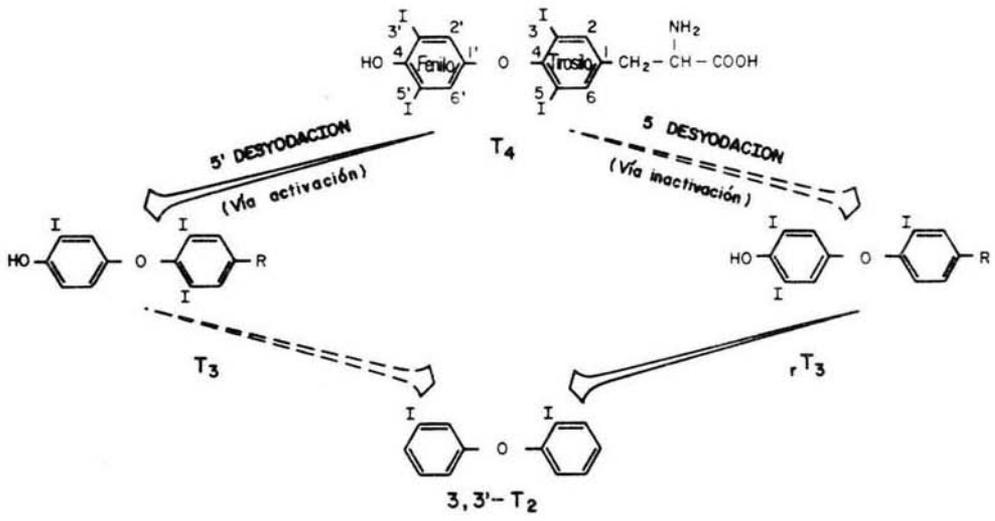


Figura 4. Monodesyodación de Hormonas Tiroideas. Se esquematiza la desyodación secuencial de T<sub>4</sub>, mostrando su conversión a T<sub>3</sub> y de la rT<sub>3</sub> a 3,3'-T<sub>2</sub> por la desyodación del anillo externo. Así como la desyodación de la T<sub>4</sub> a T<sub>3</sub> y de ésta última a 3,3'-T<sub>2</sub> por la desyodación del anillo interno.

Desyodasa Tipo I. En condiciones normales, esta enzima desyoda tanto el anillo fenólico como el tiroso, presenta una mayor afinidad por la rT<sub>3</sub> (30 veces mayor que para la T<sub>4</sub>), y es inhibida por PTU. La concentración de esta desyodasa es 40 veces mayor en

el hígado y el riñón, y su constante de afinidad/actividad ( $K_m$ ) es significativamente mayor que la de las otras dos enzimas. La actividad de la enzima es dependiente de una elevada concentración de tioles, y no parece ser inhibida por la concentración de los sustratos. Aunque se desconocen los factores que regulan la selectividad por uno u otro anillo de la tironina, se ha observado que la enzima desyoda preferentemente el anillo externo o fenólico a pH básico.

Desyodasa Tipo II. Esta enzima se considera una verdadera desyodasa 5'-D ya que actúa exclusivamente sobre el anillo externo, su sustrato preferente es la  $T_4$  (500 veces mayor que la  $rT_3$ ) y no es inhibida por PTU. Se ha detectado en prácticamente todos los tejidos, y en el caso específico de los mamíferos su concentración en el sistema nervioso es significativamente elevada. Esta enzima requiere para su actividad una moderada concentración de tioles y es inhibida por concentraciones elevadas de  $T_4$ ,  $T_3$  y en menor grado por  $rT_3$ .

Desyodasa Tipo III. Esta enzima representa a la verdadera desyodasa 5-D ya que desyoda exclusivamente el anillo interno de la molécula. Su sustrato preferencial es la  $T_3$  (10 veces mayor que la  $T_4$ ) y no es inhibida por PTU. Además presenta una regulación diferente a las otras dos enzimas, ya que se inhibe a pHs ligeramente básicos, o con concentraciones elevadas de tioles. Se encuentra principalmente en la piel y la placenta, aunque se ha detectado también en algunas zonas del cerebelo y la

vía visual.

A nivel organo-específico, el predominio de una u otra enzima parece estar asociado a la velocidad de captura y recambio hormonal bidireccional que ocurre entre el compartimiento vascular y los diferentes tejidos. Estos estudios indican que en condiciones normales, en los órganos de mayor recambio hormonal (hígado y riñón) predomina la desyodasa tipo I, mientras que en el caso de órganos de recambio hormonal lento (músculo, cerebro, piel y placenta) predominan las desyodasa específicas: tipo II para los dos primeros y tipo III para los dos últimos (Kaplan, 1984; Leonard y Visser, 1986). Por otro lado, se empieza a reconocer que durante algunas situaciones fisiológicas: vgr., vida fetal, periodo neonatal, lactación, termoregulación; o bien, anormales como el ayuno, y las enfermedades crónicas, la actividad enzimática de estas vías se modifica de manera compartimentalizada u organo-específica (Fisher y col. 1977; Edmonds, 1987; Anguiano, 1989; Aceves y Valverde-R, 1989; Valverde-R y Aceves, 1989).

CUADRO 3. PRINCIPALES CARACTERISTICAS DE LAS DESYODASAS

	TIPO I	TIPO II	TIPO III
Sitio de Desyodación	Ambos anillos	Fenólico	Tirosilo
Sust. preferencial	$rT_3 \rightarrow T_4 \rightarrow T_3$	$T_4 \rightarrow T_3$	$T_3 \rightarrow T_4$
Principales Tejidos	Higado, riñon, tiroides.	SNC, BAT, Musc, Hipof.	placenta piel, SNC
Efectos de:			
PTU	Inhibición	ninguno	ninguno
Tioles	estimulación	estimulación	estimulación
Iodoacetato	inhibición	inhibición	inhibición
Ac. Iopanóico	inhibición	inhibición	inhibición
Probable Función	Proveer $T_3$ comp. vascular	autoconsumo tisular de $T_3$	desactivación

SNC: sistema nervioso central; BAT: Tejido graso café;  
Musc: músculo; Hipof: hipófisis. Modificado de: Kaplan, 1984; Leonard y Visser, 1986.

**Conjugación.** La conjugación ocurre en el grupo hidroxilo del anillo fenólico o externo de las tironinas y consiste en incorporar a este un glucuronato o un sulfato (figura 5). El hígado y el riñón son los órganos más importantes en este proceso (DiStephano, 1988). Las yodotironinas conjugadas aunque no son activas, pueden ser a su vez desyodadas (Burger, 1986). Recientemente se ha demostrado que las tironinas sulfoconjugadas presentan una vida media circulante menor que las glucuroninadas (3 Vs 12 horas, respectivamente); y que estas últimas presentan una mayor afinidad por la desyodasa tipo III, incluso mayor que las tironinas activas. Aunque esta información aun es muy escasa parece sugerir que la conjugación representa una "etiqueta" para su eliminación y/o para su desyodación (Burger, 1986).

**Desaminación y Descarboxilación.** Este proceso transforma, irreversiblemente, a la  $T_4$ ,  $T_3$  y a otras tironinas, a análogos del ácido acético: ácido tetrayodoacético (tetraac) y ácido triyodoacético (triac). La transformación consiste en remover primero el grupo amino de la cadena lateral de las tironinas formando un alfa-cetoácido, que posteriormente es descarboxilado (figura 5). El hígado, cerebro y riñón son los principales órganos involucrados en dicha transformación. Estos análogos pueden ser posteriormente desyodados o conjugados (Burger, 1986; DiStephano, 1988).

