

00361 5
2je



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

TRIYODOTIRONINA REVERSA (γ T3) EN LA TRUCHA
ARCOIRIS Y SU POSIBLE FUENTE DE ORIGEN

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE
MAESTRA EN CIENCIAS
(B I O L O G I A)

P R E S E N T A
BERTHA FENTON NAVARRO

DIRECTOR DE TESIS:
DR. CARLOS MANUEL VALVERDE RODRIGUEZ

MEXICO, D. F.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1984



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 está 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.

La presente tesis se realizó en el Centro de Neurobiología de la UNAM, bajo la dirección del Dr. Carlos Manuel Valverde Rodríguez.
Parcialmente apoyado por PAPIID/GAPA:
IN 293492

AGRADECIMIENTOS

- A cada uno de los sinodales ya que con sus comentarios y críticas se logro una mejor presentación de la tesis:

- - Dr. Carlos Manuel Valverde Rodríguez.
- - Dra Alejandra Malnero del Paso.
- - Dr. Carlos Arámburo de la Hoz.
- - Dr. Roberto Domínguez Casalá.
- - Dra. María Teresa Morales.
- - Dr. Luis Medrano Gonzalez.
- - M. en C. María Teresa Castrejón Osorio.

En especial deseo hacer patente mi agradecimiento al Dr. Carlos Valverde-R. quien además de ser un excelente maestro tiene una excelente calidad humana. Gracias Dr. por la dirección de esta tesis, en los años que tengo de conocerlo siempre me ha tratado con cordialidad, me ha brindado su apoyo, su confianza y ha manifestado su interés en mi formación. Gracias por todo puesto que no solo he mejorado como estudiante sino también como persona.

A la Dra. Carmen Aceves por el excelente asesoramiento de la tesis. Gracias Tana por tus comentarios, tus críticas y por tu amistad que siempre me has brindado.

Al Dr. Carlos Arámburo quien ha sido muy importante en mi formación. Gracias por tu apoyo.

Al Dr. Roberto Arreguín E. y a la M. en C. Alicia Durán G. ya que con sus comentarios y críticas se mejoró la presentación de éste trabajo.

Al Dr. Víctor Fenton y al Dr. Luis Medrano por la asesoría en los análisis estadísticos.

A la M. en C. Brenda Angulano gracias por tu apoyo, ayuda y amistad.

A la M. en C. Luz Navarro y a la Pasante de Doctorado Maricela Luna por su ayuda y amistad.

A mis compañeros del laboratorio por su apoyo y a la Sra. Raquel Reyes por su invaluable ayuda.

Al Sr. José Aviles G. y al Sr. Rafael Avila por la realización de fotos, transparencias y figuras.

A todos mis amigos por su apoyo, comprensión y amistad.

A mis queridos padres, a quien les debo lo que soy, por brindarme en todo momento su apoyo, comprensión y cariño.

A Patricia, Héctor e hijos, a Víctor y Astrid por su cariño y apoyo de siempre.

A todos mis amigos quienes en todo momento me han brindado su apoyo y comprensión.

INDICE

Resumen

I INTRODUCCION

1.-La Glándula Tiroidea en los Homeotermos	1
1.1 Metabolismo del Yodo, Síntesis y Secreción de Hormonas Tiroideas (HTs)	2
1.2 Transporte de HTs en la sangre	5
1.3 Captura de HTs por órganos blanco	6
1.4 Metabolismo periférico de las Hormonas Tiroideas	6
1.5 Desyodación Extratiroidea de las HTs	8
Vía de Activación	9
5'D-I	
5'D-II	
Vía de Inactivación	11
Actividad 5D en placenta y tejidos embrionarios	11
Actividad 5D en la piel de la rata	12
1.6 Acciones y Efectos de las HTs	14
Membrana Plasmática y Mitocondrial	14
Acciones Genómicas de las HTs	15
Respiración Celular y otras Acciones Metabólicas	16
Desarrollo y Diferenciación Neuronal	17

II

2.-Fisiología Tiroidea en los Peces

2.1.- Glándula Tiroidea	18
2.2.- Aspectos Ontogenéticos	19
2.3.- Aspectos Funcionales	21
Efectos en el Sistema Nervioso	21
Influencia de las HTs en la Reproducción	21
Movimientos Migratorios y Osmorregulación	22
Fotoperíodo	23
Efectos Calorigénicos	23
Crecimiento	24
Dieta y Temperatura	24
Efectos en la Piel	25
2.4.- Actividad Desyodativa en Peces	25
Actividad 5'D	26
Actividad 5D	27
Actividad Enzimática, Temperatura y Adaptación	29

III

Planteamiento del problema	32
----------------------------	----

IV

OBJETIVOS	32
-----------	----

V

MATERIAL Y METODOS	33
--------------------	----

VI	
RESULTADOS	40
VII	
DISCUSION	66
VIII	
CONCLUSIONES	72
IX	
BIBLIOGRAFIA	73
X	
APENDICES	
Apéndice I Radioinmunoanálisis	82
Apéndice II Cromatografías	84
Apéndice III Truicultura y Ciclo de Vida	86

INDICE DE FIGURAS.

FIGURA 1	Folículo Tiroideo	5
FIGURA 2	Principales Rutas Metabólicas de las Tironinas	7
FIGURA 3	Desyodación Extratiroidea de la T4	8
FIGURA 4	Desyodación de Tironinas. Mecanismos de Reacción.	10
FIGURA 5	Diagrama Esquemático de los Posibles Sitios de Acción en la Mitocondria	18
FIGURA 6	Distribución de los Folículos Tiroideos en los Teleosteos	18
FIGURA 7	Técnicas Empleadas para la Cuantificación de la Actividad 5D-III	38
FIGURA 8	Curva Patrón	43
FIGURA 9	Reactividad Cruzada	43
FIGURA 10	Concentración de Proteína y Actividad 5D-III en la Piel de la Trucha Arcoiris	45
FIGURA 11	Efecto del pH sobre la Actividad 5D-III en la Piel de la Trucha Arcoiris	45
FIGURA 12	Influencia del Cofactor (DTT) sobre la Actividad 5D-III en la Piel de la Trucha Arcoiris	48
FIGURA 13	Efecto del PTU sobre la actividad 5D-III en la Piel de la Trucha Arcoiris	47
FIGURA 14	Efecto del PTU sobre la actividad 5D-III en la piel de Trucha y de Rata	47
FIGURA 15	Efecto del Sustrato Preferencial (T3) en la Actividad 5D-III en la Piel de la Trucha Arcoiris	48
FIGURA 16	Efecto del Sustrato Secundario (T4) en la Actividad 5D-III en la Piel de la Trucha Arcoiris	48
FIGURA 17	Concentración de Sustrato y Actividad 5D-III en la Piel de la Trucha Arcoiris	49
FIGURA 18	Efecto de la Temperatura sobre la Actividad 5D-III en la Piel de la Trucha Arcoiris	49
FIGURA 19	Grafica de Linewaver-Burk para el Cofactor (DTT) de la enzima 5D-III de la Piel de la Trucha Arcoiris	51
FIGURA 20	Grafica de Linewaver-Burk para el Sustrato (T4) de la enzima 5D-III de la Piel de la Trucha Arcoiris	52
FIGURA 21	Grafica de Linewaver-Burk para el Cofactor (DTT) de la enzima 5D-III de la Piel de la Trucha Arcoiris	53
FIGURA 22	Grafica de Linewaver-Burk para el Sustrato (T4) de la enzima 5D-III de la Piel de la Trucha Arcoiris	54
FIGURA 23	Efecto de la Temperatura sobre la Actividad 5D-III en la Piel de Rata	55
FIGURA 24	Efecto del Cofactor (DTT) y Sustrato (T4) en la piel de la Rata	55
FIGURA 25	Efecto del Cofactor (DTT) y la Temperatura (°C) en la Placenta de Rata	57
FIGURA 26	Concentración de Sustrato y Actividad 5D-III en la Piel de la Rata	57
FIGURA 27	Efecto de la Concentración del Cofactor (DTT) y del Sustrato (T4) en la Actividad 5D-III en el Hígado de la Trucha Arcoiris	58
FIGURA 28	Efecto de la Concentración del Cofactor (DTT) y del Sustrato (T4) en la Actividad 5D-III en el Hígado de la Rata	58
FIGURA 29	Efecto de la Concentración del Cofactor (DTT) y del Sustrato (T4) en la Actividad 5D-III en la Placenta de Rata	59
FIGURA 30	Comparación de la Actividad 5D-III en Piel de Trucha Vs Piel y Placenta de Rata	59
FIGURA 31	Efecto del PTU sobre la Actividad 5D-III en Placenta de Rata	60
FIGURA 32	Perfil Temporal del Incremento Somatoponderal (Peso/Talla), los niveles Circulantes de rT3 (ng/ml) y de la Actividad 5D-III en la Trucha Arcoiris con respecto a la Edad (Semanas)	65
FIGURA 33	Ciclo de Vida y Reproducción Natural de la Trucha Arcoiris	88
FIGURA 34	Principal Alimento de la Trucha Arcoiris	89
FIGURA 38	Reproducción Artificial de la Trucha Arcoiris	90
FIGURA 36	Perfil de Crecimiento de Truchas del Centro Trutícola "El Zarco".	91

