

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE QUIMICA

46

VARIABLES PRINCIPALES QUE AFECTAN EL
BIOENSAYO DE LA HORMONA ESTIMULANTE
DEL TIROIDES EN RATAS UTILIZANDO
RADIOISOTOPOS



T E S I S

Que Para Obtener el Título de
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P r e s e n t a

JORGE LUIS BLE CASTILLO

México, D. F.

1978



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

MT 62



JURADO ASIGNADO ORIGINALMENTE SEGUN EL TEMA:

PRESIDENTE : Profr. Oscar Amor Dodero
VOCAL : Profa. Maria Luisa García Padilla
SECRETARIO : Prof. Dea Coronado Perdomo
1er. SUPLENTE : Profa. Guillermina Buzillo Amezcu
2do. SUPLENTE : Prof. Salvador Martín Sosa

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

Sección de Hormonas Protéicas
Subjefura de Investigación Básica
Centro Médico Nacional, IMSS

SUSTENTANTE : JORGE LUIS BLE CASTILLO

ASESOR DEL TEMA: PROFA. MA. LUISA GARCIA PADILLA

SUPERVISOR TECNICO: DRA. ANGELICA SALAS-VALDES

The image shows three handwritten signatures in black ink, each written over a horizontal line. The first signature is for Jorge Luis Ble Castillo, the second for Profa. Ma. Luisa Garcia Padilla, and the third for Dra. Angelica Salas-Valdes.

A LA MEMORIA DEL ILUSTRE ESTADISTA
LIC. CARLOS A. MADRAZO, TRABAJADOR
INCANSABLE POR LA JUSTICIA SOCIAL
Y EJEMPLO DE LEALTAD Y PATRIOTISMO.

A LA MEMORIA DEL MAESTRO CARLOS PE-
LLICER CAMARA, POR SU ELEVADA MISION
FILANTROPICA Y EDUCATIVA EN NUESTRO
PUEBLO.

A MIS PADRES:

Luis Blé Taracena y Lilí Castillo de Blé
a quienes debo todo lo que soy.

A MIS HERMANOS:

Bertha, Frida, Marbe, Deysí y Henry
por el apoyo y el cariño que siempre me
han brindado.

A MIS FAMILIARES:

Quienes han sido un estímulo con sus
consejos desinteresados.

A MIS MAESTROS:

Que con su esfuerzo contribuyeron a mi
formación académica.

A MIS COMPAÑEROS Y AMIGOS:

Con quienes he compartido muchos años fuera
de mi hogar.

Manifiesto mi sincero agradecimiento a la Dra. Angelica Salas Valdéz, supervisora - de este trabajo por su inestimable ayuda.

A la maestra Ma. Luisa García Padilla, por su dirección y consejo.

Al Q.F.B. Víctor M. Sánchez Hidalgo y al - Dr. Adalberto Parra Covarrubias por su desinteresada ayuda.

A todo el personal del Laboratorio de Hormonas Proteicas del Departamento de Investigación Básica. I.M.S.S.

A aquellas personas que de alguna manera - contribuyeron a la realización de este trabajo.

I N T R O D U C C I O N

Generalidades:

Las hormonas son sustancias químicas producidas y secretadas directamente hacia la sangre, por las glándulas endócrinas o de secreción interna; estas hormonas funcionan como mensajeros químicos en los diversos órganos y tejidos donde regulan una serie de actividades fisiológicas y metabólicas.

En cuanto a su composición química las hormonas varían entre amplios límites desde aminas, pasando por estructuras complejas cíclicas esteroides hasta proteínas.

De todas las glándulas del organismo humano, la más importante por su acción de coordinar las actividades de otras glándulas es la hipófisis o pituitaria. Anatómicamente esta glándula está dividida en tres zonas: la hipófisis anterior, el lóbulo intermedio y la hipófisis posterior o neurohipófisis. La primera produce una serie de hormonas llamadas "trópicas" de naturaleza proteínica o polipéptica: Tirotropina (TSH), Somatotropina u Hormona de Crecimiento (GH), Adrenocorticotropina (ACTH), Hormona Estimulante del Folículo (FSH), Hormona Luteinizante (LH) y Prolactina ó Luteotropina (PRL). El lóbulo intermedio produce la hormona Estimulante de los Melanóforos (MSH) y la hipófisis posterior los péptidos oxitocina y vasopresina (1, 2).

La glándula tiroides, situada en la superficie anterior y lateral de la tráquea y laringe es la encargada de producir y secretar las hormonas tiroideas L-tiroxina (T_4) y L-triyodotironina (T_3). La síntesis y la liberación de estas hormonas está regulada por la TSH; a su vez la secreción hipofisiaria de ésta, es influida por factores neurohumorales del hipotálamo, así como por la concentra-

ción plasmática de las hormonas tiroideas, mediante un mecanismo de retroalimentación negativa; es decir, cuando se eleva la concentración plasmática de tiroxina (probablemente también triyodotironina) disminuye la secreción de TSH y a la inversa cuando el nivel de las primeras disminuye se produce un aumento en la síntesis y secreción de la hormona trópica (3). El mecanismo de acción de la TSH es iniciado mediante su unión específica a los receptores presentes en las membranas plasmáticas de las células blanco del tiroides, lo que produce la activación de la adenil ciclasa, enzima involucrada en la síntesis de las hormonas tiroideas (4).

La Hormona Estimulante del tiroides o tirotrópina obtenida de la hipófisis de mamíferos se ha descrito como una glicoproteína con un peso molecular entre 27000 y 30000; con una amplitud de variación en su punto isoeléctrico de 6 a 9; está formada por dos subunidades, una alfa (α) y otra beta (β). En la TSH de origen humano la subunidad alfa está constituida por 89 aminoácidos y la subunidad beta por 102 (5); estudios más recientes han sido reportados por Sairam y Choh Hao Li (6, 7,8). Su contenido en ácido sialico es del 1.5% mientras que existen cantidades insignificantes en la TSH de bovinos y de porcinos (7).

La extracción y purificación de la TSH de origen animal y humano (10) ha permitido la implementación de técnicas para medir la presencia y los niveles de esta hormona en materiales biológicos, tales como el suero, la orina, la hipófisis y los subproductos de esta glándula.

Métodos para la cuantificación de hormonas:

La determinación de las hormonas y sus metabolitos se lleva a cabo por métodos biológicos, químicos e inmunológicos. En el caso de las hormonas hipofi-

siarias que son de naturaleza química proteínica, los métodos químicos solo funcionan como ayuda secundaria, siendo primordiales los métodos biológicos y los inmunológicos.

La cuantificación de las hormonas por métodos biológicos se basa en la acción que estas ejercen directamente en los órganos blanco o indirectamente por la acción de sustancias producidas por estos órganos blanco sobre las células de la economía. La acción directa ha sido la más ampliamente utilizada.

Los métodos biológicos con frecuencia son procedimientos mas específicos que los métodos químicos, aunque menos sensibles y precisos que estos. Los métodos inmunológicos son los procedimientos de más reciente aparición; dentro de éstos, se encuentra incluido el radioinmunoensayo el cual está basado en la competencia de la hormona marcada con ^{125}I ó ^{131}I (antígeno marcado) y la hormona fría (antígeno no marcado) por los sitios de unión del anticuerpo específico para la hormona. La principal ventaja de estos métodos consiste en la elevada sensibilidad que alcanzan. Los principios generales de esta técnica han sido discutidos en detalle por Berson y colaboradores (11). Aunque estos métodos han tenido gran auge en los últimos años y su ayuda al diagnóstico clínico y a la investigación en este campo ha sido determinante, no han logrado desplazar a los procedimientos de bioensayo; la razón es la siguiente: los primeros miden la actividad inmunológica, definida como la propiedad para inducir la producción de anticuerpos y combinarse específicamente con ellos; los segundos determinan y cuantifican la actividad biológica, que es la capacidad intrínseca de una sustancia para provocar cambios específicos en el metabolismo de un organismo vivo, órgano o tejidos aislados.

En los últimos años algunos investigadores han encontrado que el sitio de acti

vidad inmunológica de una hormona de naturaleza proteínica no necesariamente es su sitio de actividad biológica (12); probablemente este hecho sirva para explicar los resultados de algunos trabajos donde se demuestra que no existe correlación entre los niveles de hormonas obtenidos por RIA y por bioensayo (13).

"Bliss define como método biológico o bioensayo a aquel experimento por medio del cual se determina, cuánto se necesita de una sustancia problema para producir la misma respuesta que un estándar en un organismo vivo, íntegro o partes de él (14); en el primer caso se denominan bioensayos "in vivo" y en el segundo bioensayos "in vitro".

Los bioensayos se han dividido en dos grupos: los que dependen de efectos cuánticos y aquellos que dependen de efectos graduales. En el primer grupo los resultados provienen del porcentaje de animales que muestran alguna respuesta de finida tal como estro u ovulación; los efectos producidos son de naturaleza cuántica o de "todo o nada" en el segundo grupo los efectos producidos por la sustancia problema y el estándar son medibles en cada animal. La mayoría de las estimaciones hormonales caen dentro de esta última categoría, ejemplos típicos de este grupo son: el ensayo de GH basado en sus efectos sobre el cartílago epifisiario de la tibia en ratas hipofisectomizadas (16), el de FSH cuyo fundamento es el incremento de los pesos ováricos en ratas hembras inmaduras normales (16) y el de TSH basado en la captación de ^{32}P por la glándula tiroides de pollos de un mes de edad (17).

Los ensayos cuánticos son menos apropiados para procedimientos rutinarios que aquellos que dependen de efectos graduales, ya que los métodos estadísticos aplicados al cálculo de los errores en tales pruebas son generalmente mas com

plicados; según Finney (14) el número de animales requeridos en un bioensayo cuántico para cualquier grado de precisión dado es aproximadamente el doble de los necesarios para ensayos basados en respuestas graduales.

Como el presente trabajo se desarrolló en el Banco de Hormonas Protéicas del IMSS, el que tiene como áreas fundamentales de trabajo: la extracción y purificación de las hormonas protéicas; los bioensayos para cuantificar la potencia biológica de las hormonas y la de radioinmunoquímica para cuantificar la actividad inmunológica de las hormonas y elaborar los elementos del radioinmunoanálisis, nuestra tesis de licenciatura se desarrolló con el estudio de las condiciones que afectan el bioensayo de TSH.

Las primeras observaciones en relación a la existencia de TSH se hicieron en 1916 (10) en experimentos realizados en renacuajos. El estudio de la diferenciación y crecimiento en los hipofisectomizados o no, y el completo desarrollo en presencia o ausencia de extracto tiroideo en el agua (hábitat de los renacuajos) llevó a la conclusión de la existencia de la TSH y a la importancia de las hormonas tiroideas en la diferenciación completa de los renacuajos.

Fue natural entonces, que el enorme interés despertado alrededor de este tema indujera numerosas publicaciones relacionadas con la búsqueda de un bioensayo necesario para cuantificar dicha hormona. La excelente revisión de Bates y Condliffe (18) de 1960 da una completa información de los tipos de bioensayo desarrollados hasta esa fecha.

A continuación se enumeran los diferentes métodos con los que se ha estudiado la actividad biológica de TSH.

1.- Cambios histológicos del Tiroides.

a)- Altura celular.

- b)- Porcentaje relativo de células y coloides.
 - c)- Presencia de coloides en forma de gotas.
- 2.- Peso tiroideo.
- a)- "in vivo"
 - b)- "in vitro" en cortes de tejido.
- 3.- Captación de ^{32}P por la tiroides.
- a)- "in vivo" conteo sobre tiroides extirpadas.
 - b)- "in vitro" conteo sobre la fracción lipídica de los cortes de tejido.
- 4.- Captación de ^{131}I por la tiroides.
- a)- "in vivo" conteo sobre tiroides del animal vivo o sobre tiroides extirpadas.
 - b)- Conteo "in vitro" sobre cortes de tejido tiroideo.