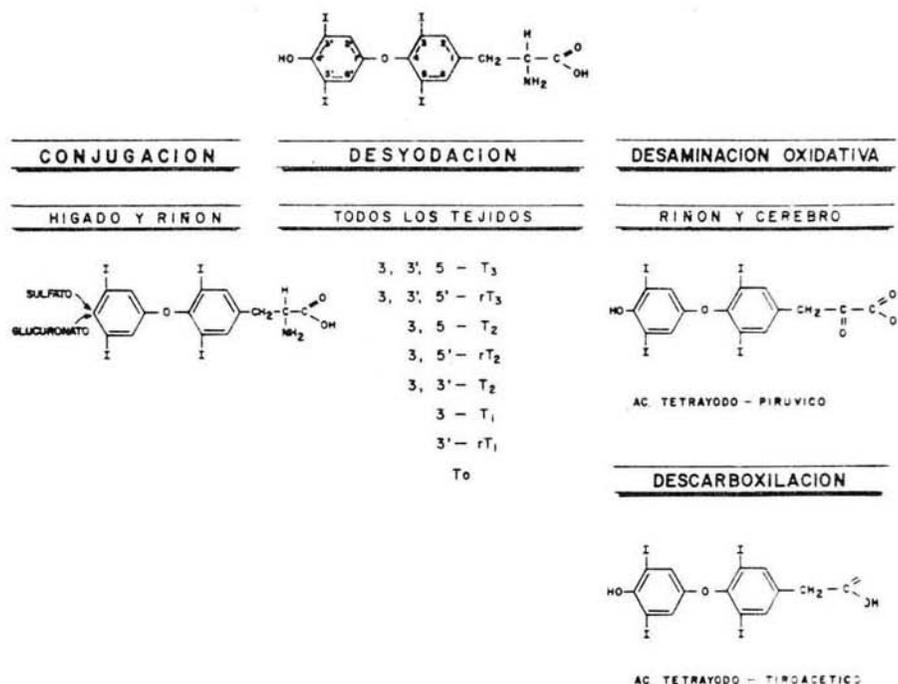


Figura 5. Principales vías metabólicas de las hormonas tiroideas.

**Degradación Oxidativa.** Esta vía metabólica es hasta la fecha la menos estudiada. Consiste en la ruptura del enlace éster de la molécula de las tirocinas con la formación consecuente de MIT y DIT modificadas. Estas tirocinas son rápidamente desyodadas y/o transformadas en moléculas que se unen covalentemente a proteínas circulantes (Burger, 1986). La degradación oxidativa ocurre en los linfocitos T y aparentemente los productos resultantes están involucrados en la respuesta inmunológica celular (Burger, 1986; DiStefano, 1988).

## B. ESTRATEGIAS DE DESARROLLO EMBRIOGENICO

El desarrollo y maduración de los seres vivos es un proceso biológico particularmente complejo cuyos componentes básicos incluyen el crecimiento y la diferenciación celular. Hasta la fecha se desconocen la mayoría de los mecanismos y factores que regulan estos procesos. Sin embargo, se ha considerado que el desarrollo neuronal del individuo refleja, en gran medida, el grado de maduración del organismo (Anokhin, 1964; Fox, 1966). Sobre estas bases se ha propuesto el concepto "del periodo crítico", el cual se define como el lapso en el que ocurre la máxima neurogénesis y la mielinización (Davison y Dobbing, 1966; Dobbing, 1970 ). Esta noción ha permitido distinguir que en los vertebrados existe, con respecto al nacimiento, una marcada diferencia en el tiempo en que dicho periodo crítico tiene lugar (figura 6). Así, actualmente se reconocen dos modelos o "estrategias" de desarrollo y maduración, conocidas como estrategias altrices y precoces (Scott, 1962; Fox, 1966; Dobbing, 1971).

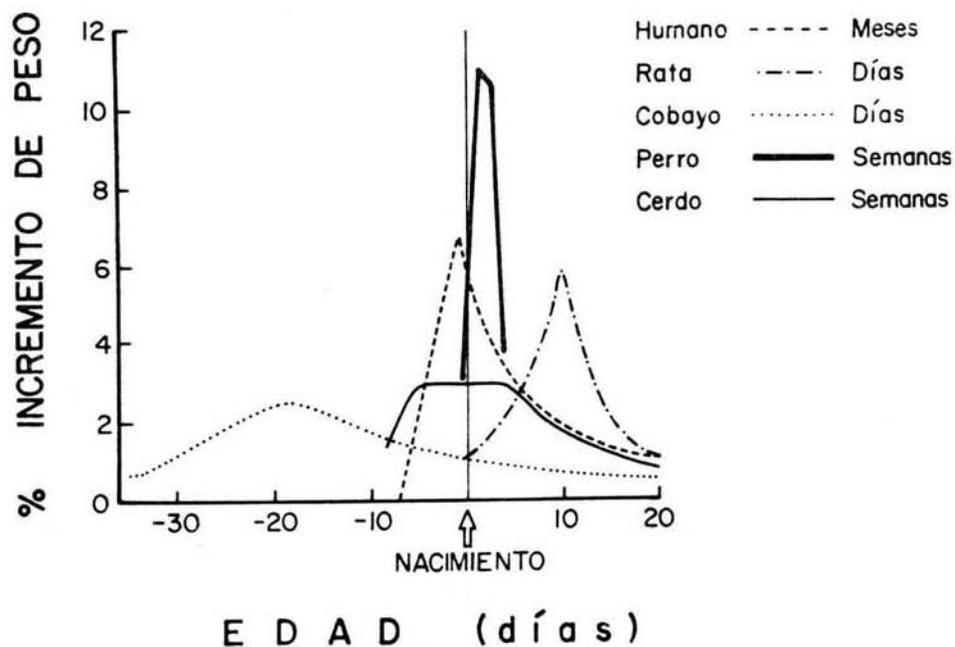


Figura 6. Curvas de crecimiento cerebral en diferentes especies. Se ilustra la tasa de máximo desarrollo (% peso) con respecto a la edad tomando como punto de referencia el nacimiento (tomado de Dobbing, 1970).

En marcado contraste con los individuos altriciales, los de las especies precociales se caracterizan porque nacen neurologicamente maduros. Pueden desplazarse y comer por sí mismos. Su visión, olfato y audición están completamente

desarrollados. Su metabolismo y mecanismos de termorregulación les permite prescindir del cuidado paterno. Todas estas características favorecen una socialización prácticamente inmediata (Scott, 1962; Fox, 1966; Vleck y Vleck, 1987). Como puede observarse en la figura 7, en las especies precoces (cobayo), el peso cerebral, así como el contenido total de DNA y colesterol (mielina) alcanzan su valores más altos antes del nacimiento; mientras que en las altriciales (rata) todo esto ocurre posnatalmente (Dobbing, 1970; 1971).

En aves, al igual que en los mamíferos existen ambas estrategias dependiendo de la especie. En las especies altrices la tasa de crecimiento incrementa continuamente durante todo el período de incubación alcanzando sus valores máximos posteclosión (figura 8). En contraste, en las especies precoces se ha observado un comportamiento bifásico. Inicialmente y hasta el último tercio de la embriogénesis (80%), ocurre un incremento acelerado y exponencial. Este proceso que se detiene en ocasiones radicalmente, se reanuda durante el periodo en el cual se instala la respiración pulmonar (pipping) que precede a la eclosión (Vleck y Vleck, 1987).