INDICE DE CUADROS

CUADRO 1	Proteínas Transportadoras de Tironinas en Vertebrados	6
CUADRO 2	Principales Características de las Desyodasas en los Mamíferos	13
CUADRO 3	Efectos Genómicos de las HTs	15
CUADRO 4	Constantes Cinéticas de la Actividad 5'D en Diferentes Tejidos de la Trucha Arcoiris	26
CUADRO 5	Reactivos y Volúmenes del Radioinmunoensayo (RIA).	34
CUADRO 6	Parámetros Obtenidos de la Curva Patrón.	40
CUADRO 7	Constantes Cinéticas de la 5D-III en la Piel de la Trucha Arcoiris.	50
CUADRO 8	Edad, Peso, Talla, Actividad Específica (A.E.) de la 5D-III en la Piel de la Trucha arcoiris y Concentraciones Circulantes de rT ₃	61
CUADRO 9	Matriz de Correlación de Pearson por pares para la Actividad Específica (A.E.), Edad Peso rT ₃ , Talla, Ln Talla y \sqrt{Talla}	63
CUADRO 10	Principales Parámetros de la Actividad 5D-III en la Piel de la Trucha. Comparación con la Piel y Placenta de Rata	68
CUADRO 11	Actividad 5D-III en la Piel de Rata. Comparación entre los resultados de la presente tesis con lo reportado en la literatura	69
CUADRO 12	Comparación de la Actividad 5D-III en el Hígado de la Trucha y de la Rata.	69
CUADRO 13	Constantes Cinéticas de la Actividad 5D III en la Rata y en la Trucha	70

ABREVIATURAS

μM	Micromolar
5'D-III	Desyodasa tipo III
5'D-I	Desyodasa tipo I
5'D-II	Desyodasa tipo II
aa	Aminoácidos
ADP	Difosfato de adenosina
Alb	Albúmina
AMP	Monofosfato de adenosina
ATP	Trifosfato de adenosina
BAT	Tejido adiposo café
cAMP	Adenilato cíclico
DIT	Diyodotirosina
DTT	Ditiotreitol
GH	Hormona de crecimiento
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrógeno
HTs	Hormonas Tiroideas
I	Yodo
I ⁻	Yoduro
IRD	Desyodación 5D del anillo interno
MIT	Monoyodotirosina
NAD	Dinucleótido de adenina y nicotinamida
NADPH	Fosfato del dinucleótido de adenina y nicotinamida.
ORD	Desyodación 5' del anillo externo
pH	$-\log [H^+]$
PostAlb	Postalbúmina
PTU	Propiltiouracilo
PyK	Piruvato-cinasa
RER	Retículo endoplásmico rugoso
rT ₃	Triyodotironina reversa
Se	Selenio
Se-cys	selenio cisteína
T ₁	Monoyodotironina
T ₂	Diyodotironina
T ₃	Triyodotironina

T4	Tiroxina
TBG	α -Globulina
TETRAC	Acido Tetrayodoacético
TgB	Tiroglobulina
THR _s	Receptores de las Tironinas
TPO	Tiroperoxidasa
TRE _s	Elementos de respuesta a tiroides
TRH	Tiroliberina (Hormona liberadora de la Tirotrópina)
TRIAC	Acido Triyodoacético
TSH	Tirotrópina (Hormona estimulante de la Tiroides)
TT	Transtiretina

Resumen

La fisiología de las hormonas tiroideas (HTs) ha sido ampliamente estudiada en los vertebrados. Aunque participan en la regulación de diferentes funciones y procesos del organismo, específicamente intervienen en la regulación de la oxidación de carbohidratos y grasas, así como en la síntesis de enzimas esenciales, y de proteínas estructurales y de exportación. Por esta razón, se considera que las HTs constituyen una parte fundamental en los procesos de balance (homeostásis/homeorresis) metabólico.

Desyodación de Tironinas. La glándula tiroides elabora y secreta el total de la prohormona tiroxina o T4 y solamente el 20-25% de la triyodotironina o T3, que es la principal tironina bioactiva. La T3 restante, así como el total de otras tironinas circulantes provienen de la desyodación periférica de la T4. La desyodación de las HTs es un proceso enzimático y órgano-específico en el cual, y dependiendo del anillo desyodado, se reconocen dos vías metabólicas. La vía de activación que a partir de T4 genera T3 y en la cual se desyoda el anillo externo (fenólico) de la molécula. Esta vía se conoce como la 5' desyodasa (5'D) y es catalizada por dos isoenzimas designadas 5'D-I y 5'D-II. En la otra vía, la de inactivación, la T4 es convertida a T3 reversa (rT3) y la T3 a T2. En esta vía, catalizada por la isoenzima tipo III, la desyodación ocurre en el anillo interno (tirosilo) y por ello se designa como 5D-III. Así, actualmente se reconoce que la desyodación órgano-específica de la T4 es uno de los principales procesos fisiológicos que determina la concentración intracelular de T3 activa o inactiva (rT3) a nivel de los diferentes órganos blanco.

En peces, específicamente en la trucha arcoíris, existe controversia con respecto a la presencia de rT3 y de la correspondiente vía desyodativa. Esto se debe a problemas metodológicos, esto es, para la cuantificación de tironinas se han empleado estuches comerciales diseñados para humanos. Este detalle metodológico es clave, puesto que se debe utilizar suero homólogo, ya que el empleo de suero heterólogo introduce una diferencia significativa en la cuantificación de HTs. Además se sabe que la proporción de las proteínas transportadoras de tironinas varía en los vertebrados, y que los peces carecen de TBG, por lo que es erróneo utilizar estuches para sueros que sí contienen a esta proteína.

Objetivos

1) Demostrar la existencia de la rT3 en el suero de la trucha arcoíris y estandarizar un Radioinmunoensayo (RIA) homólogo para su cuantificación; 2) Describir las características de la vía enzimática que produce a la rT3 (5D-III); 3) Medir las concentraciones y la actividad enzimática 5D-III durante la ontogenia de la trucha arcoíris.

Material y Métodos

Se estudiaron truchas arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) de 14 a 84 semanas de edad provenientes del centro acuícola "El Zarco". A intervalos de 28 ± 4 días se registró el peso y la talla de cada individuo y se obtuvo sangre de la vena caudal. La rT3 se cuantificó por RIA directo utilizando suero hipotiroideo homólogo en la curva patrón y 100 μ l de la muestra problema. El producto de la actividad 5D-III fue cuantificada por cromatografía descendente en papel y por RIA.

Resultados

La cuantificación de los niveles de rT3 en los sueros de truchas de edades de 14 a 84 semanas mostró que conforme aumenta la talla y el peso de los peces los valores de rT3 disminuyen progresivamente. Este perfil temporal de la tiroxina correlaciona significativamente y de manera inversa ($R= 0.85$, $R^2= 85.3\%$; E.E.=1.21) con el aumento de la masa corporal de los animales.

Los principales parámetros del ensayo para medir la actividad 5D-III en la piel de la trucha obtenidos de la caracterización enzimática son: Proteína: 0.4 mg/ml, DTT: 100 mmol/L, T3: 0.3 μ mol/L, T4: 0.8 μ mol/L, Temperatura: 15°C, Tiempo de incubación: 3h, pH: 7.0, PTU: sin efecto, Actividad específica: 6.48 ± 1.93 ng/mg proteína/h ($n=28$).

Las constantes cinéticas de Michaelis-Menten de la 5D-III en la piel de la trucha arcoiris son: Km 0.83 μ mol/L, y Vmax 9.25 pmol/mg/h.

Los resultados del estudio de la ontogenia muestran que la actividad 5D-III en la piel de la trucha arcoiris disminuyó de manera gradual y sostenida a lo largo de las 70 semanas que abarcó el estudio y que este descenso en la actividad enzimática se correlaciona de manera inversa y significativa con respecto al peso, la talla y la edad. Este hallazgo es congruente con la curva de desarrollo que exhiben las truchas y que se caracteriza por un crecimiento continuo, con el consecuente aumento de los requerimientos y gasto metabólico. Existe una clara relación de proporcionalidad entre la actividad enzimática y la concentración de la hormona. Lo anterior se comprobó con un análisis de regresión múltiple, con el que se obtuvo una R^2 de 0.995 con un valor de significancia de 0.009, esto es la edad, la talla y rT3 explican el 99.5% de la variación de la actividad específica.

Conclusiones

- 1.- Se estandarizó la técnica para la medición de la rT3 en el suero de la trucha arcoiris, y se cuantificó la rT3 en la ontogenia.
- 2.- Se estandarizó la medición de la actividad 5D-III en la piel de la trucha arcoiris.
- 3.-La principal fuente de rT3 en la trucha arcoiris es la piel.

4.- Las características del ensayo enzimático en comparación con el realizado con la piel de mamíferos (ratas) son :

- - Requiere de una mayor concentración de proteínas y de sustrato
- - Requiere de una menor concentración de cofactor (100 mmol/L DTT)
- - La temperatura óptima es de 15°C.
- - Produce una mayor concentración de producto (6.48 Vs 3.20 ng/mg prot/h).

5.- Durante la ontogenia se observó que la actividad específica de la 5D-III disminuye conforme aumenta la edad.

6.- Los Teleosteos presentan rT₃ y su vía desyodativa correspondiente (5D-III) y, como en el resto de los vertebrados (anfibios a mamíferos) las HTs constituyen una parte fundamental en los procesos de balance (homeostásis/homeorresis) metabólico.

1 INTRODUCCION

1 LA GLANDULA TIROIDES EN LOS HOMEOTERMOS

El conocimiento acerca de la función de la glándula tiroidea se ha generado principalmente a partir de los estudios hechos en mamíferos. Así, y no obstante que en esta tesis se utilizó como modelo a un salmónido, consideramos necesario revisar en una primera parte la fisiología de la glándula en mamíferos puesto que son los más estudiados y los mejor caracterizados.