Puesto que en el laboratorio se dispone de ratas Long-Evans se decidió estudiar con ellas la técnica de McKenzie (20) quien en 1958 la desarrolló en ratones Swiss-Webster, modificando la establecida en cobayos por Adams y Purves en 1957 y la de Gilliland y Strudwick en 1953 en pollos (19).

Esta técnica consiste en preparar al animal de prueba con una dieta baja en yodo algunos días antes de la administración del isótopo radioactivo, el cual se aplica simultáneamente con un inhibidor de la secreción de TSH endógena; días después recibe el estímulo por vía parenteral en su forma de estandar o problemas, y se observa la respuesta por la comparación de la radioactividad sanguínea antes y después del estímulo.

La más usada es la de McKenzie (20) que emplea el ratón y que se ha modificado: sin dieta baja en yodo (21), disminución a dos días del periodo comprendido entre aplicación del yodo y el estímulo, con modificación del diseño -

experimental (22), cambios en el diseño experimental y en el manejo estadístico de los resultados (23, 24, 25) con lo que se obtiene una mayor sensibilidad y precisión, lo que aumenta su confiabilidad, y Nutt en 1974 (26) abrevia a 24 horas la duración del periodo entre la aplicación del isótopo y el bioensayo propiamente dicho, con la particularidad de que usa teofilina para potenciar los efectos de la TSH.

En los últimos años se observa la tendencia a practicar técnicas "in vitro" - como son las de radioreceptor o radioligando (27, 28, 29), que tienen la ventaja de facilitar el procesamiento de muchas muestras simultáneamente.

Estándares de TSH.

Para la estandarización de la técnica y la comparación de resultados obtenidos de un mismo bioensayo de uno a otro laboratorio es necesario disponer de estándares que sean usados por ambos laboratorios; en la actualidad esto se ha logrado por medio del empleo generalizado de los estándares internacionales que existen para las principales hormonas; sin embargo, hasta épocas muy recientes no se disponía de estos estándares y los resultados se expresaban en términos de unidades arbitrarias tales como la unidad de Junkmann-Schoeller y la unidad Heyl-Lacqueur (30) ambas basadas en la respuesta del tejido tiroideo de cobayos. Una unidad se define como la cantidad de una hormona específica necesaria para producir un efecto específico.

En 1951 la farmacopea americana introduce una sustancia de referencia para TSH y por definición 20 mg de este material eran equivalentes a una unidad USP; hasta 1954 aparece el primer estándar internacional que se define como la actividad presente en 13.5 mg del preparado; ambos estándares son derivados de hipófisis bovina y aproximadamente de igual potencia (19).

Con la introducción del RIA para TSH humana apareció el estándar HTRS-A (Human Thyrotrophin Research Standard A) elaborado por el Department of Biological Standards en Londres; a cada ampula se le ha asignado una potencia arbitraria de 150 miliunidades internacionales (mUI) de TSH (31). Reichert ha descrito las relaciones que existen entre las potencias de los estándares mencionados (32).

Cuando un método biológico se traslada a un laboratorio, es necesario conocer y establecer las condiciones óptimas para su desarrollo; esto se logra mediante un minucioso estudio analítico de las diversas variables que lo afectan.

El objetivo del presente trabajo es estudiar las principales variables que afectan el metabolismo del ^{131}I en la rata Long-Evans, con el propósito de establecer una técnica de bioensayo de TSH, basado en la acción de ésta para liberar ^{131}I desde un tiroides marcado, hacia el torrente sanguíneo.

MATERIAL

Cristalería:

Tubos capilares heparinizados, microhematocrito 75 mm largo (KORTEX).

Tubos de ensayo de 12 x 75 mm.

Micropipetas de 25 y 50 μ l.

DeseCADador de vidrio.

Pipetas automáticas BBL, con puntas desechables de plástiCO de 100 y 200 μ l.

Propipeta de hule.

Jeringas desechables de plástiCO, varios volúmenes.

Aparatos y Equipos:

Tijeras rectas, pinza de disección y bisturí.

Homogeneizador de Potter Elvejhiem con émbolo de teflón.

Centrífuga refrigerada (International Refrigerated Centrifuge Model PR-6).

Centrífuga refrigerada automática Sorval superspeed RC2-B.

Balanza analítica Mettler sensibilidad 1 mg.

Balanza analítica Mettler sensibilidad 0.1 mg.

Potenciómetro Coleman modelo 38.

Balanza con escala dietética marca Chatillon, capacidad 500 g.

Contador de centelleo automático para rayos gamma de Nuclear Chicago Corporation modelo 4230.

Contador de dosis Nuclear Chicago, Mediac Dose-Calibrator.

Equipo de ultrafiltración con membrana Amicon UM-2.

Espectrofotómetro de doble haz Hitachi Perkin Elmer Coleman 124.

Material radioactivo:

^{131}I Na, obtenido de los laboratorios Mallinckrodt.

Reactivos:

Eter dietílico anhidro q.p. (Merck).

Acido clorhídrico (Merck).

Cloruro de sodio q.p. (J.T. Baker).

Solución salina isotónica (Farbiosa).

Productos para la dieta de las ratas:

Purina Laboratorios Chow (0.5% de la sal yodada).

Extracto total de tiroides (Armour 0.065 g equivalente a 0.130 mg de yodo en combinación orgánica.

Maíz quebrado.

Caseinato de Calcio CLAVE 1930, Cuadro Básico IMSS que contiene:

Proteínas (N x 6.38)	88.0%
Grasa	2.0%
Sales Minerales	4.5%
Humedad	5.5%
(Contenido de Calcio	de 1.2% a 2.1%)

Laboratorios Manuell, S.A.

Biológico:

Ratas Long-Evans y Sprague-Dowley, ambos sexos, cepas endogámicas de diferentes edades y pesos.

Ratones BALB/C de ambos sexos, cepa endogámica con peso corporal determinado.

Hipófisis de ratas.

Tiroides de ratas.

Sangre venosa de ratas.

Hipófisis humanas.

Orina y suero de personas normales.

Estándares de referencia:

NIH-TSH-B6 (bovino) cuya actividad original es de 2.54 USP U/mg y HTSH-Pierce (humano) con actividad de 7.14 USP U/mg y 5.57 HTRS-A U/mg.

Estos estándares fueron gentilmente proporcionados por NIAMDD de los Institutos de Salud Pública de los Estados Unidos.

MÉTODOS

El estudio de la técnica se hizo a través de la captación del ^{131}I por el tiroides de la rata y su eliminación a la sangre periférica.

Manejo de animales experimentales:

Durante los primeros meses del trabajo experimental (septiembre a diciembre de 1976), los animales estuvieron en un local diferente al del bioterio, sometidos a los cambios de temperatura ambiente (15 a 28°C) en las 24 horas. De enero a junio de 1977 el trabajo se desarrolló manteniéndolos a 32°C de temperatura, con ciclos de luz y oscuridad de 14 x 10 y demás condiciones ambientales constantes.

Las ratas de las cepas Long-Evans o Sprague-Dawley utilizadas variaron en edades desde 22 hasta 60 días y los pesos de 50 a 150 g. El peso de los ratones fue de 18 a 20 g correspondiente a la edad del destete.

Mientras no se indique lo contrario, todas las ratas utilizadas en los experimentos son del sexo masculino.

Los roedores fueron alimentados con purina de Laboratorios Chow y agua corriente "ad libitum" durante los primeros experimentos. La dieta baja en contenido de yodo se constituyó de maíz quebrado y agua deionizada, lo que provocó una severa pérdida de peso por lo que se complementó agregando Caseinato de Calcio en polvo (usado en la alimentación de niños lactantes) en una proporción de 81% de maíz por 18.86% de caseinato en la mezcla. Esta dieta cubrió los requisitos necesarios para un buen aumento de peso, comparable al alcanzado por los animales alimentados con purina de Laboratorios Chow. El extracto tiroideo fue administrado por vía oral disolviendo las pastillas en el agua que -

beben normalmente los animales.

Obtención y manejo de muestras biológicas:

La sangre de personas normales (donadores de sangre) se obtuvo por punción venosa del antebrazo. El suero fue separado centrifugando a 3000 rpm durante 5 min a 4°C y conservado en refrigeración por un tiempo no mayor de tres días - antes del día de su uso.

En los roedores las muestras de sangre periférica se obtuvieron por punción del área retroorbital (seno ocular interno) manteniendo al animal bajo anestesia ligera con éter; la punción se hizo por medio de un tubo capilar de vidrio de 1.2 x 75 mm, que equivale a un volumen aproximado de 71 μ l. El tubo capilar fue sellado en uno de sus extremos con plastilina y colocado en un tubo de ensayo de 12 x 75 mm para su conteo.

Todas las observaciones correspondientes al contenido de radioactividad (^{131}I) en la glándula tiroides se realizaron "in vitro" sacrificando al animal con éter y extirpando la glándula en bloque, cortando parte de laringe y primeros anillos de tráquea; después de lavar con agua destilada para eliminar la radioactividad contaminante, el bloque fue manipulado al igual que los tubos capilares para la determinación de su contenido en ^{131}I .

Estimulantes del Tiroides Utilizados:

Preparación de los estándares:

100 μ g del estándar NIH-TSH-B6 se disolvieron en 254 ml de solución salina isotónica y distribuidos en alícuotas de 3,5 ml (3.5 mU c/uno), se congelaron y conservaron a -20°C hasta su uso.

Del estándar HTSH-Pierce se pesaron 100 μg preparándose alícuotas de 2.5 μg - en un volumen de 25 μl . En esta forma cada alícuota contiene 17.85 mU y se -- conservaron en las mismas condiciones que el estándar anterior.

Preparación de los extractos hipofisiarios:

El extracto de hipófisis humana se preparó en la siguiente forma: 5 hipófisis de personas adultas que se habían conservado en acetona durante ocho días, con peso total de 1560 mg y 312 mg de peso en promedio por glándula, se homogenizaron en 20 ml de solución salina isotónica en tubo de Potter-Elvehjem a 4°C; el homogenado se centrifugó a 15000 rpm durante 30 min en centrífuga refrigerada. El sobrenadante se separó y fraccionó en 12 alícuotas de 1 ml que se conservaron congeladas a -20°C hasta el día de su uso.

El extracto de hipófisis de ratas se obtuvo en la forma siguiente:

100 ratas L.E. machos de 30 a 40 días de edad con un peso aproximado de 70 a 80 g, se sacrificaron con CO_2 (hielo seco).

Las hipófisis extraídas se colocaron de inmediato en solución salina isotónica a 4°C, mediante el procedimiento enumerado a continuación:

1. Homogeneización en 10 ml de solución salina fisiológica por medio de tubo de Potter-Elvehjem.
2. Centrifugación a 2000 rpm por 15 min a -10°C.
3. El sobrenadante fue separado y se agregó HCl 2.0 M gota a gota con agitación constante, hasta ajustar un pH de 1.2.
4. Reposo durante 20 min en cuarto frío.
5. Se agregó NaCl hasta lograr una solución 1.0 M en un volumen de 50 ml.

6. Centrifugación a 4000 rpm durante 15 min a -10°C .
7. El sobrenadante con volumen de 50 ml se ultrafiltró en membrana Amicon UM-2 (Límite de exclusión 2000) con agitación y presión constante durante 8 horas.
8. El volumen residual de 5 ml sobre la membrana se llevó a 30 ml con solución salina.
9. Se prepararon alícuotas de 1 ml que se mantuvieron conservadas a -20°C hasta su uso.