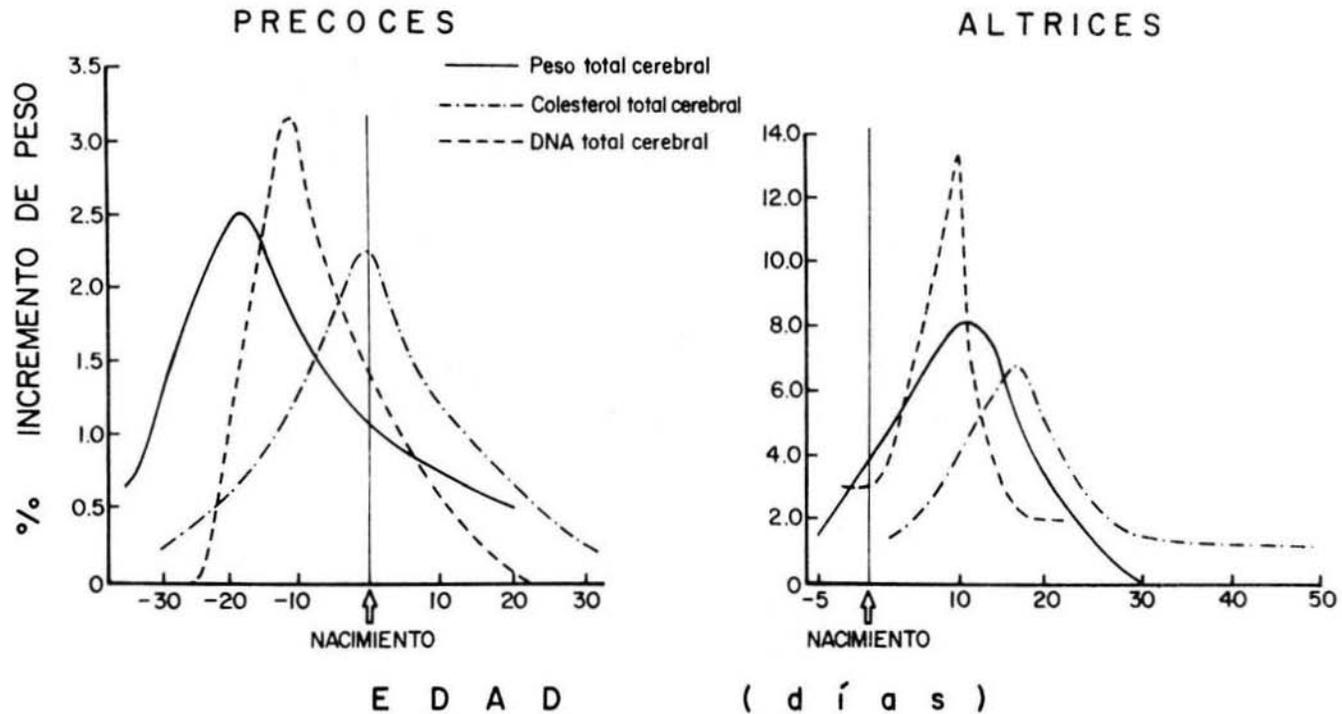


Figura 7. Comparación de la maduración cerebral entre especies precoces (cobayo) y altrices (rata). Las diferentes variables (peso, contenido de INA y colesterol total cerebrales) se ilustran con respecto a la tasa de máximo crecimiento (abscisas) y a la edad (ordenadas). Esta última tomando como punto de referencia al nacimiento (tomado de Dobbing, 1971).

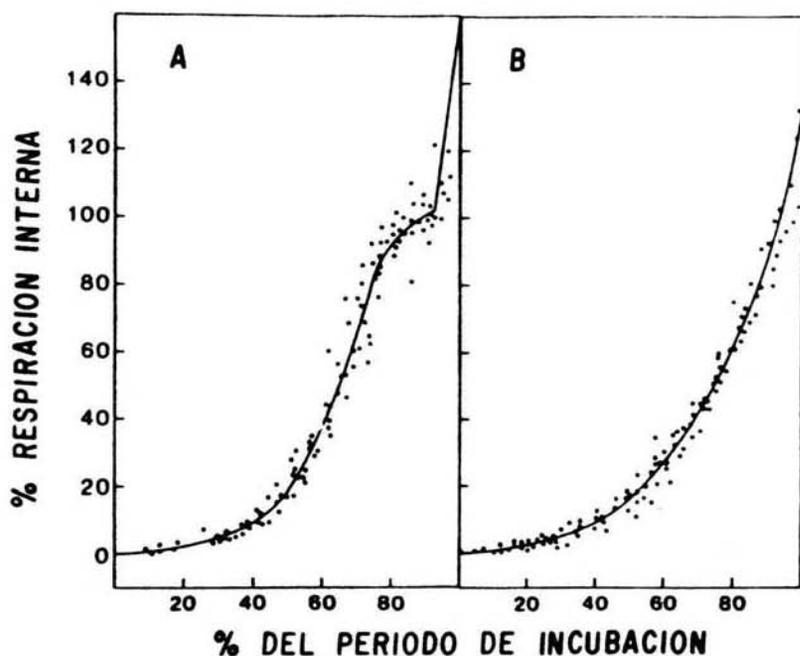


Figura 8. Gasto metabólico durante la embriogénesis de aves precoces (codorniz: A) y altrices (paloma: B). Los resultados están expresados como porcentaje del gasto metabólico previo al "pipping" (respiración pulmonar). El tiempo se expresa como el porcentaje del periodo total de incubación (Tomado de Vleck y Vleck, 1988).

### III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Independientemente de la estrategia embriogénica particular de cada especie, en todos los vertebrados se ha demostrado que las HT son uno de los factores endócrinos más importantes para la maduración global del organismo (Tata, 1980). Así y para el caso específico del sistema nervioso, se conoce que la neurogénesis, la sinaptogénesis y la mielinización dependen basicamente de que existan en el microambiente y el tiempo apropiados, concentraciones suficientes de tironinas bioactivas. En otras palabras, se sabe que existe una clara y estrecha asociación o interdependencia entre el periodo crítico y hormonas tiroideas. Es probable que la diferencia entre una y otra estrategia embriogénica dependa primordialmente del tiempo en el cual "maduran" los diferentes organos y sistemas del organismo (Hopkins y Thorburn, 1972; King y Delfiner, 1974; Tata, 1980; Thommes e Hylka, 1978; Decuypere y col, 1982; Galton e Hiebert, 1987; McNabb, 1987; Thommes, 1987; McNichols y McNabb, 1988; McNabb, 1988).

#### **Tironinas en Especies Precociales**

La mayor parte de los estudios en especies precociales han utilizado al pollo, la codorniz y el borrego. En el caso de las aves, se han detectado tironinas bioactivas circulantes desde el

segundo tercio del periodo incubación (Davison, 1976; Thommes e Hylka, 1977;). Sus valores incrementan asociados al crecimiento del embrión y se triplican subitamente el día 17, manteniéndose así hasta el día 19, cuando ocurre otra elevación (9 veces más) que persiste hasta las 24 horas posteclosión (King y col, 1977; Thommes e Hylka, 1977; Decuypere y col; 1982; McNabb y col, 1984). En el caso del borrego el perfil de las HT circulantes es semejante al observado en las aves. En esta especie y durante el periodo perinatal, los niveles circulantes de  $T_4$  aumentan progresivamente en el feto y en la madre hasta el momento del parto, siendo más elevados los del feto (Nathanielz y col, 1973).

Los estudios en los que se administran bociógenos con y sin reemplazo hormonal, han confirmado que las hormonas tiroideas son primordiales para el crecimiento y desarrollo de estas especies. La falta de crecimiento y la falla en la eclosión, secundarias a la administración de metimazol, se revierten con  $T_4$  (King y Delfiner, 1974; Thommes e Hylka, 1978; McNabb, 1988; McNichols y McNabb, 1988).

En el caso de la actividad desyodativa los estudios son escasos y fragmentados, pues sólo se han analizado los dos últimos tercios de la embriogénesis. Además, la mayoría ha estudiado el tejido hepático. No obstante estas limitaciones, los resultados muestran que la actividad 5'-D esta presente en dichos periodos (Wu y col, 1978; Borges y col, 1980; Decuypere y col, 1982; Segali-Blank y col, 1982; Galton e Hiebert, 1987; Folk y col,

1988). Estos autores reportan que durante el segundo tercio en aves, existen en el hígado actividades enzimáticas tanto de activación como de desactivación, es decir se presenta actividad 5'-D y 5-D, siendo predominante la 5-D. En contraste durante el tercer tercio la actividad 5'-D se duplica, la 5-D se reduce, y predomina la formación de  $T_3$  (Borges y col, 1980; Galton e Hiebert, 1987). Este perfil enzimático se mantiene prácticamente hasta el periodo de respiración pulmonar (pipping), en el cual la actividad 5'-D vuelve a incrementar (Borges y col, 1980; Decuyper y col, 1982; Galton e Hiebert, 1987), y coincide con la elevación circulante de  $T_3$  reportada por otros autores justo antes de la eclosión (Davison, 1976; Thommes e Hylka, 1977; Thommes, 1978; Decuyper y col, 1982). Además recientemente se ha documentado en la codorniz, que la actividad 5'-D hepática observada en el segundo tercio corresponde a la enzima tipo II, mientras que la reportada en el tercer tercio es tipo I (Hughes y McNabb, 1986).

Los resultados obtenidos en estos estudios permiten sugerir que la actividad desyodativa hepática esta asociada cuando menos a los dos últimos periodos de maduración-regulación de la tiroides en las aves. Efectivamente, se conoce que durante la embriogénesis la función tiroidea del pollo transcurre por tres periodos específicos y bien definidos. La primera en la cual la glándula tiroides es funcional y autónoma (días 5 a 10.5); la segunda donde la tiroides ya es regulada por el eje

hipotálamo - hipófisis (a partir del día 10.5); y finalmente la tercera donde ocurre un incremento funcional claro y sostenido asociado a la eclosión del pollo (días 19 a 21).