El tejido tiroideo se encuentra presente en todos los protocordados y cordados. Desde el punto de vista filogenético, el antecedente funcional más antiguo es el endostilo, órgano que en los anfibios se encarga de capturar alimentos y cuyas células prototiroideas tienen la capacidad enzimática de oxidar al yodo (Ericson y Fredriksson, 1990). En los mamíferos, la tiroidea se origina de una evaginación del suelo de la faringe. En humanos los dos lóbulos de la glándula se encuentran conectados por un puente de tejido, el istmo tiroideo, y en ocasiones hay un lóbulo piramidal que se origina del istmo. La glándula está muy vascularizada y tiene una de las tasas más altas de flujo sanguíneo por gramo de tejido (aproximadamente del 4 a 8 ml/g/min, lo que representa el 2% del gasto cardíaco).

La tiroidea está constituida por múltiples folículos. Cada folículo esférico está rodeado por una monocapa de células foliculares o tirocitos y está lleno de un material proteínico llamado coloide en el cual la proteína mayoritaria es la tiroglobulina (TgB). Cuando la glándula está inactiva, el coloide es abundante, los folículos son grandes y los tirocitos aparecen aplanados. En cambio, cuando la glándula está activa, los folículos son pequeños, los tirocitos son cuboides o columnares su borde coloidal está festoneado formando pequeñas "lagunas de absorción", y su retículo endoplásmico es prominente. Los tirocitos descansan en una membrana basal que los separa de los capilares adyacentes cuyas células endoteliales están festoneadas a trechos formando soluciones de continuidad en sus paredes, como ocurre en la mayoría de los órganos endocrinos (Gangong, 1978; Dummont y colaboradores (y col) 1989, Ham, 1975).

1.1 METABOLISMO DEL YODO. SINTESIS Y SECRECION DE LAS HORMONAS TIROIDEAS (HTa)

Función y Control

La función tiroidea está regulada en 4 niveles: 1) cerebro-hipotálamo, 2) hipófisis, 3) tiroidea y 4) órganos efectoras (Larsen, y col, 1981; Engler y Burger 1984). Los tres primeros constituyen el clásico eje neuroendocrino hipotálamo-hipófisis-tiroidea. En el cerebro se integran diversos estímulos endógenos y exógenos, que dependiendo de la especie estimulan (frío, ciclo luz/oscuridad), o inhiben (ayuno) la función tiroidea. Estas señales nerviosas convergen a la región diencefálica denominada hipotálamo en donde se localizan las neuronas secretoras de la tiroliberina o TRH (hormona liberadora de tirotrópina). Estas neuronas TRHérgicas reciben aferencias tanto aminérgicas (nadrrenalina, serotonina) como peptidérgicas (endorfinas, encefalinas) y se localizan principalmente en los núcleos supraóptico y paraventricular del hipotálamo, así como en el borde anterior de la eminencia media (Dumont, J. 1971). Las neuronas secretoras de TRH liberan éste triptérido en los capilares fenestrados del sistema capilar primario (eminencia media) del circuito sanguíneo de circulación portal que comunica al hipotálamo con la glándula hipófisis. La acción de la TRH en los tirotrópos hipofisarios es muy rápida y está mediada por su unión a receptores de membrana específicos. Esta unión despolariza la membrana plasmática lo que permite la entrada de calcio al citosol activando así la cascada de Ca^{+} - fosfatidilinositol y la síntesis y la secreción de la hormona estimulante de la tiroidea o tirotrópina (TSH) (Deme, y col 1985). En las aves (pollo), la TRH también estimula la secreción de hormona de crecimiento y en el hombre y otros mamíferos la de prolactina. El significado funcional de éstos efectos secretagogos del triptérido sobre otras hormonas adenohipofisarias no se conoce aún (Demeester-Mirkine y Dummont 1980).

La TSH (hormona estimulante de la tiroidea) hipofisaria es una glucoproteína con actividad hormonal que pesa 28 kDa y está formada por dos cadenas polipeptídicas. La cadena α de la TSH comparte una similitud estructural del 80 al 90% con las correspondientes de las gonadotropinas hipofisarias (hormona folículo estimulante o FSH, y hormona luteinizante o LH), así como con la gonadotropina coriónica (CGH). La cadena β de la TSH, o en su caso cualquiera de las glucoproteínas hormonales, confiere a la molécula su especificidad funcional (Weintraub, y col 1985). La TSH por medio de su unión a receptores de membrana específicos, controla y regula todo el metabolismo y función de los tirocitos (Fisher y Klein, 1981).

La principal función del folículo tiroideo es atrapar yodo de la circulación y utilizarlo en la síntesis de los aminoácidos yodados: mono y diyodotirosina (MIT y DIT, respectivamente) y de las yodotironinas: tiroxina (T₄), triyodotironina T₃ y triyodotironina reversa (rT₃). El yodo es un oligoelemento que se absorbe en el tracto gastrointestinal, se convierte a yoduro y se distribuye rápidamente en el compartimiento extracelular. Su volumen de distribución es aproximadamente del 30% del peso corporal y se remueve del plasma casi totalmente por el riñón y la glándula tiroidea. La filtración renal de yoduro es alrededor de 35 ml/min y es independiente del aporte de yodo, mientras que en la glándula tiroidea normalmente oscila entre 10 y 35 ml/min (Dummont, y col 1989).

Yodo

La autoradiografía y el análisis de la cinética compartimental muestran que el folículo tiroideo concentra el radioyodo en el lumen. Esto requiere de la integridad del folículo e implica un flujo o gradiente eléctrico a través de las membranas basal y apical del tirocito. La diferencia de potencial a través de la membrana es de aproximadamente 50 mV con el interior negativo. El yoduro debe sobrepasar este gradiente eléctrico para entrar a la célula, y puede fluir hacia abajo con el gradiente para acumularse en el lumen. Esto y el hecho de que los tirocitos aislados también concentran yoduro indica la existencia de un mecanismo de transporte activo en la membrana basal, denominado bomba de yodo. Las características de este sistema de transporte de yoduro se han descrito en la tiroidea de diferentes especies (Wolff 1984,1983) e incluyen los siguientes aspectos:

- 1) Concentra yoduro contra un gradiente químico y otro eléctrico;
- 2) Es saturable y obedece a la cinética de Michaelis-Menten con una Km aparente de 3×10^{-5} mol/L,
- 3) Depende de la disponibilidad de ATP (fosforilación oxidativa, glucólisis o ambas);
- 4) Concentra otros aniones (perclorato (ClO₄⁻), fluoruro de boro (BF₄⁻), etc.) que con carga y volumen iónico similar compiten con el yodo,
- 5) Se inhibe por tiocianato e inhibidores de la ATPasa Na⁺/K⁺-dependiente; vgr, ouabaína,
- 6) Está regulado por la TSH la cual aumenta la permeabilidad celular y la Vmax de la bomba.

Síntesis de HTs

Como se ilustra en la FIGURA 1, una vez captado por los tirocitos, el yoduro es oxidado mediante un proceso enzimático catalizado por la tiroperoxidasa (TPO). Esta enzima es una hemoproteína glucosilada unida a la membrana apical de los tirocitos, cuyo dominio catalítico está orientado hacia la luz del folículo tiroideo (Nunez y Pommimer, 1982). La TPO exhibe una rara especificidad; es activa sólo en presencia de H_2O_2 , pero el exceso de éste la inhibe. La enzima cataliza la yodación de tirosinas libres o unidas a la TgB. Esta proteína específica de la glándula tiroidea es secretada por el tirocito al lumen del folículo tiroideo donde sirve como un sustrato para la serie de reacciones catalizadas por la TPO (Nunez y Pommimer, 1982, Virion y col 1985). Así, para la formación de las tironinas, se requiere de: TgB, TPO, yoduro y H_2O_2 (Dupy y col). La yodación tiene lugar en la molécula de TgB que está en contacto con la membrana apical y está determinada por la secuencia de aminoácidos de la molécula, en la cual se reconocen cuatro sitios homonogénicos (sitios específicos en las partes terminales de la molécula de TgB) en proporción 3:1 para T4:T3; respectivamente (Nunez y Pommimer, 1982). El primer residuo de tirosina que está en la posición 5 tiene un papel muy importante en la jerarquía de los residuos homonogénicos, porque será el primero en ser convertido a T4. Esta tironina se forma por la unión de dos residuos de DIT, y la T3 por la unión de un residuo de MIT con uno de DIT. También se producen pequeñas cantidades de rT3 y 3,3'diyodotironina. Como el nivel de yodación de la tiroglobulina varía dependiendo del suplemento dietético de yodo, esta proteína puede tener un número variable de residuos de MIT y de DIT y por lo tanto diferente contenido de T3 y de T4 (Edelhoch, 1985; Ohmaya y col, 1987).