La concentración de proteínas en estas alícuotas fue de $300\ \mu\text{g/ml}$ calculada contra una curva estándar (10 a $100\ \mu\text{g/ml}$) de Albúmina Sérica Bovina. Las lecturas se efectuaron a $280\ \text{nm}$ (Región del ultravioleta).

Preparación del material radioactivo:

El ^{131}I Na fue gentilmente proporcionado por el laboratorio de Medicina Nuclear del Hospital General del Centro Médico Nacional en donde es utilizado para diagnóstico clínico. Este material cuando es recibido presenta una actividad demasiado alta, de tal manera que para su aplicación en este trabajo fue necesario diluirlo con agua destilada y obtener alícuotas hasta las dosis adecuadas de acuerdo con el diseño experimental. Estas diluciones se hicieron con la ayuda del contador de dosis, el cual registra la actividad de las radiaciones gamma (γ) en Curies y para el ajuste final de un número determinado de cuentas se utilizó el contador de centelleo automático.

La aplicación del ^{131}I se hizo por vía intraperitoneal mientras que la TSH como estándar ó extracto hipofisiario se administró por las principales vías parenterales, subcutánea (S.C.), intraperitoneal (i.p.) e intravenosa (i.v.). Las

inyecciones se aplicaron con jeringas desechables de plástico de 2.5 ml.

Ajuste y optimización del contador de Centelleo Nuclear Chicago:

Este aparato cuenta con dos canales de emisión, uno para contar radiaciones gamma del ^{125}I ; el otro canal se ajustó a una ventana de 1.6 base 1.02 y atenuador de 8 para contar las radiaciones gamma de mas alta energía del ^{131}I .

Con el propósito de obtener la máxima precisión en el mínimo de tiempo sobre las "cuentas mínimas" que se obtenían en la sangre periférica, se varió el voltaje por intervalos de 50 a partir de 550 hasta 1650 volts, calculando para cada uno, los respectivos índices S^2/B (S =actividad de la fuente, B = actividad de fondo).

El voltaje seleccionado fue de 850 volts que correspondió al máximo valor de dicho índice, igual a 2836. Este índice es de gran utilidad cuando se quieren medir como en nuestro caso, gran cantidad de muestras de baja actividad, pero no es tan importante cuando se miden actividades muy altas como las que se obtienen en las tiroides radioactivas.

El canal B usado para ^{131}I bajo esas condiciones quedó calibrado para un rango de energía de 0 a 2 MeV. La ventana se ajustó para contar el fotopico de 0.364 MeV (Base a 1.02 0.102 MeV, ventana a 1.6 (16%), 160 KeV sobre la base o sea 0.262 MeV).

La eficiencia de los aparatos de centelleo fue aproximadamente del 18% comparándola contra el contador de dosis Nuclear Chicago.

Medición de la radioactividad:

Exceptuando el experimento 1 todas las mediciones de radioactividad se hicie-

ron en el contador Nuclear Chicago modelo 4230 con cristal de yoduro de sodio activado con Talio.

Todos los datos de cuentas por minuto obtenidas se corrigieron con la resta del valor de fondo del aparato y por el decaimiento del isótopo ^{131}I . El valor de fondo se obtuvo contando un tubo de ensayo de 12 x 75 mm, vacío en el caso de lecturas para muestras de tiroides y conteniendo un capilar también vacío en su interior para corrección de muestras de sangre periférica. Todos los valores de fondo se obtuvieron cada vez que se contó material radioactivo.

Un requisito necesario para relacionar valores de radioactividad obtenidos en diferentes tiempos, es relacionarlos a un tiempo inicial o cero; en este estudio los volúmenes fueron referidos al primer día del experimento. Para lograr esto se utilizaron los factores de decaimiento ($e^{-\lambda t}$) que se obtienen en tablas para distintos tiempos. Otra forma de corrección utilizada usualmente, fue el empleo de un patrón constituido por un volumen de isótopo igual al administrado al animal que fue medido con la misma jeringa de inoculación; este volumen depositado en un tubo de ensayo se conservó a 4°C y se contó al mismo tiempo que las glándulas que se extraen en los diferentes lapsos entre inyección de isótopo y conteo de radioactividad. (De esta forma se eliminan otros parámetros de error introducidos por el aparato).

El tiempo de vida media biológica del ^{131}I definido como el tiempo necesario para la eliminación de la mitad de la cantidad del isótopo desde un sistema biológico dado, se determinó para la sangre periférica y la tiroides partiendo de los resultados en CPM obtenidos de la recta ajustada de los datos originales (no corregidos por decaimiento) (33).

El tiempo de vida media efectiva se calculó con la siguiente ecuación:

$$t^{1/2} \text{ ef} = \frac{0.693 (t)}{2.3 (\text{Log } N_0 - \text{Log } N)}$$

N_0 = CPM originales

N = CPM que permanecen después de un intervalo de tiempo "t"

Utilizando este valor y el tiempo de vida media de desintegración propia del ^{131}I ($t^{1/2r}$) igual a 8.08 días, se calculó el tiempo de vida media biológica ($t^{1/2b}$) mediante la siguiente ecuación:

$$\frac{1}{t^{1/2b}} = \frac{1}{t^{1/2\text{ef}}} - \frac{1}{t^{1/2r}}$$

La captación tiroidea de isótopo se expresa en este trabajo como "% de captación absoluta" o simplemente "% de captación" si se refiere al número de cuentas inyectadas y "% de captación relativa" cuando está referida a la cantidad de ^{131}I que se incorpora al tiroides de un grupo control.

Cuando se trata de sangre periférica los valores se expresan como % de radioactividad presente en un determinado volumen de ésta, y en todos los casos está referida al número de cuentas por minuto inyectadas al animal. Debe aclararse que la corrección por decaimiento no fue considerada importante cuando la diferencia entre los tiempos fue inferior a 10 horas, como es el caso de los valores de radioactividad sanguínea antes y después de la administración de los estímulos hormonales.

Procedimientos estadísticos: (34)

Las siguientes expresiones han sido utilizadas en este trabajo:

Promedio: $\bar{X} = \frac{\sum x}{n}$: donde x representa observación individual y "n" el número de observaciones.

Desviación estándar: $S = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{X})^2}{n-1}}$

Error estándar de la Media: $S.E. = \frac{S}{\sqrt{n}}$

Todas las desviaciones del promedio en este trabajo han sido expresadas como error estándar (S.E.) ya que esta medida permite conocer a grosso modo cuando dos promedios difieren significativamente entre sí ya que para ello es necesario que la diferencia en sus promedios sea mayor que dos veces la suma de sus errores estándares.

La correlación lineal entre la radioactividad presente en la sangre periférica y el tiempo se hizo con la transformación logarítmica de los valores de -- ambos ejes de la gráfica, mientras que para la radioactividad presente en el tiroides esta correlación se hizo en papel semilogarítmico.

En todos los casos, el ajuste de la recta se hizo con el método de los mínimos cuadrados.

Las variables de la técnica aplicada a la rata que se estudiaron en el presente trabajo fueron:

- 1- Las dosis permisibles de ^{131}I .
- 2- El metabolismo del ^{131}I en relación con:

- a- el tiempo: vida media biológica
 - b- la edad y el peso corporal
 - c- el sexo
 - d- la cepa y las dosis
 - e- la temperatura ambiente
 - f- la dieta
 - g- el efecto inhibidor del extracto tiroideo
- 3- Los efectos de TSH en relación con:
- a- el tiempo
 - b- las dosis
 - c- el sexo
 - d- la vía de administración
 - e- la especie

1- Dosis permisibles de ^{131}I .

Para saber cuál era la dosis tolerada por el tiroides de la rata L.E. (disponible en el laboratorio), sin que produjera daño tisular que se manifestara por una disminuída captación en el tiroides y un exagerado aumento de la radioactividad en la sangre periférica, se administraron dosis de 1 a 15 μCi de ^{131}I a cada rata de grupos de cuatro, de 30 a 35 días de edad y de 60 a 90 g de peso corporal. Las muestras biológicas se obtuvieron 24 horas después de aplicado el isótopo.

2- El metabolismo del ^{131}I en relación con:

a- el tiempo. A 20 ratas de 35 a 40 días de edad y de 90 a 110 g de peso corporal se les inyectaron 5 μCi de ^{131}I . Cada 24 horas y durante 5 días - se tomó sangre periférica y sacrificó para tomar el tiroides en cada rata

de un grupo de cuatro animales. Con los datos obtenidos se buscó el tipo de gráfica que diera la mejor linearización de la respuesta y se calculó la vida media biológica.

b- la edad y el peso corporal. Con dos grupos de 20 ratas cada uno, de 25 días de edad y 30 a 60 g de peso corporal uno, y de 30 a 35 días de edad y 90 a 110 g de peso corporal el otro, se estudió la vida biológica media del isótopo; se inyectaron 5 μCi a cada rata y cada 24 horas y durante 5 días se tomaron muestras de sangre periférica.

c- el sexo. Dos grupos con distinto sexo, de 20 animales cada uno y con -- edades de 21-25 días y pesos de 60-80 g, se mantuvieron un tiempo de 12 días con la dieta baja en yodo (dieta 1) después de lo cual se inyectaron 10 μCi de ^{131}I a cada animal. Las muestras biológicas de sangre y tiroides se obtuvieron tres días después de la inyección del isótopo.

d- la cepa y las dosis. Se utilizaron cinco grupos de cuatro animales cada uno, de 45 a 50 días de edad y de 105 a 150 g de peso corporal para la Long Evans y de 25 a 35 días de edad y de 70 a 100 g de peso corporal para la Sprague-Dawley. Cada grupo recibió 0, 2, 4, 6, 8 y 10 μCi de ^{131}I y 48 horas después se tomó sangre periférica y sacrificaron inmediatamente después para extraer el tiroides.

e- la temperatura ambiente. Dos grupos de 20 ratas cada uno, de 30 días de edad y peso corporal de 60 a 80 g recibieron 8 μCi de ^{131}I . Ambos grupos permanecieron a una temperatura ambiente de 22°C. Uno de los grupos se -- trasladó a un ambiente de 14°C, dos horas antes de la toma de la muestra de sangre periférica de 24 horas.

f- la dieta. Se utilizaron dos tipos de dieta: (dieta 1).- Maíz quebrado y agua deionizada y (dieta 2).- Maíz quebrado con caseinato de calcio. Cada una se administró a un grupo de 20 ratas de 35 a 40 días de edad y de 60 a 100 g de peso corporal.

La dieta 1 se administró desde 14 días antes de la aplicación del isótopo y la dieta 2 sólo durante 10 días.

El grupo control para ambos tratamientos estuvo constituido por 10 animales del correspondiente lote y que se alimentaron con la dieta ordinaria del bioterio (purina de los laboratorios Chow).

Cada animal recibió 10 μCi de ^{131}I y las muestras biológicas se tomaron a las 48 horas de administrado el isótopo.

g- el efecto inhibitorio del extracto tiroideo. Se utilizó un grupo de 35 ratas L.E. de 35 a 40 días de edad y de 80 a 110 g de peso corporal, Se distribuyeron en siete grupos de cinco animales cada uno. Cada dosis del extracto tiroideo de Lab. Armour se disolvió en 100 ml de agua corriente, y se consumió un volumen aproximado de 300 ml diarios por cada grupo.

Las dosis fueron: 52, 78, 104, 130, 156 y 180 mg por 100 ml de agua corriente. El grupo control bebió sólo agua corriente.

Los animales se mantuvieron en estas condiciones durante tres días, al cabo de los cuales se suspendió el extracto tiroideo, se administraron 5 μCi de ^{131}I a cada animal y 48 horas después se tomaron los productos biológicos.