La información en cerebro es escasa. Hasta el momento sólo existe un estudio (Segall-Blank y col., 1982) en la glándula pituitaria e hígado de la madre y el feto en ovejas (125 días de gestación: tercer tercio de embriogénesis) y donde puede mostrarse que la vía 5'-D fetal hipofisiaria a diferencia de la hepática es más activa que la materna. Este hallazgo podría estar asociado a la maduración cerebral característica de las especies precociales, que como se explicó en la sección anterior, el modelo de desarrollo de que se trate depende de la maduración cerebral.

Por todo lo anterior y dado que las vías desvodativas a nivel de los diferentes órganos solamente se han estudiado en la segunda y tercera etapa embriológica, la hipótesis de este trabajo plantea que se presentan diferencias en la actividad y selectividad de las vías desvodativas hepática y neural. Así para demostrar la hipótesis anterior se plantearon los siguientes objetivos:

- Analizar la vía 5'-D en hígado y cerebro de embriones de pollo durante las tres diferentes etapas embrionaria.
- Caracterizar los tipos enzimáticos de la vía 5'-D en hígado de embriones de pollo en el segundo y tercer periodo.

## MATERIAL Y METODOS

### Material Biológico

Se estudiarón embriones de pollo de 5, 6, 8, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 y 20 días de fertilizados, incubados a  $37.8^{\circ} \text{C}$  con circulación de aire y humedad controlada. Los huevos fertilizados de la raza Leghorn (Back-cock 300) se obtuvieron de la granja "La Veracruz" de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM.

### Recolección de Tejidos

A los días señalados, los embriones fueron extraídos del huevo y se sacrificaron por decapitación.

En el caso de los individuos de 5 días se analizó el embrión completo, mientras que en los de 6 y 8 días se dividió en cabeza y cuerpo. En los animales mayores de 11 días fué posible extraerles hígado y cerebro.

Los órganos extraídos, fueron congelados inmediatamente en acetona/hielo seco para su posterior análisis.

## **Métodos Analíticos**

Los órganos de cada individuo se homogeneizaron en frío (4°C) empleando un homogeneizador Potter-Elvehjem con buffer HEPES, adicionado con EDTA-Sacarosa-DTT (ver anexo I).

La actividad monodesyodativa 5'-D se determinó in vitro en homogeneizados individuales mediante la técnica de liberación de radioyodo, método descrito por Leonard y Rosenberg (1980) y estandarizada recientemente en nuestro laboratorio (Anexo I) (Aceves y Valverde-R, 1989; Valverde y Aceves, 1989).

#### IV. RESULTADOS

##### ONTOGENIA DE LA VIA 5'-D HEPATICA Y NEURAL

Para facilitar el análisis de los resultados estos se dividieron en los tres periodos que abarca la embriogénesis del pollo. Los resultados globales del estudio se muestran en la figura 9. Obsérvese que la escala en el eje de las ordenadas es logarítmica. Todos los valores son la media  $\pm$  el error estandar. Las unidades de todas las cifras reportadas corresponden a  $\mu\text{Mol RT}_3/\text{mg}$  de tejido/hora.

1<sup>er</sup> Tercio. En el homogeneizado de los embriones completos (5 días) se detecta actividad 5'-D con un valor de  $0.030 \pm 0.0021$  unidades. Un día después y ya separada la cabeza del resto del organismo, la actividad enzimática incrementa significativamente en el cuerpo ( $0.183 \pm 0.0129$  unidades). Este nivel es 30% más elevado que los valores detectados un día antes en el embrión completo: mientras que en la cabeza los valores son de  $0.0178 \pm 0.0029$  unidades).

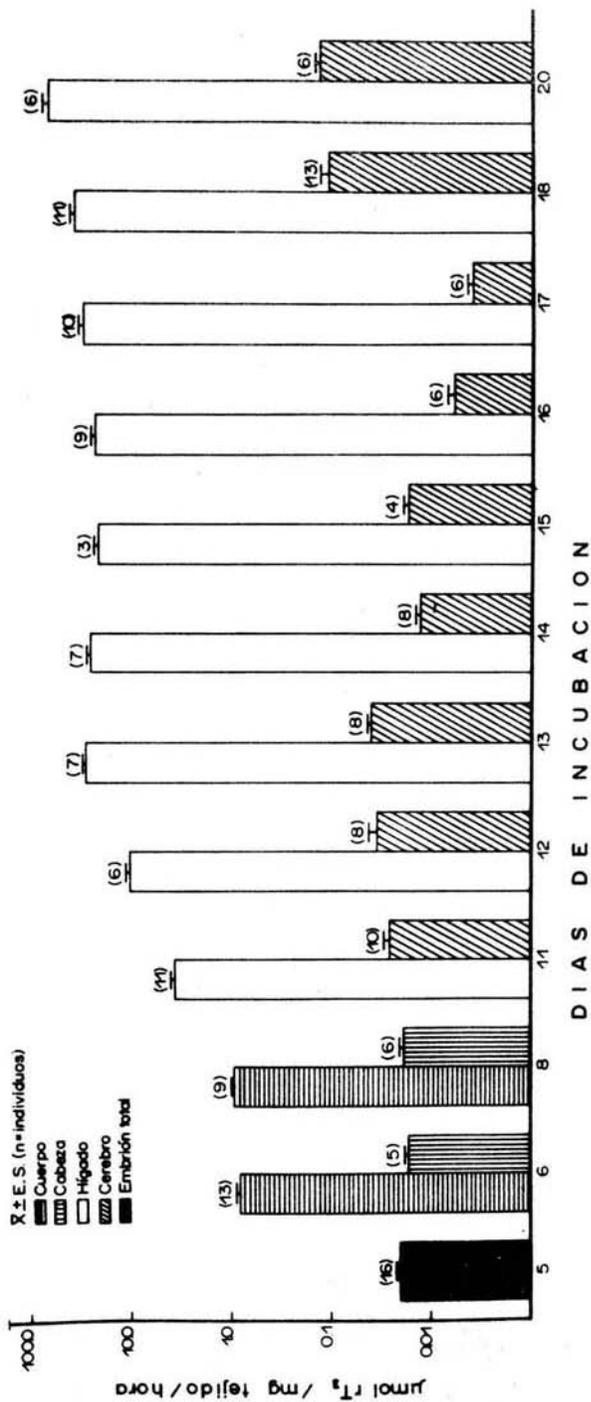


Figura 9. Resultados globales de la actividad 5'-Desyodasa en el embrión de pollo. Los unidades de todas las cifras reportadas corresponden a  $\mu\text{Mol T}_3/\text{mg de tejido/hora}$ . Todos los valores son la media  $\pm$  el error estándar.

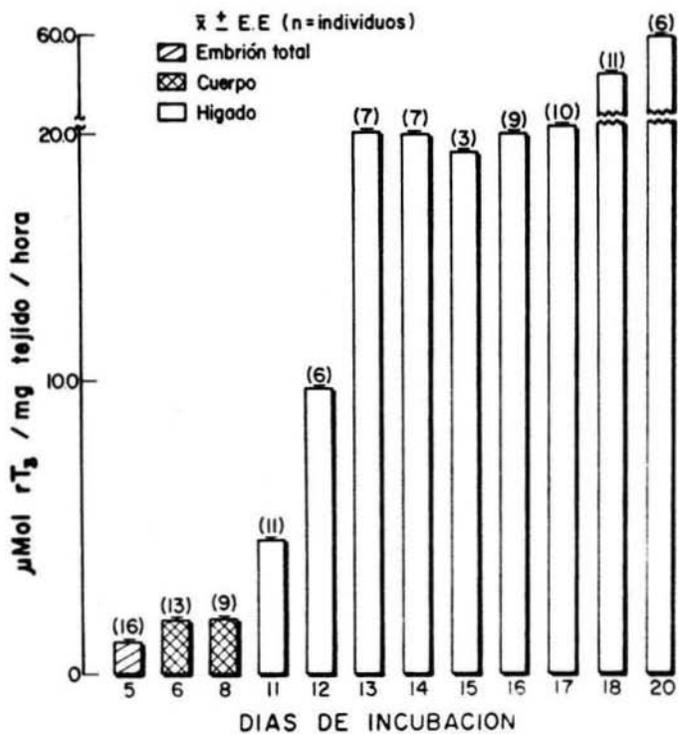


Figura 10. Actividad 5'-D hepática durante la embriogénesis del pollo. Las unidades están expresadas en  $\mu\text{Mol de rT}_3/\text{mg tejido/hora}$ .