Secreción de HTs

Una vez yodada, la molécula de TgB se almacena en la luz del folículo tiroideo, lo que provee de una reserva de hormonas disponibles para ser secretadas por medio de la endocitosis del coloides. Por medio de macro y micropinocitosis y bajo la estimulación aguda de la TSH, en cuestión de minutos se forman pseudópodos en el margen de las células foliculares cuyo tamaño y número dependen de las concentraciones de TSH. Los bordes laterales y apicales de los pseudópodos se fusionan englobando al coloides indiscriminadamente en un proceso similar a la fagocitosis. La tubulina y la actinomicina participan en el proceso. Los microfilamentos de actina predominan en las membranas apicales y los filamentos intermedios en la parte media y basal del citoplasma, y este arreglo determina la polaridad de los tirocitos (Takasu y col, 1992). Las gotas del coloides se internalizan y posteriormente se fusionan con lisosomas para después formar vacuolas fagolisosomales en las que se lleva a cabo la hidrólisis. Las HT (T4 > T3 >> rT3) son secretadas por difusión pasiva y/o por transporte mediado (Van Herle y col 1979; Erickson, 1981; Seljelid y col 1970; Vandenhove 1980), (FIGURA 1).

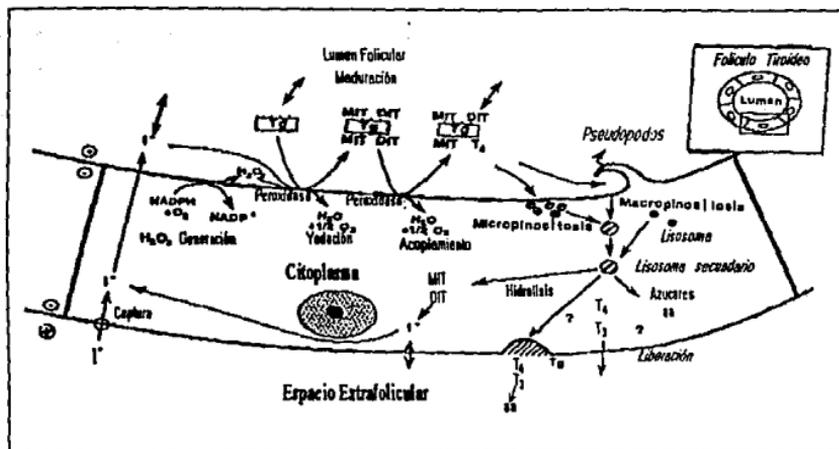


FIGURA 1. FOLÍCULO TIROIDEO. Se ilustran los diferentes mecanismos que participan en la incorporación del yoduro a las moléculas de tiroxina, así como en la liberación de las HTs a la circulación sistémica. I^- , Yoduro; H_2O_2 , peróxido de hidrógeno; NADPH, Fosfato del dinucleótido de adenina y nicotinamida reducido; NADP Fosfato del dinucleótido de adenina y nicotinamida; MIT y DIT mono y diyodotiroxina; T₄, tiroglobulina; aa aminoácidos; T₄, Tiroxina; T₃ Triyodotironina; rT₃ Triyodotironina reversa (Dummont, y col 1989).

1.2 TRANSPORTE DE HTs EN LA SANGRE

Las HTs son relativamente hidrofóbicas y están en solución acuosa debido a que se encuentran unidas a diferentes proteínas del suero que hacen las veces de acarreadores. Las características de las principales proteínas transportadoras de tiroxinas (TBP) en diferentes vertebrados se resumen en el CUADRO 1. Todas las TBP se sintetizan en el hígado, y la **transferrina (TT)** también se sintetiza en los plexos coroides (Sterling y Lazarous, 1977; Henneman y Docteur 1990; Tanabe y col., 1969; Refetoff y col 1970). Otras proteínas plasmáticas como α y β lipoproteínas tienen una menor contribución al transporte de HTs (Hoch, 1974). Las interacciones de las yodotironinas con las TBP son no-covalentes y reversibles, y obedecen a la ley de acción de masas. Esta unión de las HTs a las TBP explica que en condiciones normales la concentración de yodotironinas libres sea muy pequeña en relación con el total. En el hombre la concentración de T₄ libre oscila alrededor de 0.03% y la de T₃ alrededor de 0.3% del total de una y otra respectivamente.

CUADRO 1 PROTEÍNAS TRANSPORTADORAS DE TIRONINAS EN VERTEBRADOS

CLASE	PREALBUMINA (TRANSTIRETINA)	ALBUMINA (Alb)	POSTALBUMINA (PostAlb)	α -GLOBULINA (TBG)
Peces	6.8	43.5	18.9	—
Anfibios	42.2	40.1	7.2	—
Reptiles	20.0	50.5	8.5	—
Aves	15.1	65.1	6.5	—
Mamíferos				
Humanos	10.6	20.0	5.0	47.8
Vaca	4.5	17.7	11.7	61.6
Caballo	15.7	52.3	16.5	11.8
Ratón	12.9	31.6	23.0	10.3
Rata	15.1	61.2	10.9	2.5

Las cifras representan el % de T₄ unida a la proteína correspondiente. Obsérvese que la TBG cuya constante de afinidad para la T₄ es la más elevada ($K_a=10 \times 10^{-10}$ mol/L.), sólo está presente en los mamíferos y que en estos, la rata presenta un menor porcentaje de unión (Tanabe y col 1969; Refetoff y col 1970).

1.3 CAPTURA DE HTs POR ORGANOS BLANCO

Las hormonas tiroideas penetran al interior de las células blanco en forma activa por medio de un mecanismo estereoespecífico denominado potocitosis (del griego, potos; beber). Este mecanismo de importación transmembranal de las HTs asemeja a la endocitosis y utiliza regiones y proteínas especializadas de la membrana celular llamadas cavéolas. Hasta la fecha se ha propuesto que la potocitosis de las HTs corresponde a la subclase mediada por acarreador; i.e. el complejo tironina/TBP_s es secuestrado en la cavéola y ya en el interior de la célula la hormona liberada difunde por gradiente al citoplasma celular (Anderson, 1993). Además de estas proteínas que unen a las HTs en la membrana celular, también se encuentran en el núcleo, citoplasma, retículo endoplásmico y las mitocondrias (Ichikawa y Hashikume, 1991).

1.4 METABOLISMO PERIFERICO DE LAS HORMONAS TIROIDEAS

Por ser la desyodación extratiroidea de las HTs el objetivo principal de esta tesis, sólo se revisará la información relacionada con este tema. Sin embargo es importante recordar que estas moléculas tienen 4 destinos metabólicos, los cuales se describirán brevemente en la FIGURA 2.

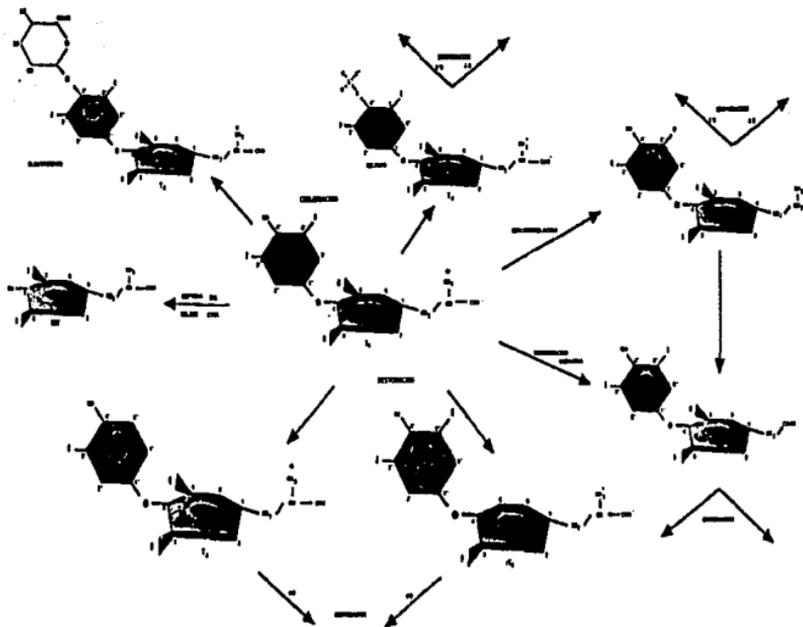


FIGURA 2. PRINCIPALES RUTAS METABÓLICAS DE LAS TIROXINAS. La figura se refiere a la T4 pero la T3 sufre las mismas transformaciones metabólicas. I) **Conjugación.** Es un proceso reversible que ocurre principalmente en el hígado y riñón y consiste en la unión del ácido glucurónico o sulfato en el grupo hidroxilo del anillo fenólico (externo) de la molécula. Las moléculas se hacen hidrosolubles facilitando su eliminación en la bilis hacia el intestino donde sufren una hidrólisis y la tiroxina libre se reabsorbe (ciclo enterohepático), eliminándose una pequeña cantidad en las heces y la orina. Además, la sulfatación facilita la desyodación especialmente de la T3 en el hígado. II) **Desaminación y descarboxilación.** Estos procesos incluyen la desaminación y descarboxilación secuencial de la cadena lateral de una u otra tiroxina. Ocurren principalmente en el hígado y riñón y están mediados por enzimas localizadas en las mitocondrias. Las tiroxinas son transformadas irreversiblemente para formar análogos del ácido tetrayodoacético (TETRAC) y el triyodoacético (TRIAC), catabolitos que son secretados en la orina. Ambos TRIAC y TETRAC tienen actividades tiroimiméticas, siempre mucho menores que la de sus precursores. Se ha sugerido que esta baja actividad se debe a que su vida media es muy corta y son rápidamente degradados. Lo anterior explica la poca significancia que tienen a pesar de su elevada afinidad para la transferrina y para los receptores nucleares de T3. III) **Ruptura del enlace éter.** Da como resultado la formación de yodoaminoácidos (moléculas de tiroxina yodadas; MIT o DIT). Esta ruta metabólica en el tejido hematopoyético (leucocitos) parece formar parte de sus mecanismos bacteriolíticos. Este proceso implica la formación de yodoproteínas por enlace covalente. Hay ruptura del enlace éter de la molécula de tiroxina formando así DIT y liberando moléculas de yoduro. La fracción hormonal degradada se conoce como yodoproteína no extraíble. IV) **Monodesyodación secuencial de la T4.** Consiste en la remoción progresiva de los átomos de yodo presentes en ambos anillos de la molécula y ocurre prácticamente en todos los tejidos (Visser, 1988; Valverde y col 1993, Kórtie y col, 1987 y 1992; Leonard, 1986).