Otro grupo de 20 ratas de la misma edad y peso corporal recibió 130, 156 y 182 mg de extracto tiroideo en 100 ml de agua corriente simultáneamente

con la administración de 5 μCi del isótopo, las muestras biológicas se tomaron 48 horas después.

3- Los efectos de TSH en relación con:

a- el tiempo. Un grupo de 10 ratas machos Long-Evans de 35 a 40 días de edad y 90 a 100 g de peso corporal, se mantuvieron con la dieta 1 durante 10 días al cabo de los cuales se les administró 15 μCi de ^{131}I . 48 horas después se les aplicó por vía I.P., 0.2 mU de TSH de origen bovino (NIH-TSH-B6) a cada una. Cada hora y durante cinco, se obtuvieron muestras de sangre por punción del seno retroorbital.

Las respuestas se midieron en porcentaje:

$$\% \text{ de respuesta} = \frac{\text{cpm de } X_t}{\text{cpm de } O_t} \times 100$$

X_t = tiempo en horas después del estímulo

O_t = tiempo inmediatamente antes del estímulo

b- las dosis. Se utilizaron 15 ratas hembras, de 30 a 35 días de edad y con 80 a 100 g de peso corporal y divididos en grupos de cinco, que recibieron 182 mg de extracto tiroideo por 100 ml de agua durante dos días, a partir de la administración de 12 μCi del isótopo. Después de 48 horas las muestras biológicas se tomaron 2.5 horas después de aplicado el extracto hipofisario humano por vía intraperitoneal, a las dosis de 0.5, 1.0 y 2 ml del homogenado original para cada grupo. Estos volúmenes corresponden a 42, 84 y 168 milésimos del peso promedio original de una hipófisis por cada rata.

c- el sexo. Dos grupos de 10 ratas cada uno, de diferente sexo, de 35 a 40 días de edad y peso corporal de 90 a 100 g los machos y de 80 a 90 g las -

hembras, se mantuvieron con la dieta 1 durante 10 días. Recibieron entonces el extracto tiroideo a la dosis de 182 mg/100 ml de agua, simultáneamente con la inyección intraperitoneal de 19 μCi /rata en el caso de los machos y 10 μCi /rata hembra. 48 horas después se les aplicó 48 milésimos del peso de una hipófisis humana y se tomaron muestras de sangre por punción del seno retroorbital a los tiempos 0, 1, 3 y 5 horas de aplicado el estímulo.

d- la vía de administración. Dos grupos de 5 ratas cada uno, de 35 a 40 días de edad y de 80 a 100 g de peso corporal, que se mantuvieron con la dieta 1 durante 12 días, recibieron simultáneamente 182 mg de extracto tiroideo/100 ml de agua y 10 μCi de ^{131}I por vía intraperitoneal. 72 horas después de administrado el isótopo se aplicó el extracto hipofisario humano a la dosis de 0.083 del peso total de la hipófisis/rata; a uno de los grupos por vía subcutánea y al otro por vía intraperitoneal. Una muestra de sangre se obtuvo por punción del seno retroorbital a los siguientes tiempos después de aplicado el extracto hipofisario: 1.5, 2.5, 3.5, 5 y 8 horas.

e- la especie. Veinte ratones, hembras, de 21 a 25 días de edad, de 10 a 15 g de peso corporal, de la cepa BALB/C, se sometieron a la dieta 1 durante nueve días, al cabo de los cuales recibieron 8 μCi de ^{131}I por vía subcutánea y 182 mg de extracto tiroideo/100 ml de agua. Cinco días después y también por vía SC, a cada animal de grupos de cuatro se les aplicaron los estímulos: 83 milésimos del peso de una hipófisis; 3.48 y 6.96 mU del hTSH (Pierce); 0.5 ml de suero humano normal y 0.5 ml de agua bidestilada. La sangre periférica se tomó por punción retroorbital 2.5 y 3.5 horas después de la aplicación de los estímulos.

RESULTADOS Y DISCUSION

1.- Dosis permisibles de ^{131}I :

En la figura 1 se observa la relación lineal de las dosis del isótopo con la radioactividad captada por el tiroides (escala izquierda de la gráfica), con un aumento progresivo del error estándar conforme aumenta la dosis. Hay una discreta tendencia a aumentar las cuentas en la sangre periférica, sin que -- las diferencias de las respuestas a las diferentes dosis sea estadísticamente significativas.

Estos resultados demuestran que con la dosis máxima utilizada (15 μCi) y en el tiempo de observación no hay daño tisular, puesto que no se observa una caída en la captación, ni un aumento exagerado de la radioactividad en la sangre periférica.

McKenzie (30) ha reportado que una actividad mayor de 2 μCi en el tiroides del ratón puede lesionar la glándula, Doniach y colaboradores (35) por su parte, señalan que la administración de 25 μCi de ^{131}I produjeron daño tisular en una cepa híbrida de ratas, 17 meses después de su aplicación, lo que se manifestó por un aumento considerable de la TSH circulante.

En el presente trabajo, en un experimento aislado, se utilizó la dosis de 19 μCi , sin que se observaran modificaciones importantes en la captación y liberación de la radioactividad en el tiroides durante 5 días posteriores a la -- aplicación del isótopo.

Se concluye entonces que en la rata Long-Eyans se puede utilizar cualquiera

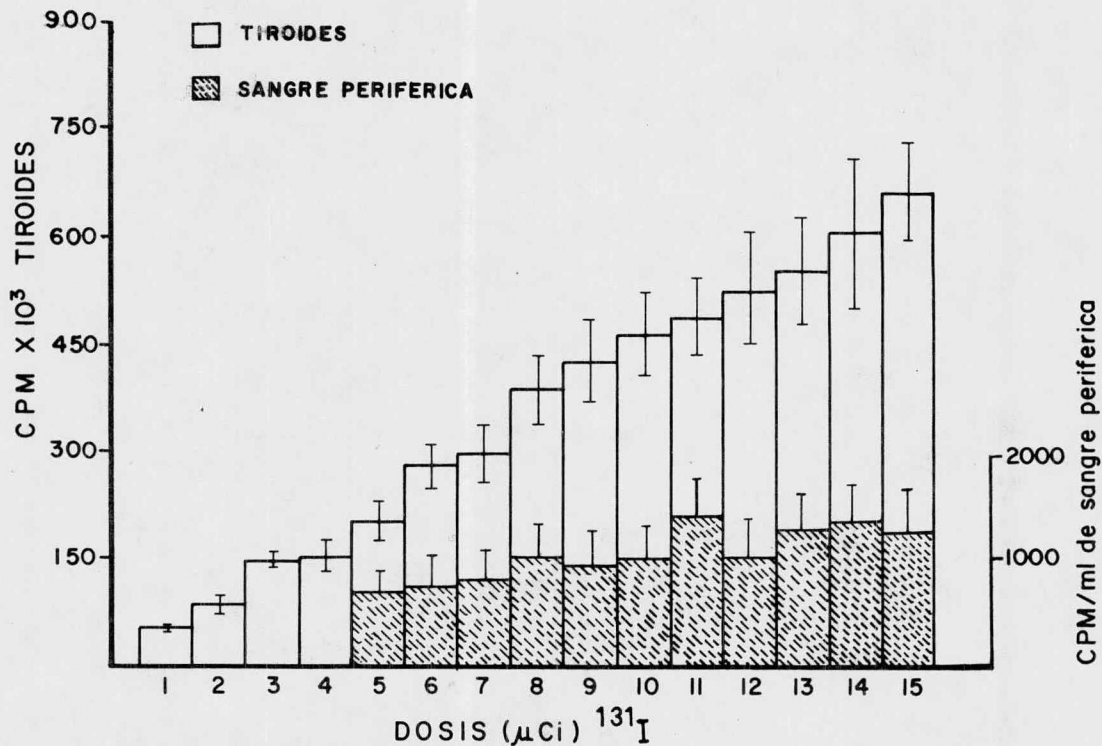


Figura 1: Estudio de la dosis permisible de ¹³¹I en la rata macho Long-Evans. Las barras verticales representan el error estándar para cada grupo.

de las dosis ensayadas en este experimento.

Como se verá mas adelante, las dosis más frecuentemente utilizadas en este trabajo fue de 5 μ Ci y solo ocasionalmente se emplearon dosis mayores del isótopo.

2.- Estudio del metabolismo del ^{131}I en relación con:

a- el tiempo: La tabla No. 1 muestra las cpm en tiroides y sangre periférica que se obtuvieron cada 24 horas y durante cinco días. La gráficación de dichos resultados (figura 2) muestra que mientras la disminución del ^{131}I del tiroides sigue una relación de tipo exponencial con el tiempo, la de la sangre periférica es de tipo potencial. Esta última por lo tanto, se transforma en una recta cuando se grafica en papel log-log (figura 3). El tiempo de vida media biológica que se obtuvo de los datos del ^{131}I en tiroides es de 3.66 días, - mientras que en sangre periférica es de 3.73 días.

Wilansky (36) ha reportado que en ratas hembras, de 4 a 5 meses de edad y por lo tanto de mayor edad que las utilizadas en nuestro caso, la vida media biológica calculada para el isótopo en tiroides es de 3.1 días.

b- la edad y el peso corporal: La tabla II muestra que cuando el animal es - más joven y de menor peso, los niveles de radioactividad en sangre periférica son mayores que en el de mayor edad y peso corporal. Además, la vida media biológica es mas corta en el primer caso, que en el segundo, como se refleja por la magnitud de las pendientes de las rectas correspondientes a cada uno (figura 4).

Las observaciones de Wilanski (36) de que la vida media biológica del mismo isótopo en el tiroides de ratas de diferentes edades (4 a 5 meses u 24-25 meses) es menor en las más jóvenes, apoyan indirectamente nuestros datos.

TIEMPO (horas)	TIROIDES (cpm)	SANGRE (cpm/ml)
24	322468	732
48	281838	450
72	231206	310
96	192930	225
120	169824	183

Tabla I.- Radioactividad presente en -
tiroides y sangre de las ratas
L.E. a diferentes tiempos des-
pués de la inyección de 5 μ Ci
de ^{131}I .