2º Tercio. A partir de este periodo del estudio se disectaron el hígado y el cerebro, expresados en mMol y nMol rT<sub>3</sub>/mg tejido/hora respectivamente. Para el día 11 y como muestra la figura 10, puede apreciarse el notable incremento de la actividad 5'-D hepática cuyo valor  $3.5 \pm 0.4$  unidades es siete veces mayor que el detectado en el cuerpo hacia el final del primer tercio (día 6) de la embriogénesis y el inicio del segundo (día 8). En el caso del cerebro este incremento es de 1.6 veces con respecto a los valores detectados en la cabeza durante los mismos días (figura 11).

Hacia el final de este periodo ontogénico (día 13), la actividad de la 5'-D en ambos tejidos aumenta progresivamente y conserva la proporción observada al inicio del periodo (día 11). Así, la enzima en el hígado alcanza valores de  $20.6 \pm 0.5$  y en el cerebro de  $39.51 \pm 3.8$  unidades (figuras 10 y 11).

3º Tercio. La actividad hepática permanece prácticamente constante hasta el día 18 ( $32.5 \pm 0.9$ ). Posteriormente (día 19), ocurre un segundo incremento que duplica los valores previos ( $57.6 \pm 1.7$  unidades).

En contraste y desde el inicio de este periodo ontogénico, la actividad cerebral (figura 11) decae mas del 50 % ( $14.1 \pm 1.28$ ) y continua descendiendo hasta alcanzar su valor mínimo el día 17 ( $4.19 \pm 0.48$  unidades). Este decremento representa una reducción de 9 y 6 veces el valor observado los días 13 y 8 en el cerebro y

en el embrión completo, respectivamente. Sin embargo, 24 horas más tarde (día 18), la actividad de la 5'-D cerebral aumenta en forma aguda y alcanza los valores más altos de todo el estudio ( $98.0 \pm 4.39$ ). Este incremento corresponde a 23 veces el valor del día previo (día 17) y se sostiene hasta el final del estudio (día 20).

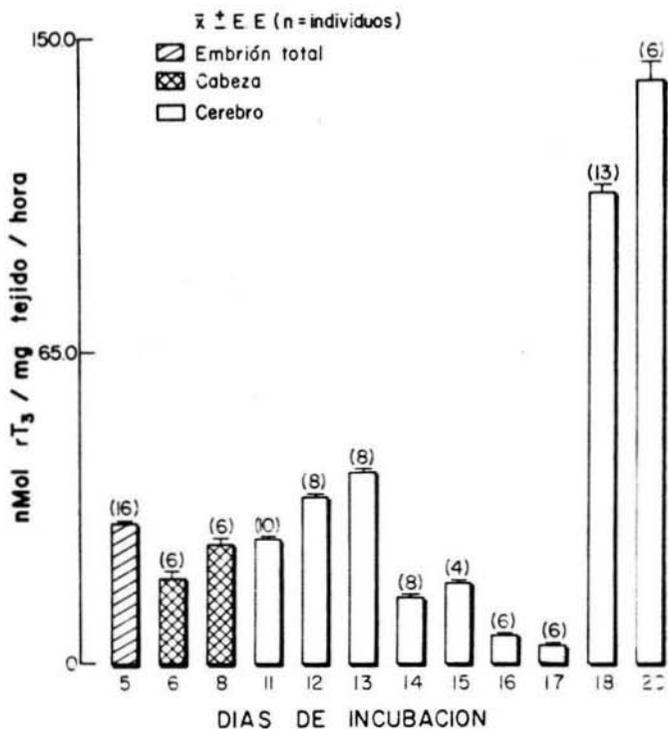


Figura 11. Actividad 5'-D cerebral durante la embriogénesis del pollo. Las unidades están expresadas en nMol de rT<sub>3</sub>/mg tejido/hora.

### CARATERIZACION DE LA VIA 5' -D HEPATICA

Los resultados de la caracterizacion de los tipos de enzimas en la via 5' -D hepatica se muestran en la siguiente tabla. Se analizaron homogeneizados individuales de higados de 11, 13 y 18 dias de embriogenesis (n=12).

La enzima tipo II fue determinada como aquella fraccion de actividad enzimatica que persiste en presencia de PTU 5.0 mM. La actividad tipo I fue calculada como la diferencia entre la actividad tipo II y la total.

### CARACTERIZACION DE LA VIA 5'-D HEPATICA EN EL EMBRION DE POLLO

DIAS	SUSTRATO	uMol rT <sub>3</sub> / mg / h		PORCENTAJE	
		rT <sub>3</sub>	rT <sub>3</sub> + PTU	TIPO I	TIPO II
11		3.1 ± 0.6	0.6 ± 0.003	80.6	19.4
13		21.8 ± 1.0	15.2 ± 0.002	30.1	69.9
18		20.8 ± 0.4	13.8 ± 0.003	33.0	66.0

Puede apreciarse que la actividad 5'-D hepática presenta en todos los tiempos analizados, los dos tipos de enzimas. En el día 11 predomina en un 80% la tipo I. Finalizando el 2º y en el 3º periodo (días 13 y 18 respectivamente) de embriogénesis la situación se invierte, predominando ahora la enzima tipo II.

## V. DISCUSION

Hasta donde conocemos este es el primer estudio que analiza en estadíos embriogénicos tempranos la actividad desyodativa en el hígado y el cerebro de pollos. La actividad detectada en uno y otro compartimento (cabeza y cuerpo) durante el 1<sup>er</sup> tercio, probablemente corresponde al cerebro e hígado respectivamente. Esta suposición resulta razonablemente válida si se toma en cuenta no solamente la masa de uno y otro organo sino tambien el curso temporal que exhibe la enzima posteriormente.

1<sup>er</sup> Tercio. Los resultados muestran claramente que a partir del día 5 de la embriogénesis, los homogeneizados de embriones de pollo completos exhiben actividad 5' desyodasa. Este hallazgo aunado al importante incremento que ocurre un día después en ambos compartimentos, complementa otros trabajos que observan actividad 5' D a partir del día 8 de la embriogénesis (Borges y col, 1980), y podría explicarse al menos en parte, por la secreción activa de T<sub>4</sub> que aparentemente se inicia a partir del día 6 (Thommes, 1987).

2º Tercio. El presente estudio muestra una marcada diferencia en la actividad de la 5' D en el hígado y el cerebro hacia el final del 2º tercio de la embriogénesis. El incremento progresivo de la enzima en ambos organos esta de acuerdo con el hecho de que el día 11 inicia su operación el eje hipotálamo - hipófisis - tiroides (Thommes, 1987). Por otra parte, la suspensión y abrupto descenso que muestra la actividad de la enzima en el cerebro, coincide con datos recientes en el pollo que muestran la disminución de receptores cerebrales a  $T_3$  (Mazumber y Banerjee, 1985; Bellabarba y col, 1988) y a somatomedinas en este periodo embriogénico (Haselbacher y col, 1980). Estos hallazgos son congruentes con el hecho de que al final del 2º tercio, el embrión ha completado la neurogénesis y se inicia la maduración neuronal (Hamburger y Halmiton, 1951). Este aparente "hipotiroidismo local" podría formar parte de un "mecanismo protector" de la maduración neural, ya que la administración de  $T_3$  durante este periodo provoca sinapsis precoces y "desincronizadas" (Schapiro y col, 1970), y se ha visto que quien dirige las conecciones celulares cerebrales en dicho periodo es la  $T_4$  (Galton y Cohen, 1980; Kaplan, 1986).

La actividad enzimática en el hígado, que alcanza sus valores máximos durante esta edad embrionaria (días 11 a 13), cambia progresivamente hacia la vía lenta y de autoconsumo (tipo II). En el día 11, el 80% corresponde a la tipo I; mientras que al final (día 13), esta desciende al 40% y predomina la tipo II. Estos

datos coinciden con la disminución que observamos en el cerebro y podrían, como han sugerido otros autores para el borrego (Fisher y col, 1977) y el renacuajo (Galton y Cohen, 1980), formar parte del mecanismo preventivo o protector de los efectos neurogénicos de la T<sub>3</sub>. La presencia de la vía tipo III o de desactivación en el hígado de embriones de pollo a partir del día 8 y hasta el 17, esta de acuerdo con la explicación anterior (Borges y col, 1980).

3<sup>er</sup> Tercio. El segundo incremento de la 5'D hepática observado en la presente tesis durante el periodo perieclusión (días 16 y 20 de incubación), confirma reportes previos en el pollo y la codorniz que muestran que la actividad enzimática incrementa dramáticamente durante el inicio de la respiración pulmonar, y alcanza sus valores máximos el día de la eclosión (Borges y col, 1980; Decuypere y col, 1982; Hughes y McNabb, 1986; Galton e Hiebert, 1987).