1.5 DESYODACION EXTRATIROIDEA DE LAS HTs

La T₄ parece jugar el papel de una prohormona. En efecto, su desyodación que puede ocurrir tanto en el anillo externo o fenilo como en el interno o tirosilo, genera diferentes tironinas con o sin actividad biológica. Como se ilustra en la FIGURA 3, actualmente se reconocen dos vías desyodativas. La vía que produce T₃ por la desyodación del anillo fenólico o externo de la T₄ (remoción del yodo en la posición 5' o 3'), se designa vía 5'desyodasa (5'D), o desyodación 5' del anillo externo (ORD). Como genera T₃ a partir de T₄, a esta ruta se le considera la vía de activación. Por otra parte, si la desyodación de la T₄ ocurre en el anillo tirosilo o interno de la molécula, se genera rT₃ y por esta razón la vía desyodativa se ha llamado desyodación 5 del anillo interno (IRD), o 5 desyodasa (5 D). Los metabolitos generados carecen de actividad calorigénica o tiorimética y por lo tanto a esta ruta desyodativa se le considera como la vía de bioinactivación.

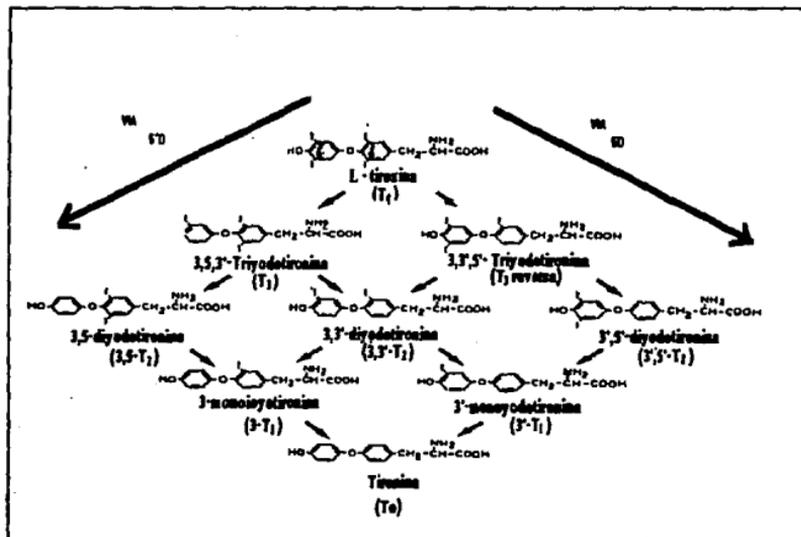


FIGURA 3. DESYODACION EXTRATIROIDEA DE LA T₄. Se ilustra la desyodación secuencial de la T₄ a través de una u otra vía (5'D y 5D), que da como resultado la formación de diferentes tironinas con y sin actividad biológica (Dummont y col, 1989; Valverde y col 1993, Kohnle y col 1987 y 1992).

Vía de Activación

Como ya se mencionó, por esta vía se produce T₃ a partir de la prohormona T₄, y T₂ a partir de T₃ (FIGURA 3). Los 2 átomos de yodo del anillo externo son químicamente equivalentes debido a la rotación alrededor del enlace éter de la molécula de tironina. Los métodos actuales no distinguen cual yodo se quita primero y de ahí su designación 5'D. Por su preferencia de sustrato, el grado de inhibición o susceptibilidad al PTU y su respuesta a cambios fisiológicos, se han identificado dos isoenzimas que catalizan la vía de activación. Ambas enzimas son proteínas integrales de membrana, particularmente del Reticulo endoplásmico rugoso (RER) y se denominan Tipo I y Tipo II (5'D-I y 5'D-II, respectivamente). Aunque hasta la fecha ninguna se ha aislado y purificado se identifican con base en sus constantes cinéticas y mecanismo de acción (Safran y Leonard 1991) (CUADRO 2).

5'D-I. Esta desyodasa se define como la enzima que dependiendo del pH del ensayo cataliza la monodesyodación del anillo interno (pH alrededor de 6.5) o externo (pH alrededor de 8.0) de la molécula de tironina. La Km de esta enzima tiene un rango $\mu\text{mol/L}$, el sustrato preferencial es T₄ y se inhibe con concentraciones $\mu\text{mol/L}$ de PTU. Su mecanismo de reacción es de tipo "ping-pong" (FIGURA 4) y su actividad es elevada en el hígado, el riñón y la tiroides y menor en otros tejidos. En el riñón se localiza en la membrana apical de las células epiteliales y en las membranas basolaterales del túbulo contorneado distal en proximidad con la sangre. Estudios recientes indican que la 5'D-I es una selenio-proteína y se sugiere a la cisteína hiperactiva como el sitio activo esencial (Se-cys) (Leonard J y Visser T 1988; Behne y col 1990; Berry y col 1991 a, b y c, 1992). Esta peculiaridad hace que su actividad sea inhibida por tioglucosa-áurica, la cual al unirse al Se forma un complejo estable e irreversible (Mc Naab, 1992). La actividad de la enzima es directamente proporcional a la concentración o aporte tisular de T₄. Este hecho, así como la presencia de la enzima en órganos con elevado flujo o gasto sanguíneo y la rápida liberación al compartimento vascular de la T₃ producida (10 a 20 min), ha llevado a proponer que la 5'D-I elabora hormona activa para exportación.

5'D-II. Este isotipo fue descubierto a principios de los 80's al analizar las fuentes intracelulares de T₃ (Körhne, 1987 y 1992; Leonard y Visser 1988; Fakks y col 1982). La enzima tiene mayor preferencia por T₄ que por rT₃, y a diferencia de la tipo I no contiene Se (Berry y col 1991 a), su Km es un orden de magnitud menor (nanomolar), es insensible al PTU, y su mecanismo de reacción es secuencial (FIGURA 4). También se diferencia de la tipo 5D-I en su distribución tisular, localizándose preferentemente en órganos como: hipófisis, corteza cerebral, sobre todo en

neuronas, aunque se pueden estimular a los astrocitos para expresar a la enzima cuando se eleva la concentración de cAMP. También se encuentra en el tejido adiposo café (BAT), placenta, glándulas pineal, de Harder y suprarrenal (Fekks y col 1982; Anguiano y col 1991). Otra diferencia entre ambas enzimas se refiere a su respuesta durante situaciones fisiológicas o patológicas en las cuales la actividad de la 5'D-II es inversamente proporcional a las concentraciones plasmáticas de T₄ (CUADRO 2). Por esta razón así como por el hecho de que la T₃ producida permanece en el órgano se ha propuesto que la 5'D-II genera hormona activa a nivel local para autoconsumo.

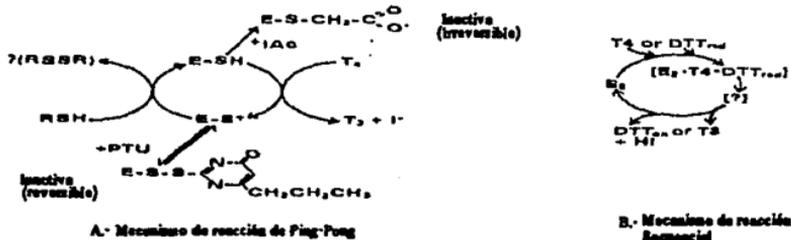


FIGURA 4. DESTIPOSICIÓN DE TIROSINAS. MECANISMOS DE REACCIÓN. La reacción tipo "Ping-Pong" comprende dos pasos: la deiodación propiamente dicha y la regeneración mediante reducción de la enzima oxidada. Como se ilustra en A, la ruptura del yodo del carbono 5 está catalizada por una transyodasa/transhidrogenasa la cual quita dos electrones al grupo a un grupo SH de la enzima (E-SH) esto resulta en un estado oxidado sulfenilo (E-S⁺), posteriormente se forma un Intermediario enzimático con el yoduro proveniente de la hormona (E-SI), lo que representa una forma oxidada de la deiodasa que libera dicho yoduro (I⁻) al ser reducida (regenerada) por el cofactor (RSH). Este último interviene en la reacción como un sustrato secundario obligado y provee de los equivalentes reducidos para la regeneración de un grupo parcial oxidado del sitio activo de la enzima. Aunque no se conoce con certeza, es probable que este segundo sustrato sea el glutatión. Esta reducción (regeneración) de la enzima es inhibida de manera reversible por PTU el cual reacciona con E-S⁺ formando una mezcla estable enzima-PTU disulfuro. La enzima también se puede inhibir de manera irreversible con Acido Iopanoico (IAc) el cual bloquea su sitio activo. La presencia de Se-cys en el sitio activo permite que la enzima sea inhibida selectivamente por la tioglucosa áurica (la figura no muestra este último mecanismo). Mecanismo de reacción secuencial. Como se muestra en B, este mecanismo se caracteriza por la unión de los dos sustratos (hormona y cofactor) antes de la liberación del producto. En otras palabras, las yodotironinas y los tioles (cofactor) deben combinarse en el sitio activo de la enzima antes que la deiodación se lleve a cabo (Leonard y Visser, 1986; Visser y col 1982, Nunez, 1988; Chopra 1992).