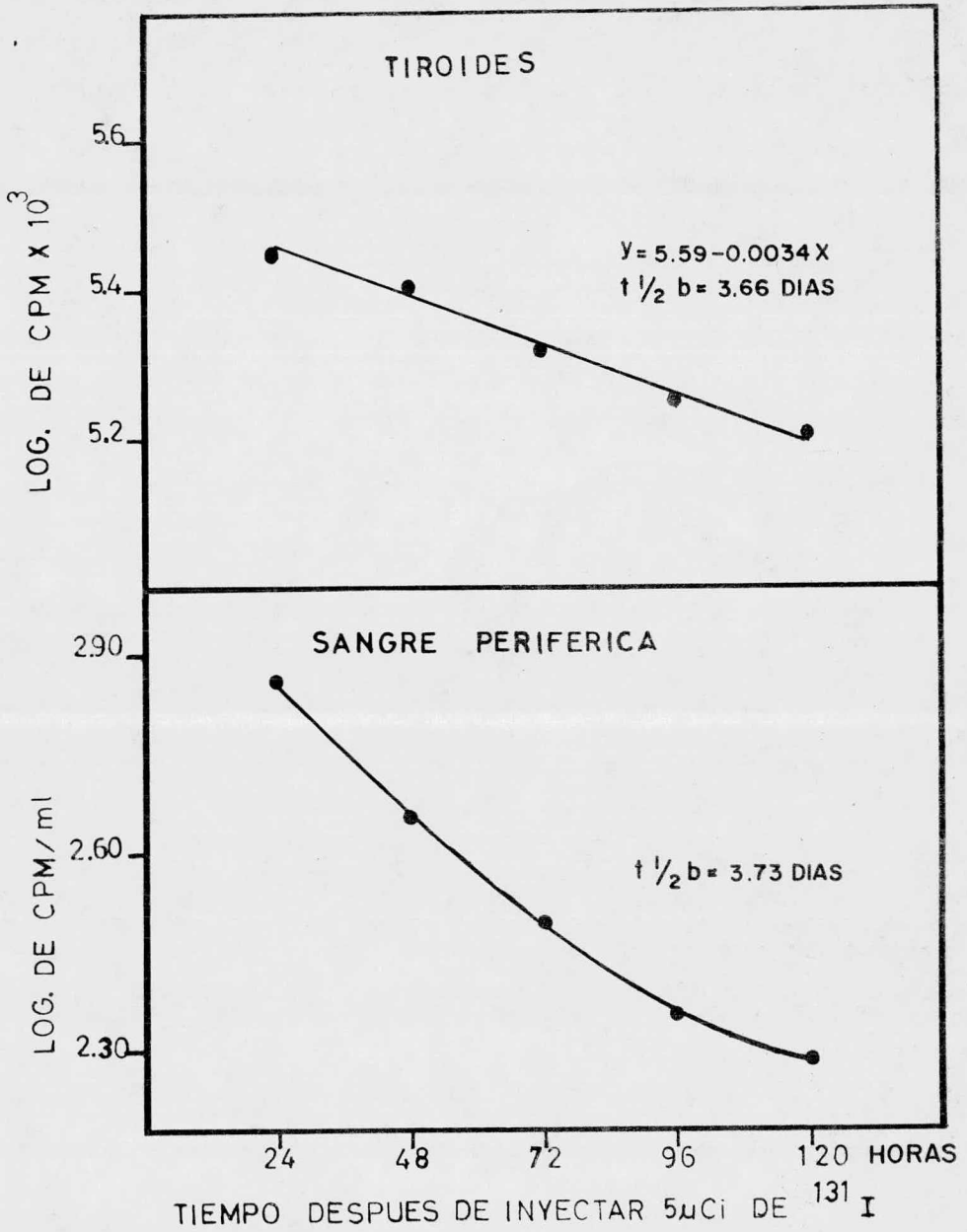


Figura 2: a- Relación lineal del logaritmo de la radioactividad del tiroides con el tiempo.

b- Relación del logaritmo de la radioactividad sanguínea con el tiempo.

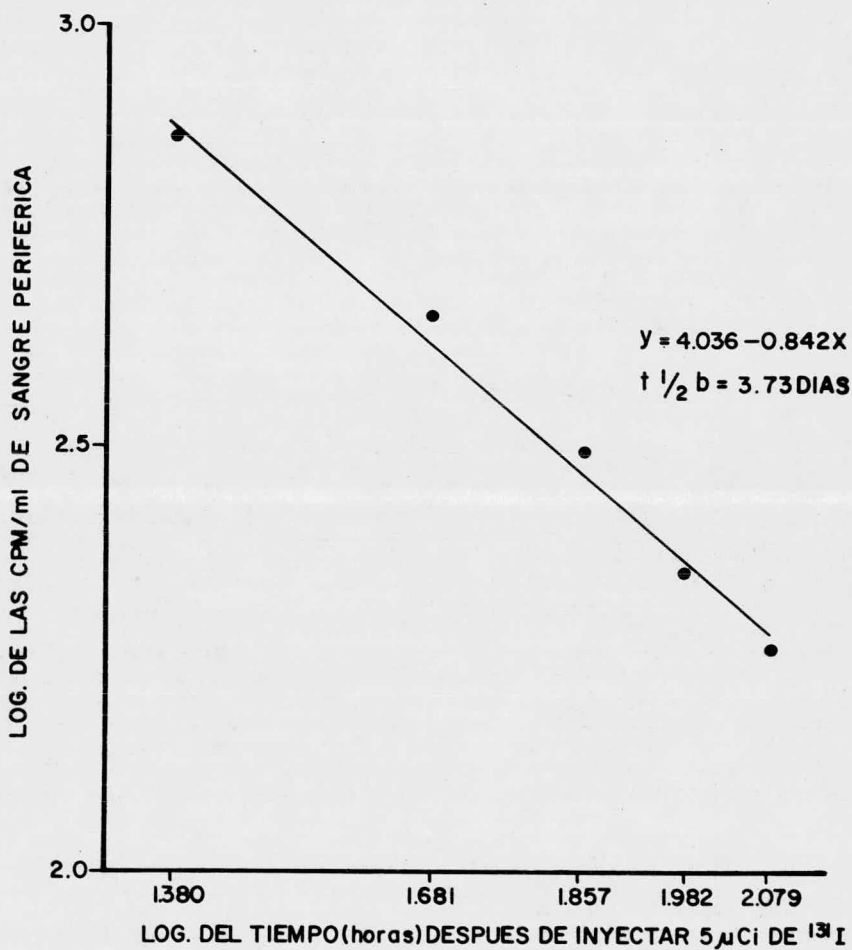


Figura 3: Relación lineal del logaritmo de la radioactividad con el logaritmo del tiempo.

TIEMPO (horas)	SANGRE PERIFERICA (cpm/ml)	
	25 a 30 días	25 a 40 días
24	1101	732
48	280	450
72	117	310
96	64	225
120	53	183

Tabla II.- Radioactividad presente en sangre periférica de dos grupos de diferentes edades y a diferentes tiempos.

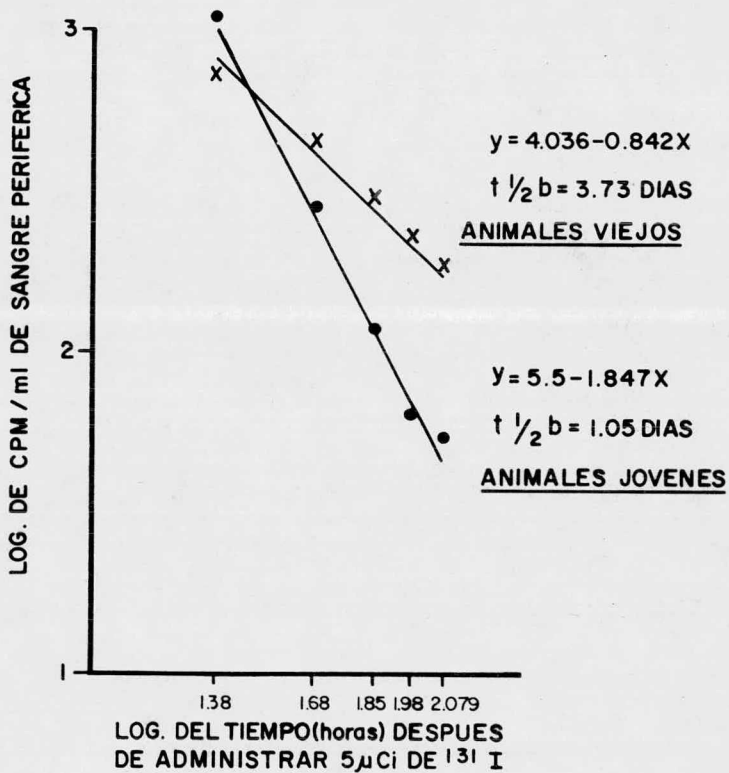


Figura 4: Comparación del decaimiento biológico del ^{131}I de dos grupos de ratas de diferentes edades y pesos.

c- el sexo: La comparación de los resultados para ambos sexos que se presentan en la tabla III demuestran que no hay diferencias en el metabolismo del ^{131}I en relación con el sexo y las dosis aquí estudiadas.

Doniach (35) ha reportado una mayor resistencia de las ratas hembras al efecto destructivo de las radiaciones del ^{131}I , pero sus observaciones son en un periodo mayor de un año, mientras que los resultados aquí presentados se refieren a experimentos que abarcan sólo unos días.

Lo que sí puede afirmarse es que bajo las condiciones aquí descritas no hay diferencias en la captación del isótopo por el tiroides, y que en la sangre periférica se observó sistemáticamente un mayor número de cpm, en la rata hembra que en la rata macho, siendo esta diferencia en algunas ocasiones de significancia estadística.

d- la cepa y dosis: Cuando se trabajaron las dos cepas de ratas disponibles en el laboratorio, se encontró que los animales de la cepa Sprague-Dawley, que eran los más jóvenes, tuvieron una menor captación que los de la Long-Evans, como puede apreciarse en la figura 5, en la que se comparan gráficamente las c.p.m. absolutas en tiroides y sangre periférica y además la captación en % para cada dosis y para cada cepa. En la sangre periférica las diferencias por cepas y dosis no varían significativamente.

Los resultados demuestran que ambas cepas siguen el mismo patrón de comportamiento en el manejo del ^{131}I , tanto en el tiroides como en sangre periférica.

Es importante hacer notar que el mayor porcentaje de captación en las dos cepas corresponde a la dosis de $2 \mu\text{Ci}$ y que a dosis mayores el porcentaje de --

S E X O	SANGRE PERIFERICA (cpm/ml)	TIROIDES (cpm)
hembras	1014	310528
machos	944	301528

Tabla III.- Comparación de la radioactividad presente en la sangre y en el tiroides en ratas de diferente sexo.

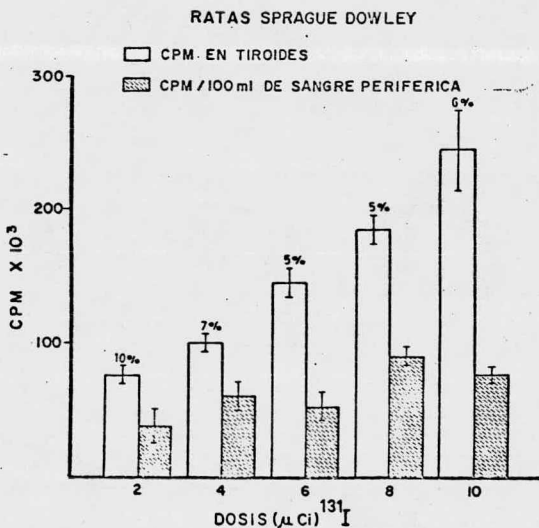
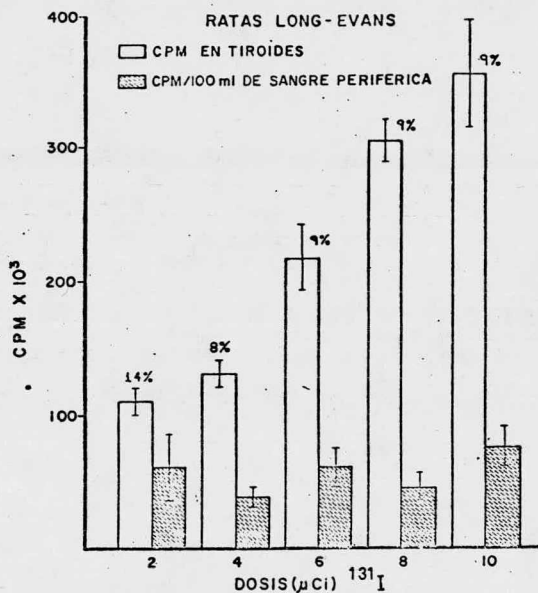


Figura 5: Comparación del manejo del ¹³¹I entre la cepa Long-Evans y Sprague-Dawley.

Las líneas verticales representan el error estándar de cada grupo.

captación disminuye y se mantiene más o menos estable, sin aumentar con el correspondiente aumento de la cantidad de isótopo administrado.

Todo esto sugiere que en relación a las dosis deberá completarse el estudio con un análisis del porcentaje a dosis menores de 2 μCi y mayores de 10 μCi hasta observar la saturación completa del tiroides, la que probablemente sea precedida de las manifestaciones del daño tisular, de la que se habló en el correspondiente inciso.

e- la temperatura ambiente: El breve mantenimiento de las ratas durante 2 horas a 14°C, antes de la toma de la muestra, provocó un aumento de la radioactividad en la sangre periférica como se observa en la tabla IV.