Aunque escasa, toda la información disponible respecto a la caracterización de las vías enzimáticas en el hígado hasta el día 18, coincide con nuestros resultados. En codornices y pollos, durante el tercer tercio y hasta antes de la respiración pulmonar, la actividad hepática es tipo II. Posteriormente y aunque en la presente tesis no se analizó, el hígado de estas especies presenta actividad tipo I (Hughes y McNabb, 1986; Galton y Hiebert, 1987; Scanes y col. 1987).

El agudo incremento observado en la actividad 5' D cerebral durante este periodo, sugiere que la maduración de este organo, que antecede a la eclosión, es dependiente de la tironina activa. Esta interpretacion encuentra apoyo en los estudios que muestran el aumento exponencial que ocurre en el gasto metabólico del embrión durante este periodo (Vleck y Vleck, 1987: figura 8), y esta de acuerdo con el unico estudio sobre el particular realizado en borregos durante el periodo perinatal (Shegall-Blank y col, 1982).

En resumen, en este trabajo se utilizó como modelo de desarrollo precocial al embrión de pollo. El análisis de las vías desyodativas hepática y cerebral sugiere que su instalación esta asociada a la ontogenia del eje hipotálamo - hipófisis - tiroides y que ellas podrían ser "marcadores" de maduración metabólica y funcional del organismo.

## VI. CONCLUSIONES

Los resultados de éste trabajo muestran claramente que:

- la actividad 5'-D esta presente desde el primer tercio de la embriogénesis del pollo.
- la actividad 5'-D hepática aumenta progresivamente con el desarrollo del embrión.
- durante el segundo tercio de la embriogénesis la actividad enzimática en el hígado es predominantemente de autoconsumo (5'-D tipo II).
- la actividad 5'-D cerebral muestra un comportamiento bifásico, cuyos incrementos parecen asociados a la neurogénesis (1<sup>er</sup> tercio) y a la mielinización (3<sup>er</sup> tercio).
- el decremento de la actividad 5'-D cerebral y el cambio de vía enzimática hepática (2<sup>do</sup> tercio), parecen formar parte del mecanismo protector de maduración neural.
- el agudo incremento de la actividad 5'-D en ambos organos durante la respiración pulmonar, esta estrechamente asociado al aumento del gasto metabólico que antecede a la eclosión.

Sobre estas bases resulta razonablemente válido proponer un modelo de la posible participación que las vías desyodativas tienen en el desarrollo del embrión de pollo (figura 12). El modelo conjunta información pertinente de la literatura así como los resultados obtenidos en esta tesis.

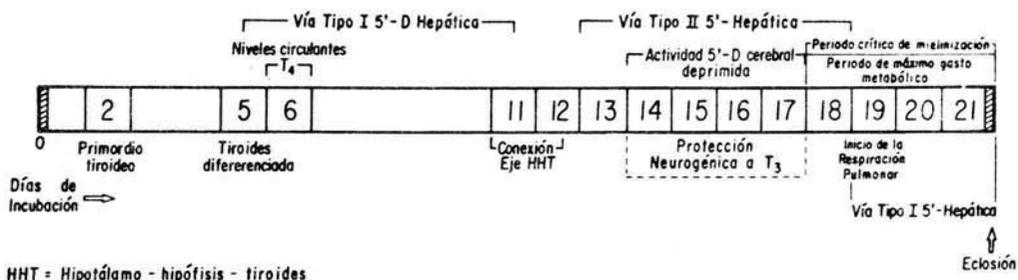


Figura 11. Modelo Ontogénico de la Síntesis, Liberación y Biotransformación de Tironinas. La figura esquematiza el periodo embrionico del pollo que comprende 21 días, así como los principales eventos morfológicos y fisiológicos del eje hipotálamo - hipófisis - tiroides y de la biotransformación organo - específica de las tironinas. Estos eventos se relacionan cronologicamente con el crecimiento y desarrollo del embrión (para mayores detalles vease texto).

El hallazgo de actividad 5' D tipo I en cuerpo y cabeza durante el 1<sup>er</sup> tercio de la embriogénesis es congruente con el hecho de que durante este periodo ocurre una acelerada multiplicación y diferenciación celular. Al igual que la glándula tiroides, es probable que la actividad enzimática sea hipofiso-independiente y este regulada por las concentraciones circulantes del sustrato ( $T_4$ ).

El establecimiento funcional y dependencia neuroendócrina tiroidea (conexión del eje HHT) parece asociarse a cambios en la magnitud y tipo de la actividad desyodativa. Estos cambios en hígado y cerebro coinciden con el periodo de protección neurogénica descrito en la literatura y en su regulación podrían participar, además del eje HHT, otras hormonas como la hormona de crecimiento y la adrenocorticotropica; así como algunos esteroides y factores de crecimiento locales.

El modelo considera que el inicio de la respiración pulmonar constituye la señal que desencadena los cambios en la magnitud y tipo en la monodesyodación cerebral y hepática. Este nuevo reajuste enzimático es determinante para iniciar y mantener el elevado gasto metabólico que antecede a la eclosión. Es probable que además de las hormonas ya mencionadas, la regulación enzimática durante este periodo esté influenciada por el balance nitrogenado positivo que caracteriza a este periodo de hipertrofia celular.

## VII. REFERENCIAS

Aceves C & Valverde-R C. (1989). Type I, 5'-monodeiodinase activity in the lactating mammary gland. Endocrinology 124: 2818 - 2820.

Acher R. (1986). Common patterns of neuroendocrine integration in vertebrates and invertebrates. Gen Comp Endocrinol 35: 491 - 495.

Anguiano S R B. (1989). Tironinas circulantes y monodesyodación periféricas durante la respuesta aguda de termoregulación al frío en la rata. Tesis de Licenciatura. ENEP - Iztacala, UNAM.

Anokhin P K. (1964). Systemogenesis as a general regulator of brain development. En W A Himwich and H E Himwich (Eds). The developing brain. Elsevier, Amsterdam. Progress in Brain Research 9: 54 - 86.

Astier H S & Newcomer W S. (1978). Extrathyroidal conversion of thyroxine to triiodothyronine in a bird: the pecking duck. Gen Comp Endocrinol 35: 496 - 499.

Astier H. (1980). Thyroid gland in birds: structure and function. In: A. Eppler & M.A. Stetson (eds). Avian Endocrinology. Academic Press, N Y. pp. 167 - 184.

Bellarbarba D & Lehoux J. (1981). Triiodothyronine nuclear receptor in chick embryo: nature and properties of hepatic receptor. Endocrinology 109: 1017 - 1025.

Bellarbarba D, Bedard S, Fortier S & Lehoux G. (1983). 3, 5, 3' - Triiodothyronine nuclear receptor in chick embryo. Properties and ontogeny of brain and lung receptors. Endocrinology 112: 353 - 359.

Bellarbarba D, Belisle S, Gallo-Pallet N & Lehoux J G. (1988). Mechanism of action of thyroid hormone during chick embryogenesis. Amer Zool 28: 389 - 399.

Borges M, LaBourene J and Ingbar H. (1980). Changes in hepatic iodothyronine metabolism during ontogeny of the chick embryo. Endocrinology 107: 1751 - 1761.

Burger A. (1986). Nondeiodinative pathways of thyroid hormone metabolism. En: Hennemann G (ed) Thyroid Hormone Metabolism. Marcel Dekker, New York, p. 255 - 276.

Chopra I J. (1977). A study of extrathyroidal conversion of thyroxine ( $T_4$ ) a 3, 3',5-triiodothyronine ( $T_3$ ) in vitro. Endocrinology 101: 453 - 463.

Daugeras N, Brisson A, Lapointe-Boulu F & Lachiver F. (1976). Thyroidal iodine metabolism during the development of the chick embryo. Endocrinology 98: 1321 - 1331.

Davison A N & Dobbing J. (1966). Myelination as a vulnerable period in brain development. Br Med Bull 22: 40 - 44.

Davison I F. (1976). Circulating thyroid hormones in the chick before and after hatching. Gen Comp Endocrinol 29: 21 - 27.

Decupeyre E, Kuhn E R, Clijmans B, Nowuen E J & Michels H. (1982). Prenatal peripheral monodeiodination in the chick embryo. Gen Comp Endocrinol 47: 15 - 17.