En años anteriores se había descrito otra isoenzima llamada tipo 5'D-Low (Körhlie y col, 1992) la que posteriormente se demostró que es un artefacto de la técnica, el cual se observa dependiendo de la concentración de cofactor utilizada en el ensayo. Esto se demostró porque el cDNA para la tipo i-5'D codifica para una sola entidad molecular que exhibe actividad tanto en una Km alta como en una Km baja (Shariff y St. Germain, 1992).

Vía de Inactivación

La desyodación del anillo interno o tiroilo de la T4 y de la T3 genera tironinas inactivas, rT3 y T2 respectivamente, y se conoce como la vía 5D-tipo III. Esta inactivación de la prohormona o de la principal tironina bioactiva ocurre en todos los tejidos excepto en la adenohipófisis. En los mamíferos la mayor actividad se detecta en el hígado, cerebro, la piel y placenta. A pesar de su evidente importancia fisiológica, se conoce relativamente poco acerca de las propiedades bioquímicas fisiológicas y funcionales de la enzima que cataliza esta ruta metabólica (Körhlye y col 1987 y 1992).

Esta enzima se localiza en prácticamente todos los tejidos. Hasta la fecha se ha detectado en placenta, piel, corteza cerebral, grasa blanca, cerebelo, bazo, corazón, riñón, testículo, pulmón, intestino delgado, hígado y músculo estriado (Körhlye y col 1987 y 1992). Como el resto de los miembros de esta familia enzimática, la actividad 5D-III se asocia a membranas microsomales y es más abundante en el retículo endoplásmico. El sustrato preferencial es la T3 y el secundario es la T4, y su Km está en el rango nmol/L. La enzima es insensible al PTU y requiere de tioles como cofactor. Su mecanismo de reacción es secuencial y el pH óptimo está en la alcalinidad (8 a 8.5).

Actividad 5D en Placenta y Tejidos Embrionarios. La placenta no exhibe actividad 5'D I, se detecta una baja actividad 5'D-II (Kaplan y Shaw, 1984) y está marcadamente enriquecida con la 5D-III, la cual se localiza en células de la membrana coriónica (Rotti y col 1981 y 1982; Santini y col, 1992). Las altas concentraciones de rT3 en el líquido amniótico se pueden originar de esta enzima, función que reduce la entrega de T4 a T3 de la madre al feto que provee de yodo a la tiroides de este último. Recientemente (Santini y col 1992), se caracterizó a la 5D-III en fracciones microsomales de la placenta y se comparó con la 5'D del hígado. Los resultados mostraron que la enzima de placenta requiere fosfolípidos y no contiene selenio. Además, en la región carboxilo terminal, la 5D-III difiere en 16 aa con respecto a la hepática que tiene de 27 a 29 kD. Aunado a esto, la proteína de 31 kD marcada con ¹²⁵BrAcT3 (N-Bromoacetil-T3) puede ser la subunidad que se une al sustrato (Santini y col 1992). La actividad 5D placentaria no se modifica por la administración de dosis farmacológicas de T4, o bien durante el hipotiroidismo (quirúrgico o farmacológico), o el ayuno. Sin embargo en todas estas manipulaciones la actividad 5'D exhibe las modificaciones correspondientes (CUADRO 2). Además Yoshida y col estudiaron la actividad 5D en la placenta humana de mujeres normales y con enfermedad de Graves-Basedow (hipertiroidismo) y no observaron cambios (Emmerson y col 1988 a y b).

También se ha detectado actividad 5D en el sistema nervioso (astroglia) del cerebro de rata recién nacida, y en cultivos de hepatocarcinomas, en corazón, hígado y cerebro del embrión de pollo, en membranas fetales de la oveja; rata y humano. En todos estos órganos o tejidos, la

actividad 5D es elevada en contraste con la observada en el individuo adulto (Körhle, 1987, 1992). Estas observaciones refuerzan la hipótesis que propone que la actividad 5D en tejidos fetales indiferenciados así como en órganos que no responden a HTs, previene la acumulación inapropiada de T3 degradando esta tironina hacia T2 y también la T4 hacia rT3. Además, recientemente se ha encontrado que la desamidación no afecta; mientras que la sulfonconjugación inhibe marcadamente la actividad 5D-III en la madre, facilitando el transporte de HTs-sulfatadas hacia el feto. Es esta forma donde se ha propuesto que la hormona activa podría recuperarse para servir a algunos tejidos en los que su presencia es crítica (cerebro, pulmón, etc.). Lo anterior serviría para optimizar el anabolismo (y crecimiento) al proteger a otros tejidos del efecto catabólico secundario al exceso de HTs (Emmerson y col 1988).

Actividad 5D en la Piel de la Rata. El reporte más completo al respecto es el de Tien Huan Shang y col, 1985. Estos investigadores estudiaron a la 5D-III en varios órganos y las características *in vitro* de la enzima son:

- Su pH óptimo es de 7.4 (semejante al cerebro y la placenta pero es diferente del hígado que es de 8.2).
- Se localiza principalmente en la fracción microsomal en todos los tejidos excepto en el hígado, que se localizó en el citosol.
- La conversión de T4 a rT3 se inhibe con T3 y 3,5 T2 siendo dosis-dependiente pero no se inhibe por 3',5' T2, salicilato ni PTU.
- En corteza la sensibilidad a T3 y 3,5 T2 es igual que en piel, el 50% de inhibición con T3 en corteza es de aprox 2.3×10^{-7} mol/L y de 4.2×10^{-7} para piel; para 3, 5 T2 1.5×10^{-6} en corteza y 1.4×10^{-6} en piel. La potencia de inhibición molar de T3 a 3, 5 T2 es de 100:15 en corteza y de 100:30 en piel.
- La actividad 5D del hígado se inhibe sustancialmente por los inhibidores de T4 (iodoacetato y ácido iopanoico).
- La actividad 5D en piel y corteza cerebral se estimula por DIMIT (3 5 dimetil-3' isopropil tironina) pero no por T3 ni T4 ni en piel ni en corteza.
- El ayuno no afecta la actividad de la 5D en la piel, la placenta y la corteza.
- La actividad 5D en la piel y en la corteza cerebral de hembras preñadas en comparación con las no preñadas es menor. Estos datos llevan a sugerir que el descenso de la 5D (T4 a rT3) es una respuesta de regulación al emerger otro órgano como la placenta que tiene una alta producción de rT3.
- La piel al ser el órgano mayoritario en superficie, en los animales es la que más aporta rT3 a la circulación.

CUADRO 2. PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS DE LAS DESYODASAS EN LOS MAMÍFEROS

PROPIEDAD	SD-I	SD-II	SD-III
Cinética	Ping-Pong	Secuencial	Secuencial
Sustrato Preferencial	rT3→T4→T3	T4→rT3	T3>T4
Producto Limitante	T3, rT3, T2	T3, T2	rT3, T2
Km	µmol/L	nmol/L	nmol/L
Cofactor DTT	nmol/L	nmol/L	nmol/L
INHIBIDORES			
Tiouracilo	++++	±	-
Ácido Iopanoico	++++	++++	++++
Yodacetato	++++	+	++
Flavonoides	++++	+++	+++
Halogenados Aromáticos	++++		
Peso Molecular	55,000	20,000	¿?
Subunidades	27 kDa	¿?	¿?
Coef Sedimentación (S)	3.5-4.5	¿?	¿?
Radio	32-37 Å	¿?	¿?
Punto Isoeléctrico	9.3	¿?	¿?
DISTRIBUCIÓN EN TENDOS			
	Tiroides Riñón, Hígado, SNC	SNC Hipófisis, Grasa parda, Suprarrenal.	Piel Placenta SNC
Localización			
Subcelular	Hígado, RER Riñón, membrana plasmática basolateral	Membranas microsomales	Membranas microsomales
CAMBIO DURANTE			
Hipertiroidismo	Aumenta	Disminuye	Aumenta
Hipotiroidismo	Disminuye	Aumenta	Disminuye
Síndrome Eutiroidismo	Disminuye	Sin Cambio	Sin Cambio
Sitio Activo	Se-cys	Cysteina	¿?

¿? Desconocido. Modificado de Kaplan 1984; Leonard y Visser 1988; Berry y Larsen 1992.

En cultivos de la piel de humanos, se sabe que los queratinocitos de la epidermis de adultos y recién nacidos exhiben actividad 5'D-II. La enzima presenta una Km aparente de 10 nmo/L, es inhibida por 1 mmol PTU, semejante a lo reportado para la placenta y tejidos de rata (Visser, 1986); Se observó que la actividad 5'D-II incrementa en los cultivos carentes de HTs, por lo que sugieren que el significado biológico sería que la piel es un aporte de T3 en estados de hipotiroidismo, lo anterior queda por ser demostrado ya que no han encontrado actividad 5D-II en muestras de piel recién obtenida (Kaplan y col, 1988), también encontraron evidencias de actividad deoydativa de la enzima 5D- III con características semejantes a las reportadas para piel de rata (Tien-S Huang, 1985).