Además, se observó que durante el periodo que los animales estuvieron sometidos a cambios amplios de temperatura, los niveles de radioactividad en sangre periférica, fueron más variables que la de los animales mantenidos en condiciones de temperatura constante y con la misma dosis de isótopo.

El aumento observado debe atribuirse al efecto que el frío produce sobre el eje hipotálamo-hipófisis-tiroides (2), el que responde con un aumento de los niveles de hormonas tiroideas circulantes, como consecuencia de un aumento de la TSH endógena. Este aumento de la hormona estimulante del tiroides bajo la acción del frío, ya fue informado por Ohtake (37), quien encontró la máxima elevación a los 25 minutos de iniciada la exposición al frío.

Todo lo anterior permite concluir que las ratas en las que se realizan bioensayos basados en la función tiroidea, deben mantenerse a temperatura constante.

f- la dieta: La utilización de dos dietas con diferente valor nutritivo y contenido de I, permitió saber que cuando la dieta es nutricionalmente adecua

GRUPO	TEMPERATURA °C	SANGRE PERIFERICA c.p.m./ml
1	14	795
2	22	406

Tabla IV.- Efecto del cambio brusco de temperatura -
sobre la radioactividad sanguínea.

da (dieta 2), mejora la capacidad de captación del tiroides (tabla V). Con esta dieta que tiene aproximadamente el mismo valor nutritivo que la de Remington citada por McKenzie (38), los animales continuaron su crecimiento normal con el correspondiente aumento de peso, mientras que los que recibieron la - dieta 1, presentaron un peso significativamente menor al alcanzado por los -- animales alimentados con la dieta de Purina de Lab. Chow.

Como no se pudo obtener la información con respecto al contenido de I en el maíz y del caseinato de calcio, la mejoría de la captación del isótopo por el - tiroides con la dieta 2, no se puede atribuir en el presente caso a una mayor avidez del tiroides por el yodo marcado después de 10 días de dicha dieta.

La necesidad de administrar una dieta pobre en yodo es que existen evidencias (39) de que cuando se prepara al animal en esta forma hay un aumento en la - incorporación del isótopo al tiroides con un aumento en la actividad específica de las hormonas almacenadas, lo que mejora la sensibilidad a los estímulos hormonales hipofisarios (26).

Aunque algunos autores (21) demuestran que puede omitirse la dieta de pretratamiento, nosotros creemos que su empleo puede evitar el uso de una dosis mayor de isótopo para obtener una misma incorporación al tiroides.

g- el efecto inhibitor del extracto tiroideo: La capacidad inhibitoria del extracto tiroideo oral sobre la secreción endógena de TSH se estimó por sus efectos sobre la captación y liberación del ¹³¹ I, puesto que ambas acciones son mediadas fundamentalmente por la acción de dicha hormona a nivel del tiroides (21).

Los resultados del primer experimento se muestran en la figura 6, en la que -

TRATAMIENTO	TIEMPO (DIAS) ANTES DE ^{131}I	% DE CAPTACION A LAS 72 HORAS	
		CONTROL	TRATADO
Dieta I	14	14	23
Dieta II	10	19	33

Tabla V.- Efectos de la dieta sobre la captación del ^{131}I por el tiroides.

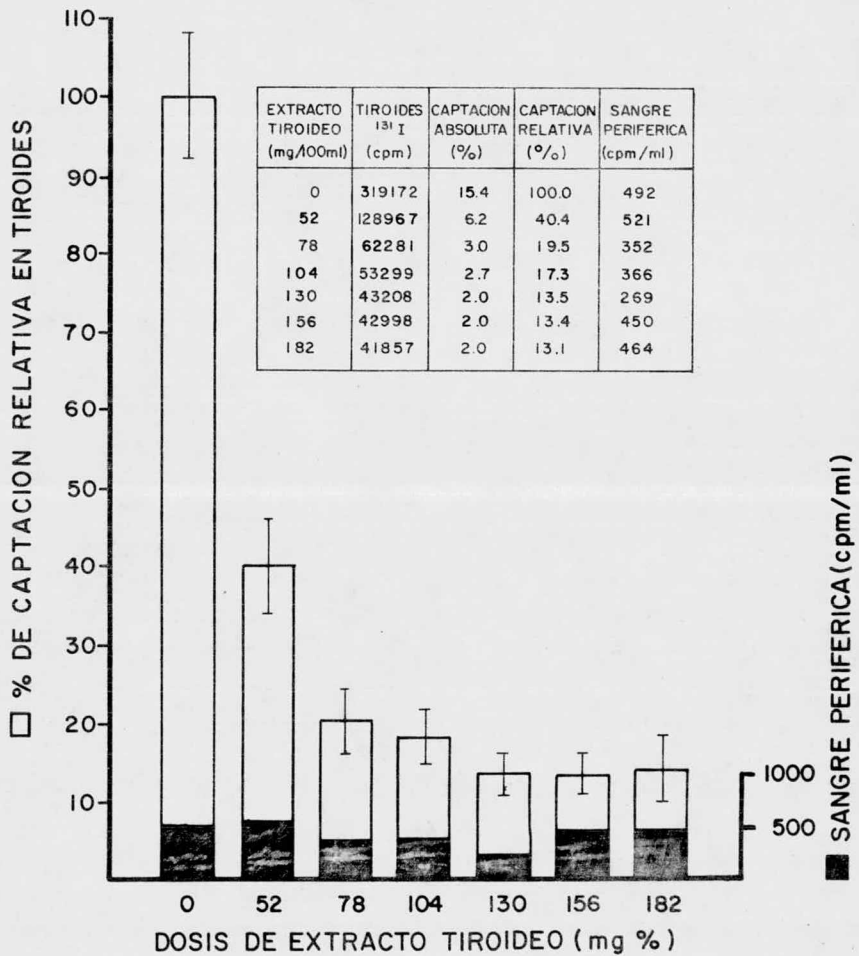


Figura 6: Efecto inhibitor del extracto tiroideo bovino administrado 72 horas antes del ¹³¹I.

Las líneas verticales representan el error estándar en cada grupo.

puede observarse que tanto en la captación absoluta como en la relativa, hay una progresiva disminución que alcanza su mínimo valor de 2% en la absoluta y del 13% en la relativa con 130 mg/100 ml de agua, después de lo cual la captación se estabiliza. Concomitantemente, hay una tendencia de disminución en la radioactividad sanguínea, que también se estabiliza o aún aumenta después de los 130 mg de extracto tiroideo.

En el segundo experimento, en el que la administración del ^{131}I y el extracto tiroideo en las dosis más altas antes usadas, se hizo simultáneamente, las observaciones finales se realizaron a las 48 horas y se encontró que tanto en tiroides como en sangre periférica la disminución de la radioactividad fue progresiva, lo que puede observarse en los datos de la tabla VI. De los resultados anteriores se deduce que las dosis mayores de 130 mg de extracto tiroideo por 100 ml de agua son suficientes para inhibir tanto la captación como la liberación del ^{131}I en el tiroides, lo que es el resultado de la inhibición de la TSH endógena. Se supone que esta situación del tiroides permitirá hacer mas aparente el efecto de la TSH exógena.

Los bioensayos de TSH que en su mayor parte se han realizado en ratón, comprenden el uso de hormonas tiroideas como inhibidores de TSH andógena, tales como l-tiroxina por vía parenteral (21); T_4 en el agua de beber (40); T_4 por vía parenteral (41) y T_3 por la misma vía (26).

McKenzie (20) utilizó el extracto tiroideo sólo en forma complementaria a la administración de 10 μg de l-tiroxina a ratones y demostró que la inhibición se mantenía durante cuatro días.

Aparentemente, de la información que se tuvo disponible, nadie antes ha uti-

EXTRACTO TIROIDEO (mg/100 ml)	TIROIDES (cpm)	SANGRE (cpm/ml)
0	298432	774
130	289854	411
156	270110	239
182	245618	169

Tabla VI.- Efecto inhibidor del extracto tiroideo bovino administrado simultáneamente con el ^{131}I y mantenido durante 48 horas.

lizado sólo extracto tiroideo como inhibidor.

Nuestros resultados demuestran que el extracto tiroideo es útil para inhibir la función tiroidea, probablemente mediante la inhibición de la TSH y la competencia a nivel del tiroides con el yodo radioactivo.

De los resultados de otros experimentos, que se correlacionaron con los aquí reportados se pudo concluir que el efecto inhibitorio del extracto tiroideo tiene una duración máxima de cuatro días y que está presente a los dos días de iniciada su administración, que fue el tiempo mínimo estudiado.

3- Los efectos de TSH en relación con:

a- el tiempo: La respuesta a la administración de 0.2 mU/rata del estándar bovino NIH-TSH-B6 se observa claramente en la figura 7, en la que el porcentaje máximo de respuesta se obtiene a las tres horas.

La técnica original de McKenzie (20) en ratón da la respuesta máxima a las dos horas, tiempo que otros han confirmado (26,42,43), mientras que Good y Stenhouse (22) reportan tres horas.

En otros experimentos no reportados aquí, se observó que la respuesta máxima podía ser menor de tres horas, de tal modo que para fines prácticos se puede decir que la máxima respuesta en la rata L.E. se presenta entre las dos y -- tres horas después de administrado el estímulo.

b- las dosis: En la figura 8 se presenta la relación lineal entre las diferentes dosis administradas del extracto hipofisario humano y la respuesta en porcentaje de aumento sobre el nivel inicial a las tres horas.

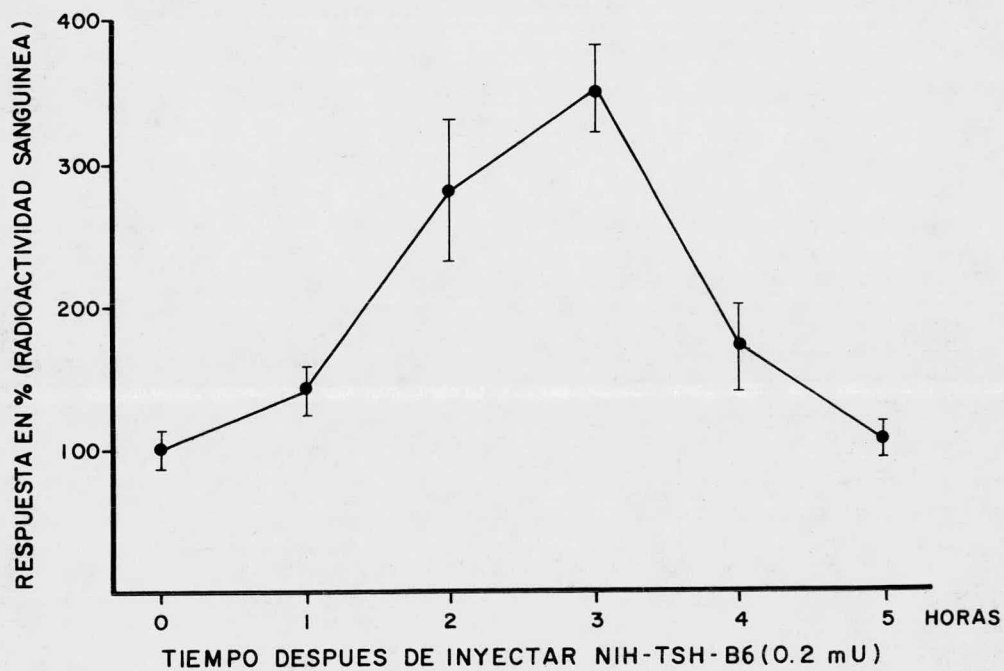


Figura 7: Relación del % de respuesta a una sola dosis de TSH bovina con el tiempo.