De Groot L & Taurog A. (1979). Secretion of thyroid hormone. En: Endocrinology. De Groot et al. (Eds) Grune Stratton, Vol 2; pp. 343 - 346.

De Nayer P & Dozin B. (1985). Thyroid hormones and brain development: modulation of the binding activity of the  $T_3$  nuclear receptor by chromatin - associated factors. Mol Physiol 7: 303 - 310.

Di Liegro I, Savettieri G & Cestelli A. (1987). Cellular mechanism of action of thyroid hormones. Differentiation 35: 165 - 175.

DiStephano J J (1988). Excretion, metabolism and enterohepatic circulation pathways and their role overall thyroid hormone regulation in the rat. Amer Zool 28: 373 - 387.

Dobbing J. (1970). Undernutrition and the developing brain. In Developmental Neurobiology. (Ed. Himwich W A). Springfield, Thomas, pp 241 - 261.

Dobbing J. (1971). Undernutrition and the developing brain: the use of animal models to elucidate the human problem. In Chemistry and Brain Development. Adv Exp Med Biol 13: 399 - 411.

Edmonds C J. (1987). Peripheral metabolism of thyroxine. J Endocr 114: 337 - 339.

Fisher D A, Dussault J H, Sack J & Chopra I J. (1977). Ontogenesis of hypothalamic-pituitary-thyroid function and the metabolism in man, sheep and rat. Rec Prog Horm Res 33: 59 - 116.

Fox M W. (1966). Neuro - Behavioral ontogeny, a synthesis of ethological and neurophysiological concepts. Brain Research 2: 3 - 20.

Franklyn J A & Sheppard M C. (1988). Thyrotrophin gene regulation. J Endocrinol 117: 161 - 165.

Gaglia F, Torresani J, Bagli P, Barletta A & Liverini G. (1981). In vitro binding of triiodothyronine to rat liver mitochondria. J Clin Invest 70: 919 - 923.

Galton V A & Cohen J S. (1980). Action of thyroid hormones in premetamorphic tadpoles: An important role for thyroxine?. Endocrinology 107: 1820 - 1826.

Galton V A & Schaafsma J. (1983). Binding of thyroid hormones to isolated hepatic nuclei from Rana catesbeiana tadpoles. Endocrinology 112: 1999 - 2006.

Galton V, & Hiebert A. (1987). The ontogeny of the enzyme systems for the 5' and 5-deiodination of thyroid hormones in chick embryo liver. Endocrinology 120: 2604 - 2610.

Ganong F W. (1980). Manual de Fisiologia Medica. 9a ed El Manual Moderno. pp. 274 - 291.

Gómez V E, Bolanos F y Valverde-R C. (1982). Tiroides. En: Fundamentos de Endocrinología clínica. J. M. Malacara, M. García Viveros, C. Valverde-R. (Edits.) Prensa Médica Mexicana.

González M M N, Pérez V A y Gómez V E. (1984), Tiroides. En F. Flores L y A. Cabeza F. (Ed). Endocrinología MC Editor. México. pp 407 - 420.

Gordon M S. (1982). Fisiología Animal. Ed. CECSA. México.

Grodsky G M. (1984). Química y funciones de las hormonas: I Tiroides y paratiroides. En: Bioquímica de Harper. Manual Moderno. México. pp. 489 - 493.

Halsebacher G K, Andres R Y & Humbel R E. (1980). Evidence for the synthesis of somatomedin similar to insulin-like growth factor I by chick embryo liver cells. Eur J Biochem 111: 245 - 250.

Hamburger V & Hamilton H L. (1951). A series of normal stages in the development of the chick embryo. J Morph 88: 49 - 92.

Hardy R N. (1984). The thyroid gland. En: Endocrine Physiology. Edward Arnold (Eds). London. pp. 90 - 112.

Hilfer S R. (1964). Follicle formation in the embryonic chick thyroid. I. Early morphogenesis. J Morphology 115: 135 - 151.

Hopkins P S & Thornburn G D. (1972). The effects of foetal thyroidectomy on the development of the ovine fetus. J Endocrinol 54: 55 - 56.

Hughes T E & McNabb F M N. (1986). Avian hepatic by two pathways of 5'-Monodeiodination: Effects of fasting and patterns during development. J Exp Zool 238: 393 - 399.

Iwai K. (1987). Introduction to gene regulation. Gunma Symposia on Endocrinology 24: 9 - 11.

Kaplan M. (1984). The role of the thyroid hormone deiodination in the regulation of hypothalamo-pituitary function. Neuroendocrinology 38: 254 - 260.

Kaplan M M. (1986). Regulatory influences on iodothyronine deiodination in animal tissues. En: Hennemann G (ed) Thyroid Hormone Metabolism. Marcel Dekker, New York. p. 231 - 253.

King D B & Delfiner J S. (1974). Effect of the goitrogen methimazole on skeletal muscle growth of chick embryos. Gen Comp Endocrinol 24: 17 - 27.

King D B, King C R and Eshleman J R. (1977). Serum triiodothyronine levels in the embryonic and post-hatching chicken, with particular reference to feeding-induced changes. Gen Comp Endocrinol 31: 216 - 223.

Kitagawa M, Ohba Y & Suzuki Y. (1987). T<sub>3</sub> action and chromatin structure. Gunma Symposia on Endocrinology 24: 158 - 168.

Klinck G H. (1964). Structure of thyroid. En: The Thyroid. Hazard B J & Smith D E (Eds). The Williams & Wilkins Co. USA. pp. 1 - 31.

Kühn E R, Decuyper E, Hemschoote K, Bergham L & Paulussen J. (1983). Antagonism of serum triiodothyronine changes after injections of prolactin in the domestic fowl before and after hatching. J Endocr 99: 401 - 407.

Kühn E R, Verheven G, Chiasson R B, Huts C, Huybrechts L, Van den Steen P & Decuypere E. (1987). Growth hormone stimulates the peripheral conversion of thyroxine into triiodothyronine by increasing the liver 5'-monodeiodinase activity in the fasted and normal fed chicken. Hor Metab Res 19: 304 - 308.

Kühn E R, Vanderpooten A, Huybrechts L M, Decuypere E, Darras V & Sharps P J. (1988). Hypothalamic hormones the release growth hormone stimulate hepatic 5'-monodeiodination activity in the chick embryo. J Endocr 118: 233 - 236.

Lehmann F. (1982). Las hormonas tiroideas. Ciencia 33: 145 - 153.

Leonard J and Rosenberg I. (1980). Iodothyronine 5'-deiodinase from rat kidney: substrate specificity and 5'-deiodination of reverse triiodothyronine. Endocrinology 107: 1376 - 1383.

Leonard J L & Visser T J. (1986). Biochemistry of deiodination. En: Hennemann G (ed) Thyroid hormone metabolism. Marcel Dekker, New York, pp. 189 - 227.

Mazumber A & Banerjee S K. (1985). Triiodothyronine levels of embryonic and adult chick brain. IRCS Med Sci 13: 529 - 530.

McNabb F M A, Stanton F W & Dicken S G. (1984). Post-hatching thyroid development and body growth in precocial vs altricial birds. Comp Biochem Physiol 78 A: 629 - 635.

McNabb F M N. (1987). Comparative thyroid development in precocial japanese quail and altricial ring doves. J Exp Zool suppl 1: 281 - 290.

McNabb F M N. (1988). Peripheral thyroid hormone dynamics in precocial and altricial avian development. Amer Zool 28: 427 - 440.

McNichols M J & McNabb F M N. (1988). Development of thyroid function and its pituitary control in embryonic and hatching precocial japanese quail and altricial ring doves. Gen Comp Endocrinol 69: 109 - 118.

Malkinson A M. (1975). Hormone Action. Chapman & Hall, London.

Nathanielsz P W, Limline R S, Silver M & Thomas A L. (1973). Thyroid function in the foetal lamb during the last third of gestation. J Endocr 33: 535 - 546.

Newcomer W S & Barrett P A. (1960). Effects of various analogues of thyroxine on oxygen uptake of cardiac muscle from chicks. Endocrinology 66: 414 - 418.

Oppenheimer J H, Koerner D, Schwartz H L & Surks M I. (1972). Specific nuclear triiodothyronine binding sites in rat liver and kidney. J Clin Endocrinol Metab 35: 330 - 333.

Oppenheimer J H. (1979). Thyroid hormone action at the cellular level. Science 203: 971 - 979.