1.6 ACCIONES Y EFECTOS DE LAS HTs

La bioactividad de las HTs depende principalmente de las concentraciones intracelulares de T3, las cuales a su vez están determinadas por: 1) la secreción de T4 y T3 por la tiroides; 2) el intercambio de T4 y T3 entre el plasma y los tejidos; 3) la conversión extratiroidea de T4 a T3 a nivel local; y 4) la degradación metabólica de T3. Las HTs ejercen diversos efectos fisiológicos en prácticamente todas las células del organismo. Entre los más característicos y mejor estudiados se encuentran sus efectos sobre el crecimiento y la diferenciación celular particularmente del sistema nervioso; así como, sus efectos sobre el metabolismo energético y la respiración celular (Davis, 1992; Oppenheimer, 1992). Estos efectos de las HTs están mediados por sus acciones a nivel de la membrana plasmática y a nivel genómico por su interacción con receptores específicos localizados en el DNA nuclear y el mitocondrial (Nunez 1988; Ichikawa y Hashikume 1991).

Membrana Plasmática y Mitocondrial. Las acciones de las HTs sobre la membrana plasmática pueden afectar la actividad de enzimas, de transportadores o bombas asociadas; vgr., captura de glucosa, adenilato ciclasa y permeabilidad a K⁺ (Davis 1992) Entre las acciones mejor estudiadas se encuentra la estimulación que las HTs ejercen sobre la actividad de la bomba de Na/K-ATPasa dependiente. La energía para la función de esta bomba localizada tanto en la membrana plasmática como en la mitocondrial interna, deriva de la hidrólisis de ATP a ADP en un proceso productor de calor FIGURA 5. Las HTs aumentan la actividad enzimática de la ATPasa y de la α - glicerofosfato deshidrogenasa que cataliza la entrada de equivalentes reductores del citosol al sistema de transporte de electrones mitocondriales (Faramarz 1988, Davis 1992).

Acciones Genómicas de las HTs. Se sabe que los receptores de las tironinas (THRs) forman parte de la superfamilia de proteínas reguladoras de la transcripción genética a la cual también pertenecen los receptores para esteroides, vitamina D, retinol y otros mensajeros (abajo). Hasta la fecha se han identificado 4 subtipos de THRs ($\alpha 1$ y $\alpha 2$; $\beta 1$ y $\beta 2$), los cuales muestran una distribución específica y se han identificado en prácticamente todos los tejidos periféricos. Son proteínas no histonas de aproximadamente 50 kDa con un coeficiente de sedimentación de 3.5 S y un radio de 1.2 Å. Exhiben una alta afinidad y una capacidad limitada para los siguientes ligandos TRIAC > 3' isopropil > T3 > T4 > rT3 > di y monoyodotirosinas. Los THRs tienen cuatro dominios: la región amino terminal cuya función se desconoce; la región que se une al DNA y cuya secuencia contiene dos complejos tetraédricos de aa (dedos de zinc) cuyas asas de 4 aa c/u unen al ión zinc; la región llamada bisagra ("hinge") y cuya secuencia facilita la dimerización, y la región carboxilo terminal que une o reconoce al ligando (HRE). El complejo tironina-receptor facilita la unión a una secuencia específica de nucleótidos llamados elementos de respuesta a tironinas (TREs) de los genes regulados. Esta unión como se resume en el CUADRO 3 induce o reprime la transcripción de mRNAs específicos y explica porque las HTs producen efectos tan diversos *in vivo* (Nikkodem y col, 1990; Oppenheimer, 1992; Mc Naabb 1992).

CUADRO 3 . EFECTOS GENÓMICOS DE LAS HTs

GEN	MRNAS	TASA DE TRANSCRIPCIÓN	LATENCIA DE RESPUESTA (HR)	ORGANO O TEJIDO
GH	↑ 10	↑ 10	>0.5	Células GC
Ornitín aminotransferasa	↑ 3	↑ 2	>4	Riñón (rata)
Fosfoenolpiruvato carboxilasa	↑ 4-6	↑ 4-6	ND	Hígado (rata)
Enzima málica	↑ 11-16	↑ 3-4	2	Hígado (rata)
Cadena pesada α -miosina	↑	↑	<4	Miocardio (rata)
Renina	↑ 6	ND	1	Glándula S/ Max (rata)
Citocromo C	↑ 3-4	↑ 3-4	12	Hígado y Riñón (rata)
Subunidad α Na/ K-ATPasa	↑ 7.3	↑ 1.4	ND	Hígado (rata)
Subunidad β Na/ K-ATPasa	↑ 2.8	↑ 1.8	ND	Corteza renal (rata)
Termogenina (UCP)	↑ 4	↑ 4	2	Tejido graso café
Reductasa HMG-CoA	↑ 20-40	↑ 5	24	Hígado (rata)
S14	↑ 10-14	↑ 3-9	0.1	Hígado (rata)
Subunidad α de TSH	↓	↓	0.5	Tumor tirotrópico (ratón)
Subunidad β de TSH	↓↓	↓↓		Tumor tirotrópico (ratón)
Cadena pesada β - miosina	↓	↓	<4	Miocardio (rata y conejo)
TRH		ND	ND	Hipotálamo (rata)

ND No detectado; Inducción (↑) o represión (↓) por T3 (Nikkodem y col, 1990).

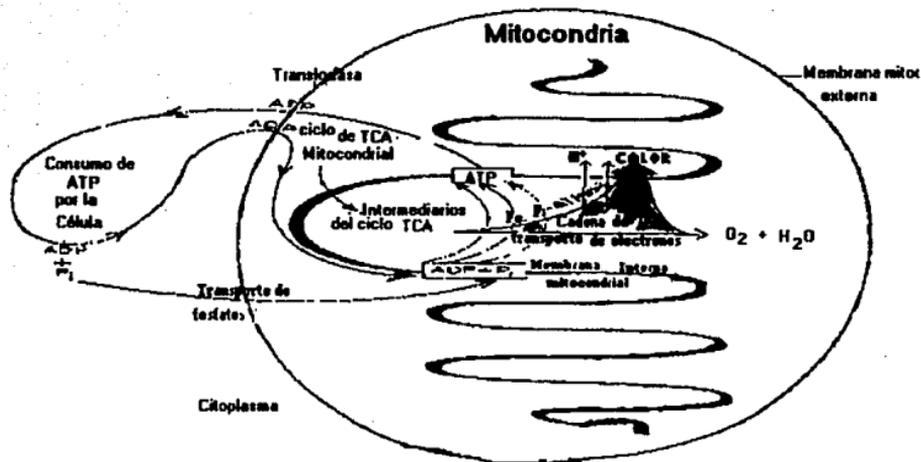


FIGURA 5. DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DE LOS POSIBLES SITIOS DE ACCIÓN DE HTs EN LA MITOCONDRIA. Como se ilustra en esta figura las acciones de las HT a nivel mitocondrial ocurren al menos en 5 sitios. 1) Aumenta la actividad del transportador o translocasa ADP-ATP que es la proteína más abundante en las mitocondrias. 2) Regula la disponibilidad de los intermediarios para el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) o ciclo de Krebs. 3) Aumenta la actividad del transportador mitocondrial de fosfatos, este efecto probablemente está mediado por las acciones genómicas nucleares de las HTs. 4) Facilita la transferencia intramitocondrial de protones por la ATPasa F_0F_1 y 5) Estimula indirectamente la cadena de transporte de electrones actuando en receptores nucleares y estimulando la transcripción de la subunidad II de la citocromo c oxidasa (Davis, 1992).

Respiración Celular y otras Acciones Metabólicas. Aunque hasta hace poco tiempo se pensaba que las HT desacoplaban la fosforilación oxidativa en la mitocondria reduciendo la proporción P/O, ahora se sabe que este efecto desacoplador es un efecto farmacológico (Davis 1992). Las acciones de las HTs sobre la respiración celular son secundarias a sus efectos sobre la glucólisis al aumentar la captación de glucosa y la entrada de los intermediarios del ciclo de Krebs; así como por sus acciones genómicas al regular la expresión de las enzimas que se indican en el CUADRO 3 (Nunez, 1988; Greer, 1990; Davis 1991). Las HTs estimulan prácticamente todas las fases del metabolismo de las grasas. Movilizan lípidos del tejido adiposo, lo que aumenta la concentración de ácidos libres en la sangre y acelera su oxidación hepática. Disminuyen la cantidad de colesterol, fosfolípidos y triacilglicéridos, y regulan la síntesis de enzimas lipogénicas como la carboxilasa sintetasa de ácidos grasos y las enzimas málicas, además coenzimas como la Acetil

CoA. Las HT ejercen efectos opuestos en el sistema de adenilato ciclasa presentes en los adipocitos y en los hepatocitos (Davis, 1992).

Desarrollo y Diferenciación Neuronal. El desarrollo del sistema nervioso en todos los vertebrados es un proceso complejo, multifactorial y heterocrónico en el cual las HTs juegan un papel determinante ya que regulan la neurogénesis y migración neuronal, así como la sinaptogénesis, la proliferación de procesos neurales y la mielinogénesis. La participación de las HTs ocurre en un período específico de la ontogenia denominado período crítico y que la asincronía, o bien, la deficiencia o exceso de estas hormonas provoca cambios irreversibles (Nunez 1988, Graer, 1990). Se ha propuesto que este papel neurogénico de las HTs involucra sus acciones a nivel del citoesqueleto, específicamente a nivel del arreglo de los microtubulos ya que regulan la expresión del mRNA de las proteínas TAU. Los microtubulos están compuestos mayoritariamente por tubulina y por las proteínas asociadas a ellos o MAPs. Estas proteínas son promotores del ensamblaje y la estabilidad de los microtubulos. Las proteínas TAU son las más estudiadas y parecen ser las responsables del ensamblaje de los microtubulos ya que se unen a varias moléculas de tubulina simultáneamente lo que facilita su polimerización (Alberts 1991).