Las barras verticales representan el error estándar en cada grupo.

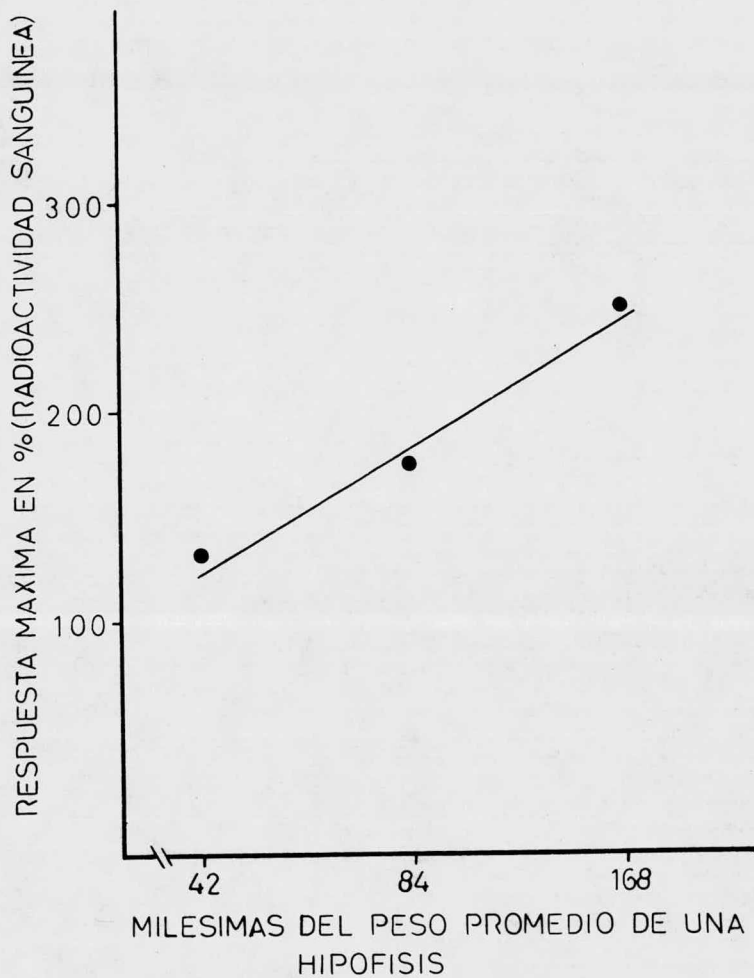


Figura 8: Relación lineal de las dosis del extracto hipofisario humano y las respuestas expresadas en porcentaje.

Si se toma en cuenta que el contenido de TSH de una hipófisis humana se ha reportado entre 10 a 1000 mU (44), las dosis aquí aplicadas pueden variar desde 2, 4 y 8 mU hasta 2, 4 y 8 U.

Desafortunadamente no se trabajó simultáneamente con un estandar como debe hacerse en un bioensayo cuando se quiere conocer la potencia de una muestra desconocida (14,45,46). Sin embargo, queda demostrada la respuesta lineal proporcional a la amplitud de las dosis utilizadas que era el fundamental propósito de este experimento.

Debe hacerse notar que no se encontraron datos en la literatura con respecto al efecto de las dosis de TSH humana en la rata.

En otro experimento se aplicaron dosis de 348, 696 y 2200 μ U del estándar hTSH (Pierce), que en el laboratorio se usa para la obtención de hTSH marcada necesaria en la técnica del radioinmunoanálisis de TSH. No se obtuvo respuesta ni en el tiroides, ni en la sangre periférica, lo que demuestra que dicho estándar sólo mantiene su actividad inmunológica.

La magnitud de la respuesta a la TSH de rata, que se obtuvo tanto por el procedimiento modificado de Bakke and Lawrence (47) que se describió en Métodos, como por el sobrenadante del homogenado de las hipófisis de rata en solución salina, abarcó una amplitud de 150 a 300% a las tres horas de aplicado el estímulo, este estímulo fue el equivalente al contenido de TSH en media hipófisis de rata, la cual contenía a su vez 50 μ g de proteína.

La curva de respuesta a las dosis de McKenzie (20) en ratón, abarca desde 50 hasta 450 μ U de TSH bovina (USP), mientras que Good y Stenhouse (22) reportan desde 50 a 800 μ U del estándar internacional de TSH de origen bovino.

La amplitud de respuesta de la rata a la acción de la TSH estándar humana no se estudió en el presente trabajo, lo que deberá hacerse cuando la técnica - sea estandarizada.

c- el sexo: La diferencia de la respuesta entre ambos sexos se presenta en la tabla VII. Es claro que la máxima respuesta que en ambos casos se observa a las tres horas, es menor en las hembras que en los machos, lo que también es cierto para los otros tiempos.

Aunque la respuesta expresada en porciento de aumento es mayor en los machos, debe aclararse que sistemáticamente las hembras tuvieron una mayor radioactividad en sangre que ellos, tanto en este experimento, como en otros no reportados aquí.

Estas observaciones tienen un parcial apoyo en las de Rapp (48) que encontró un mayor contenido de TSH y T_4 en el plasma de los machos que en el de las - hembras.

Además, debe recordarse que la relación de los estrógenos con la función hipofisaria y en particular con la secreción y efectos de la TSH se conoce y se - estudia desde hace mucho tiempo (49), sin que haya un acuerdo general sobre el tópico, hoy día.

En general, estos resultados apoyan lo ya señalado por otros autores: que hay diferencias en la respuesta a TSH entre los dos sexos.

c- vía de administración: La comparación de las respuestas en sangre perifé-



S E X O	No. DE ANIMALES	^{131}I μCi	CONTROL %	% DE AUMENTO		
				1	3	5
Hembras	10	19	100	181	382	281
Machos	10	10	100	171	203	158

Tabla VII.- Comparación de la respuesta a la TSH del extracto hipofisiario humano en los dos sexos.

rica al extracto hipofisario relacionado al tiempo y a las dos vías de administración, se presentan gráficamente en la figura 9, la que demuestra claramente la mayor efectividad de la vía intraperitoneal.

En un experimento similar, en el que las ratas recibieron un extracto hipofisario de su propia cepa, la vía s.c. fue mejor que la i.p. con la máxima respuesta también entre 2 y 3 horas.

Algunos experimentos colaterales demostraron que ocasionalmente, la vía intravenosa dió resultados parecidos a los que se obtenían con la vía intraperitoneal.

Puesto que todos los autores (20, 21, 22, 40, 42, 43) utilizan la vía i.v. para aplicar la TSH, nuestros resultados demuestran que una alternativa cuando hay dificultades con dicha vía, es emplear la vía intraperitoneal. Aunque no tan directa como la vía intravenosa, la i.p. demuestra ser efectiva, lo que se explica por la gran superficie de absorción que es el peritoneo.

No se tiene una explicación para la mejor respuesta de la vía s.c. que la i.p. en el caso del extracto hipofisario de rata.

d- la especie: Como era de esperarse, ni el estándar de Pierce, ni el suero humano normal, ni el agua destilada fueron estímulos efectivos para aumentar la radioactividad circulante del tiempo cero. El primero, porque como ya se vió en experimentos anteriores en rata, no tiene actividad biológica; el segundo, porque la prueba carece de la sensibilidad suficiente para detectar los niveles de TSH normales en sangre; finalmente el agua solo puede considerarse como un control.

En cambio el extracto hipofisario humano produjo una respuesta de 204% sobre el nivel inicial.

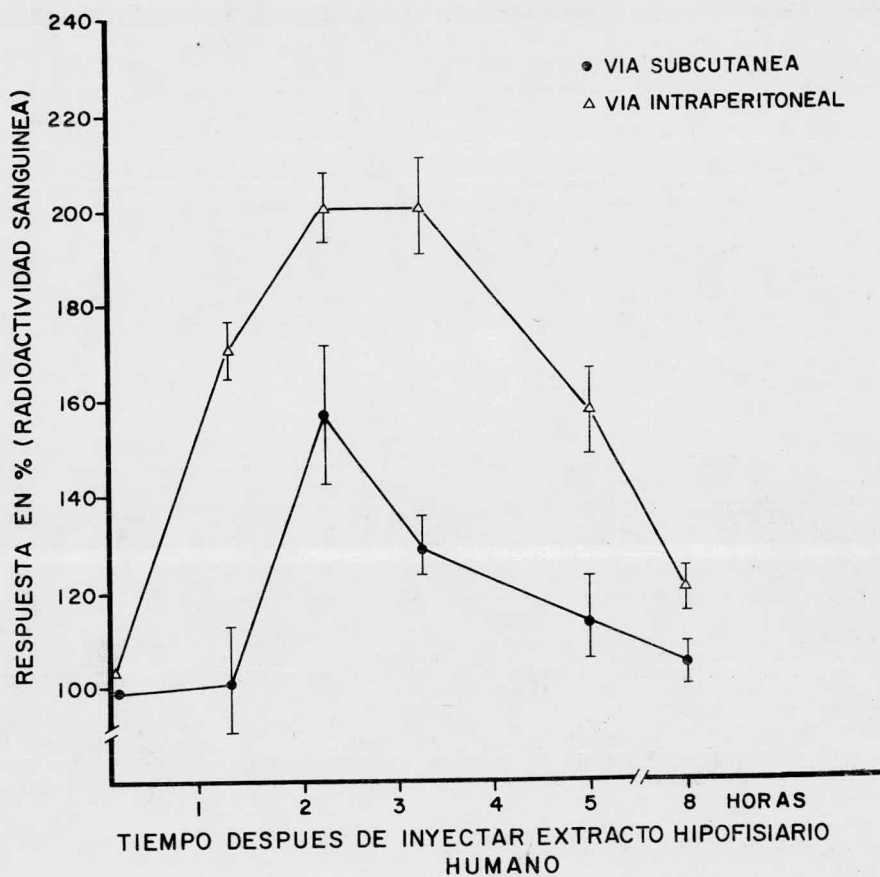


Figura 9: Efectos de la vía de administración sobre la respuesta observada en sangre periférica a diferentes tiempos.

Las líneas verticales representan el error estándar de cada grupo.

A pesar de la diferencia de especie y de que las condiciones del experimento no fueron las mismas que se utilizaron en la rata, los resultados en ratón caen dentro de la amplitud del intervalo de respuesta que se obtuvo en la rata (150 a 300%).

Estos resultados son similares a los de McKenzie (20) a pesar de que las dosis no son comparables, porque en nuestro caso no hay una cuantificación exacta del extracto hipofisario.

Una diferencia con las observaciones de McKenzie (20) y otros autores (26, 42, 43) es que aquí, la máxima respuesta se obtuvo a las 3.5 horas, lo que se acerca más al resultado de Good y Stenhouse (22), que fue de tres horas. La respuesta retardada en nuestro caso puede tener explicación por la diferente vía de administración empleada.

El propósito fundamental de este trabajo fue estudiar las variables que afectan la captación y liberación del yodo marcado en el tiroides de la rata Long-Evans, como paso previo a la estandarización de la técnica del bioensayo de TSH.

Aunque la mayor parte de los objetivos iniciales se alcanzaron, es evidente que algunos aspectos quedaron inconclusos:

- 1- Para conocer el límite máximo de la dosis permisible para un bioensayo deberán estudiarse dosis más altas hasta encontrar aquella que en 48 a 96 horas produzca una disminuida captación en el tiroides y una brusca liberación de aumentada radioactividad en la sangre periférica.
- 2- Estudiar las dosis menores de 2 μ Ci que en nuestros resultados dieron el mas alto porcentaje de captación.