Oppenheimer J H. (1985). Thyroid hormone action at the nuclear level. J Clin Invest 75: 147 - 156.

Oppenheimer J H, Schwartz H L, Mariash C N, Kinlaw W B, Wong N C W & Frenkel H C. (1987). Advances in our understanding of thyroid hormone action at the cellular level. Endocr Rev 8: 288 - 308.

Parker M G. (1983). The expanding family of nuclear hormone receptors. J Endocr 119: 175 - 177.

Phillips D I W, Lazarus J H and Hall R. (1988). Iodine metabolism and the thyroid. J Endocrinol 119: 361 - 363.

Folk D H, Wu S Y, Wright C, Reviczky A L & Fisher D A. (1988). Ontogeny of thyroid hormone effect on tissue 5'-monodeiodinase activity in fetal sheep. Am J Physiol 254: E337 - E341.

Romanoff A L. (1960). The avian embryos; structural and functional development. McMillan Co., New York.

Romer A S. (1973). Anatomia comparada de los vertebrados. Ed Interamericana. 2<sup>a</sup> ed. Mexico.

Root W A, Shulman D, Root J & Diamond F. (1986). The interrelationships of thyroid and growth hormones: effect of growth hormone releasing hormone in hypo- and hyperthyroid male rats. Acta Endocrinol (Copenh) 113 (Suppl 279): 367 - 375.

Rudas P & Pethes G. (1986). Acute changes of the conversion of thyroxine to triiodothyronine in hypophysectomized and thyroidectomized chickens exposed to mild cold (10°C). Gen Comp Endocrinol 69: 408 - 413.

Samuels H H, Forman B M, Horowitz Z D & Ye Z - S. (1988). Regulation of gene expression by thyroid hormone. J Clin Invest 81: 957 - 967.

Schapiro S, Sales M & Vukovich K. (1970). Hormonal effects on ontogeny of swimming ability in the rat: assessment of central nervous system development. Science 168: 147 - 151.

Scanes C G, Hart, L E, Decuyper E & Kuhn E R. (1987). Endocrinology of the avian embryo: An Overview. J. Exp. Zool. suppl 1: 253 - 264.

Scott J P. (1962). Critical periods in behavioral development. Science 138: 949 - 958.

Segall-Blank M, Connolly J L & Ingbar H. (1982). Comparative studies of the metabolism of thyroxine in the pituitaries of pregnant sheep and their fetuses. Endocrinology 111: 1996 - 2000.

Sterling K & Lazarus J H. (1977). The thyroid and its control. Ann. Rev. Physiol 39: 349 - 371.

Strand F L. (1982). Fisiologia Humana. Ed. Interamericana. Mexico. pp 217 - 226.

Tata J R & Shellabarger C J. (1959). An explanation for the difference between the responses of mammals and bird to thyroxine and tri - iodothyronine. Biochem. J 72: 608 - 613.

Tata J R & Widnell C C. (1966). Ribonucleic acid synthesis during the early action of thyroid hormones. Biochem. J 98: 604 - 620.

Tata J R. (1980). The action of growth and developmental hormones. Biol. Rev 55: 285 - 319.

Thommes R & Hylka U. (1977). Plasma iodothyronines in the embryonic and immediate post-hatch chick. Gen. Comp. Endocrinol 32: 417 - 422.

Thommes R C & Hylka V W. (1978). Hypothalamo - Adenohypophyseal - Thyroid interrelationships in the chick embryo. I. TRH and TSH sensitivity. Gen. Comp. Endocrinol 34: 193 - 200.

Thommes R. (1987). Ontogenesis of thyroid function and regulation in the developing chick embryo. J. Exp. Zool. Suppl 1: 273 - 279.

Trunell J B & Braver F I. (1953). Factors governing the development of the chick embryo thyroid. I. Determination of the time at which  $I_3$  collection begins. J. Clin. Endocrinol. Metab. 12: 86 - 94.

Valverde-R C, Aramburo C y Bayón A. 1988. Neuroendocrinología y Fertilización. Interrelación. Ed. J. Muñoz Martínez. Coordinador. Técnicas y Hechos sobre la Vida. Los sistemas vivos. Soc Mex C Fisiol. PRONFOPAB-SEP. pp. 133 - 194.

Valverde-R C & Aceves C. (1988). Circulating thyronines and peripheral monodeiodination in lactating rats. Endocrinology 124: 1340 - 1344.

Valverde-R C, Orozco A, Aceves C y Romero R C. Control y Regulación de la Función Tiroidea. En: Texto de Fisiología. Soc Mex C Fisiol. PRONFOPAB-SEP. (en prensa, 1989).

Vleck M C & Vleck D. (1987). Metabolism and energetics of avian embryos. J Exp Zool suppl 1: 111 - 125.

Weirich R T & McNabb F M A. (1984). Nuclear receptors for L - triiodothyronine in quail liver. Gen Comp Endocrinol 53: 90 - 99.

Wu S-Y, Klein A H, Chopra I J & Fisher D A. (1978). Alterations in tissue thyroxine-5'-monodeiodinating activity in perinatal period. Endocrinology 103: 235 - 239.

## ANEXO 1

### Técnica de Liberación de Radio - Yodo.

Fundamento y Metodología. Esta técnica se fundamenta en la monodesyodación periférica de la molécula de tironina y consiste, en determinar la actividad enzimática de la desyodasa, en este caso de la vía 5'-D mediante la cuantificación del I<sup>-</sup> liberado a través de esta vía.

Para la realización de este ensayo es necesario contar con un sustrato radiactivo lo suficientemente puro para tener la certeza de que el I<sup>-</sup> liberado es producto de la acción enzimática y no de la radiólisis de la hormona. El método que se empleó para limpiar el trazador fue una electroforesis descendente en papel y se describe a continuación.

Electroforesis descendente en papel. Se coloca la muestra reversa T<sub>3</sub> (obtenida de New England Nuclear) en el origen del papel filtro (Whatman # 3) y se seca con N<sub>2</sub>. Se deja correr a 0.6 KV y 5 mA por 15 minutos, utilizando como acarreador NH<sub>4</sub>AC 50 mM. Transcurrido este tiempo se detiene la electroforesis y se eluye la hormona con NaOH 0.04N y H<sub>2</sub>O destilada; ya que a pHs muy ácidos o muy básicos las tironinas se solubilizan. La hormona se

mantiene en amortiguador de fosfatos 1M / EDTA 10 mM pH 6.9. Antes de utilizarse en el ensayo se le agrega DTT 20 mM (Donador de grupos tioles) y T<sub>3</sub> fría. A este preparado se le conoce como mezcla radioactiva.

Preparación del Homogeneizado. Todo el procedimiento se realiza en frío. Se pesa el tejido y se homogeneiza en amortiguador Hepes 10 mM pH 7.0; adicionado con EDTA-sacarosa-DTT (1.0 mM, 0.32 M y 10 mM respectivamente), en una proporción 1:10 peso/volumen.

Cuantificación de la Actividad Enzimática. En tubos eppendorf, se incuban por duplicado a 37 ° C los siguientes reactivos:

- 50 ul del homogeneizado
- 50 ul de la mezcla radioactiva (50,000 cpm aproximadamente)

El tiempo de incubación varía según el tejido, para el hígado a una dilución 1:100 se incuba durante 2 horas, mientras que para el cerebro son 4 horas y concentrado

La reacción se detiene adicionando 50 ul de una solución de suero bovino normal y FTU 10 mM (1:1, v/v) y 350 ul de ácido tricloroacético (TCA) al 10 %.

Los tubos se centrifugan a 2,500 rpm x 10 min a 4° C y el sobrenadante se aplica en columnas empacadas con una resina de intercambio catiónico (Dowex 50W - X2), en donde todas las

tironinas son detenidas en la resina y solamente pasa el I-  
liberado.

Las columnas se eluyen con 2 ml de ácido acético glacial al 10  
% y la radiactividad del eluido se cuenta en un espectrómetro  
gamma.

Los resultados se calculan como se indica a continuación y se  
expresan en uMol de I liberado/mg de tejido/hora.

Cálculos.

$$\frac{\% \times 2 \times 20 \times 2}{H \times 5} \times \text{Factor de dilución.}$$

Donde:

- % = I<sup>125</sup>
- 2 = Posición I<sup>125</sup>
- 20 = Conversión a ml.
- 2 = 2 nM T<sub>3</sub>
- H = tiempo de incubación
- 5 = mg de tejido