- 3- Repetir los experimentos con una dieta que se haya demostrado que realmente es pobre en yodo.
- 4- Deben estudiarse otros inhibidores de TSH endógena, tales como las hormonas tiroideas puras y las drogas antitiroideas.
- 5- Determinar la exactitud, la precisión, la sensibilidad y la especificidad de la técnica con un estandar calificado, de origen humano.
- 6- Aumentar el número de animales para cada grupo experimental, con el objeto de disminuir la variabilidad individual, que está fuera de control.

RESUMEN Y CONCLUSIONES

El presente trabajo es un estudio del metabolismo del ^{131}I en la rata Long-Evans, mediante la captación del isótopo por el tiroides y sus niveles en sangre periférica.

Con estos parámetros se estudiaron: las dosis del isótopo, las variables propias del animal, las ambientales y los efectos de las hormonas inhibitoras y estimulantes de la función tiroidea de la rata.

Los resultados demuestran que la rata Long-Evans es útil para el bioensayo de TSH, si se adoptan las siguientes condiciones: ratas de cualquier sexo, de 25 a 30 días de edad, mantenidas en condiciones constantes, con una dieta nutritiva y pobre en yodo durante una semana antes de la aplicación por vía intraperitoneal del ^{131}I , a dosis de 5 a 8 μCi por animal y con la administración oral simultánea de extracto tiroideo a la dosis de 130 mg/100 ml de agua potable. Dos a cuatro días después, aplicación por vía IV o IP de la TSH disuelta en un volumen máximo de 0.5 ml de solución salina isotónica. Obtención de la sangre periférica en el tiempo cero y después de tres horas de aplicado el estímulo, por punción del área retroorbital mediante un tubo capilar, previamente heparinizado, manteniendo los animales bajo discreta anestesia con éter. Sacrificio del animal para extirpar el tiroides.

Conteo del tubo capilar y del tiroides previamente lavado para eliminar la radioactividad contaminante.

Calcular las respuestas en porciento de aumento del número de cpm sobre las del tiempo cero.

Quedan indicadas las recomendaciones para afinar las condiciones en que debe realizarse la técnica antes de ser estandarizada, para poder aplicarla adecuadamente a la determinación de las actividades biológicas de los productos purificados de la hipófisis, que se manejan en el laboratorio.

REFERENCIAS

- 1- Malacara J.M., García V.M., Valverde R.C.: Hipotalamo-Hipofisis, capítulos 1 y 2 en Fundamentos de Endocrinología Clínica. La Prensa Médica Mexicana 1977.
- 2- Williams R.H.: Textbook of Endocrinology, Philadelphia, W. B. Saunders 4th edition, 1968.
- 3- Turner C.D.: General Endocrinology, 4a Edition, Philadelphia, W.B. Saunders Co., 1966.
- 4- Orgiazzi J.: Mecanisme D'Action de la TSH. Lyon Medical 235:217-227 (1976).
- 5- Pierce J.G., Liao T., Howard S.M., Shome B., Cornell J.S.: Studies on the structure of thyrotropin: its relationship to luteinizing hormone. Recent Progr. Hormone Res. 27:165-212, 1971.
- 6- Sairam M.R., Hao Li Choh: Human Pituitary Thyrotropin: primary structure of the hormone specific β subunit. Biochem. and Biophys. research comm. 54:426-431 (1973).
- 7- Sairam M.R., Hao Li Choh: Human Pituitary Thyrotropin isolation and chemical characterization of its subunits. Biochem. and Biophys. res. comm. 51:336-342 (1973).
- 8- Sairam M.R., Hao Li Choh: Human pituitary thyrotropin. Isolation and characterization of the hormone and its subunits. Can. J. Biochem. 55:747-754 (1977)
- 9- Shome B., Parlow A.F., Ramírez V.D., Elrick H., Pierce J.G.: Human and porcine thyrotropins: a comparison of electrophoresis and immunological properties with the bovine hormone. Archs. Biochem. Biophys. 126:444-455 (1968a).
- 10- Pierce J.G.: Chemistry of thyroid stimulating hormone in handbook of physiology section 7: Endocrinology Vol. IV, part 2. Chapter 24, page 79-101. Ed. Amer. Physiol. Soc., 1974.
- 11- Yalow R.S., Berson S.A. (1968) in Growth Hormone, p. 60. International Congress serie No. 158 Ed. Pecile, A. y Muller, E.E. Amsterdam: Excerpta Medica Foundation.
- 12- Berson S.A., Yallow R.S.: Immunologic specificity of peptide hormones in Structure-Activity relationships of protein and polipeptide hormones page 38-47. Ed. Excerpta Medica 1972.
- 13- Adams D.D., Kennedy T.H., Utiger R.D.: Comparison of Bioassay and Immunoassay of Serum Thyrotropin (TSH) and Study of TSH levels by immunoassay of Serum Concentrates. J Clin Endocrinol Metab 34:1074-1079 (1972).
- 14- Finney D.J.: The Structure of a biological assay. In Statistical Methods in biological assay. Chapter 1 page 5. Second Edition 1971. Ed. Griffin London.
- 15- Evans H.M., Simpson M.E., Marx W. and Kibrick E.: Bioassay of the pituitary growth hormone, with of the proximal epiphysial cartilage of the tibia in hypophysectomized rats. Endocrinology 32, 13-16 (1943).

Referencias

- 16- Steelman S.L., Pohley F.M.: Assay of the Follicle Stimulating Hormone based on the augmentation with human chorionic gonadotropin. *Endocrinology* 53, 604-616 (1953).
- 17- Breneman W.R.: Bioassay of thyrotropin in chicks with simultaneous estimation of gonadotropin. *General and comparative Endocrinology* 20:41-52 (1973).
- 18- Bates R.W., Condliffe P.G.: Studies on the Chemistry and Bioassay of Thyrotropins from Bovine Pituitaries Transplantable Pituitary Tumors of Mice, *rad Blood Plasma*. *Recent Prog. Horm. Res.* 16:309-352 (1960).
- 19- Loraine John A., Trevor Bell E.: Thyroid-Stimulating Hormone. Chapter IV, pag 136-160 in *Hormone Assays and Their Clinical Application*, Third Edition. E. and S. Livingstone Edinburgh and London 1971.
- 20- McKenzie J.M.: The Bioassay of thyrotropin in Serum. *Endocrinology* 63:372-382 (1958).
- 21- Rerup C., Melander A.: On the bioassay of thyrotrophin in plasma. *Acta Endocrinológica* 50, 177 (1965).
- 22- Good B.F., Stenhouse S.: An improved Bio-assay for TSH by modification of the Method of McKenzie. *Endocrinology* 78:429-439 (1966).
- 23- Sakiz Edvart, Guillemin Roger: On a method for calculation and analysis of results in the McKenzie assay for thyrotropin (TSH). *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 115:856-860, 1964.
- 24- Levy Richard P., McGuire William L., et al: Effect of species differences of mice on the Bio-assay of thyrotropin. *Endocrinology* 76:890-894, 1965.
- 25- Becktel J.M.: Comparison of ratio and covariance analyses of TSH assays. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 124, 999 (1967).
- 26- Nutt J., Humphreys K., Clark T.: A modified bioassay for thyroid-stimulating hormone and Long-Acting thyroid stimulator. *J. Endocr.* 63:5-12 (1974).
- 27- Tate Ramon L., JoAnn M. Holmes, Leonard D.Kohn: Characteristics of a solubilized thyrotropin receptor from bovine thyroid membranes. *Journal of Biological Chemistry* 250:6527-6533, 1975.
- 28- Grollman Evelyn F., Lee George et al: Effects of thyrotropin on the thyroid cell membrane: hyperpolarization induced by hormone-receptor interaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 74, No. 6, pp. 2352-2356, June 1977. *Biochemistry*.
- 29- Fenzi G., Hashizume K.: Thyroglobulin interference in binding of TSH to receptors. Thyroid study unit, University of Chicago. (Abstract). 59th. Annual Meet. *Endocr. Soc.* June 8-10, 1977.
- 30- Lamberg B.A.: Radiactive phosphorus as indicator in a chick assay of TSH. *Acta Med. Scand.* 145, suppl. 279 (1953).

Referencias

- 31- 26th Report of the Expert Committee on Biological Standardization. World Health Organization. December 1974.
- 32- Reichert Leo E. Jr.: On the relationship between human thyrotrophin research Standard A, the United States Pharmacopeia Thyrotrophin Standard (Bovine) and the international Standard for thyrotrophin (bovine). *J. Clin. Endocr.* 31:331, 1970.
- 33- Segel Irwin H.: *Isotopes in Biochemistry*. Chapter 6 page 354-396. *Biochemical Calculations*. 2nd Edition 1976. Ed. John Wiley and Sons, Inc. New York.
- 34- Snedecor George W. y Cochran William G.: Muestreo de una población distribuida normalmente, Capítulo 2, pag 53-93, en *Métodos Estadísticos*. Ed. CECSA 1977.
- 35- Doniach I., Shale D.J.: Biological effects of ¹³¹I and ¹²⁵I isotopes of iodine in the rat. *J. Endocr.* 71, 109-114 (1976).
- 36- Wilansky D.L., Newsham L.G.S. et al: The influence of senescence on thyroid function. Functional changes evaluated with I-131. *Endocrinology* 61:327-336 (1957).
- 37- Ohtake M., G.A. Bray: Effects of ether and pentobarbital anesthesia on thyroid function in the rat. *Horm. Metab. Research* 9, 146-149 (1977).
- 38- McKenzie J.M.: The Long-Acting Thyroid Stimulator in Grave's Disease. *Recent Progr. Horm. Res.* 23:1-46 (1967).
- 39- McKenzie J.M. y Williamson A.: Experience with the bioassay of the long-acting thyroid stimulator. *J. Clin. Endocr. Metab.* 26, 518-526 (1966).
- 40- Florsheim W.H., Williams A.D. Schönbaum E.: On the mechanism of the McKenzie bioassay. *Endocrinology* 87, 881-888, 1970.
- 41- Sharard A., Purves H.D. Cague W.S.: Effect of pretreatment of mice with varying doses of thyroxine in the assay for LATS and TSH. *Proc. University of Otago Medical School.* 48, 77-78, 1970.
- 42- Keriner J.G., Jerone M., Hershman H., Patrick Higgins: The thyrotrophin in hydatidiform moles is human chorionic gonadotropin. *J. Clin. Endocr. and Metab.* 40:482-491 (1975).
- 43- Nisula B.C., Kohler P.O. et al: Neutralization of human thyrotrophin by antisera to subunits of glycoprotein hormones. *Journal of Clinical Endocrinology* 37:664-669 (1973).
- 44- Bakke J.L., Lawrence N., Ray S.J.: Disappearance rate of exogenous thyroid-stimulating hormone (TSH) in man. *J. Clin. Endocr. and Metab.* 22:352 (1962).
- 45- Borth R.: Simplified mathematics for multiple bioassays. *Acta Endocrinológica* 35:454-468, 1960.
- 46- Bliss C.I.: Confidence limits for measuring the precision of Bioassays. *Biometrics* 491-526, Dic. 1976.

Referencias

- 47- Bakke J.L., Lawrence Nancy et al: The fractionation of exogenous and endogenous thyroid stimulating hormone from human and rat plasma and tissues. *J. Clin. Endocr. Metab.* 21:1280-1289 (1961).
- 48- Rapp J.P. y Lee Pyun L. (1974). A sex difference in plasma thyroxine and thyroid stimulating hormone in rats. *Proceedings of the society for Experimental Biology and Medicine* 146, 1021-1023.
- 49- Florsheim W.H.: Control of thyrotrophin secretion, in *Handbook of physiology section 7: Endocrinology*. Vol. IV part 2. Chapter 38, page 449-467, Ed. R.O. Greep and E.B. Astwood. *Amer. Physiol. Soc.* 1974.