Además de su acción neurogénica durante el período crítico, las HTs regulan la inactivación de la 5'D-II neural por un mecanismo extragenómico que también involucra al citoesqueleto. En efecto las HTs estimulan la polimerización de la actina y la internalización de la desyodasa unida a la actina-F hacia reservas de membrana calulares, dando como resultado la pérdida del 50% de la actividad enzimática. Solo la T₄ y no la T₃ afectan esta actividad, esto indica que una de las proteínas citoplasmáticas que unen a las tironinas también une a la actina (Farwell, y col 1990).

FISIOLOGIA TIROIDEA EN LOS PECES.

2.1 LA GLANDULA TIROIDES

Las glándulas tiroideas de los agnatos (ciclostomos y mixínidos), elasmobranquios y teleosteos comparten diversas características con las de otros vertebrados: 1) sus unidades histológicas funcionales -los folículos-, 2) la capacidad de atrapar yodo inorgánico e incorporarlo a los residuos de tirosina de la tiroglobulina, y 3) la composición de aa de la tiroglobulina que es parecida a la de mamíferos.

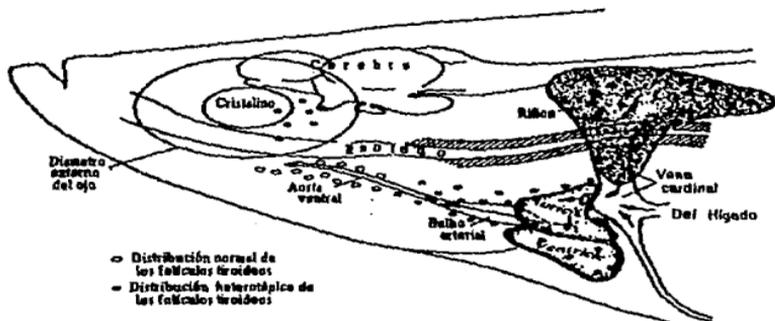


FIGURA 6. DISTRIBUCIÓN DE LOS FOLÍCULOS TIROIDES EN LOS TELEÓSTEOS. Se muestra la distribución normal de los folículos alrededor de la aorta ventral y la distribución heterotópica de los folículos alrededor del bulbo arterial, corazón y cristalino.

Sin embargo, en los elasmobranquios y los teleosteos los folículos no se encuentran agrupados formando una glándula tiroidea propiamente dicha, sino que están en forma dispersa (Gorbman, 1989; Lagler y col 1977; Matty, 1985). Aunque algunos peces óseos tienen glándula tiroidea encapsulada (Matty, 1985), en la mayoría la distribución de los folículos es peri-aórtica (aorta ventral) y en las branquias también pueden presentar una distribución heterotópica FIGURA 6 (Baker y col 1955, 1958). En términos generales, en los peces, las hormonas tiroideas son producidas con una tasa más lenta que en los mamíferos. El contenido de yodo en el plasma de los teleosteos varía de 0.5 a 2000 $\mu\text{g}/100\text{ml}$ (peces dulceacuícolas 1-2 $\mu\text{g/l}$, peces marinos 48-80 $\mu\text{g/l}$). Las proteínas unidoras de yodo contribuyen a la conservación del yodo sanguíneo, que se requiere para la síntesis de HTs (Brown y Eales, 1977).

2.2. ASPECTOS ONTOGENETICOS

Como ya se mencionó en la sección 1.2, en los peces la concentración de proteínas transportadoras de HTs (TBPs), es significativamente diferente a la de los mamíferos, pues los peces carecen de TBG (α -globulina). En peces el resto de las TBPs unen aproximadamente los siguientes porcentajes de T₄: Alb 43.5, post-Alb 18.9 y Pre-Alb o transtiretina 6.8 (Tanabe y col, 1969). Lo anterior concuerda con los valores de tironinas circulantes los cuales, en truchas, son más altos en comparación con mamíferos. Además la ausencia de TBG implica un rápido recambio titular de T₄ hacia T₃.

Se conoce poco sobre los THR's en los peces. En el hígado de la trucha arcoiris, utilizando métodos de competencia (desplazamiento) de unión *in vitro*, se ha demostrado un sitio nuclear saturable para T₃ que tiene alta afinidad (K_d 10^{-10} mol/L) y baja capacidad, alrededor de 1000 sitios/célula. Se han caracterizado parcialmente sitios de unión nuclear similares, en el hígado y otros tejidos de cictóstomos (Lintrop y Youson 1983) y salmónidos (Sullivan y col 1987; Eales 1990), así como en anfibios y reptiles. No se han identificado sitios saturables en la mitocondria ni en fracciones citosólicas. Los sitios intranucleares son probablemente proteínas no histonas y tienen una afinidad muy semejante a la de los mamíferos, la capacidad de unión de los sitios varía de 0.4×10^{-12} a 0.6×10^{-12} mol T₃ por gramo de hígado (Sullivan y col 1987). Los tamaños moleculares corresponden con los de homeotermos indicando que se conservan durante la evolución.

La abundancia relativa de estos receptores nucleares para T₃ no parece estar influenciada directamente por las concentraciones de HT, pero sí por diferentes condiciones funcionales del organismo; i.e., crecimiento; o bien, por estados catabólicos asociados en los cuales tienden a disminuir la abundancia de receptores hepáticos para T₃ (Bres y col, 1990).

Estudios recientes en hepatocitos de truchas jóvenes, han mostrado que el transporte de T₄ es un proceso estereoespecífico dependiente de energía, mediado por transportadores, que no depende del transporte de sodio (Na^+) extracelular pero sí del gradiente de H^+ . El pH óptimo es de 5 - 6. Este proceso está mediado en parte por un mecanismo endocítico y se inhibe por T₃, rT₃, T₂ y otros análogos de tironinas. La captura de T₃ difiere de la T₄ en que requiere un pH más alto, de 6 - 8 y la captura mínima (K_i) es más baja ($0.074 \mu\text{mol/L}$ Vs $0.52 \mu\text{mol/L}$ para T₄) debida a la mayor afinidad (8 veces) y la baja capacidad por su acarreador. Con los perfiles análogos de cinéticas de inhibición pueden sugerir que aunque los dos sistemas interactúan, los acarreadores para T₃ y T₄ son diferentes, lo que permite la regulación independiente de estas dos tironinas y contribuye al control del metabolismo periférico de HTs (Riley & Eales, 1993, 1994).

Embriogénesis. Las HTs son muy importantes en la vitelogenénesis, puesto que pueden incrementar la estabilidad al mRNA de las vitelogeninas durante la síntesis en el hígado y también actúan sinérgicamente con las gonadotropinas y estrógenos en la incorporación de las vitelogeninas que se incorporan como lipovitelina y fosfovitelina (lipoproteínas y fosfopéptidos) al vitelo en la ovogénesis (Benfey y col, 1989). Por otro lado se sabe que en salmónidos, el contenido de T₄ en huevos fertilizados es del doble en comparación con huevos no fertilizados. Aproximadamente a los 10 días pre-eclosión, el contenido de T₄ es de 20-28 ng/g (5.3 ± 0.3 ng/huevo) y el de T₃ es de 10 ng/g. Estas concentraciones permanecen estables durante el desarrollo embrionario (28 a 34 días) y se cree que la T₄ es aportada por la madre (igual que en aves). En contraste, el cortisol desciende en los primeros 8 días del desarrollo embrionario de 20 ng/g hasta 2.5 ng/g, también descienden las concentraciones de estradiol y testosterona. La velocidad en la desaparición de estas hormonas de los huevos refleja las demandas de los embriones (ver APENDICE III) (Tagawa y Hirano 1987; Lundqvist, 1989).

Estadío Larvario. En el alevín o larva recién eclosionada se identifican folículos tiroideos todavía no funcionales y tirotrópos hipofisarios. En esta etapa la concentración total de T₄ va de 28 ± 2.3 a 27.7 ± 1.5 ng/g (aproximadamente 4.4 ± 0.3 ng/larva). El saco vitelino que representa el 90% del individuo contienen 4.2 ng y la larva sólo el 4%, es decir 0.18 ng. No se sabe si en esta fase existe actividad desyodativa. Posteriormente, alrededor del día 30 posteclosión, la larva consume la T₄ del saco vitelino y la concentración de la hormona total disminuye de 4.4 ± 0.3 a 1.5 ± 0.1 ng (Speker, 1988; Tagawa y Hirano, 1990; De Jesus y Hirano, 1992).

Cría. En la primera fase del estadio de cría, cuando todavía no se alimenta pero ya se absorbió el saco vitelino (aproximadamente en el día 45 posteclosión), ocurre un aumento significativo en el contenido total de T₄ cuyas concentraciones ascienden de 10 a 20 ng/g, mientras que la T₃ es indetectable (límite de detección 1ng/ml). Este aumento de T₄ coincide con el inicio en la actividad de los folículos tiroideos, así como con el inicio del crecimiento de la cría. La respuesta a TSH indica que los folículos ya son funcionales y que el eje hipotálamo-hipófisis-tiroides comienza a funcionar unos días después que la larva inicia su alimentación (Speker, 1988; Tagawa y Hirano, 1990; De Jesus y Hirano, 1992).

Juvenil. Durante este período ocurren cambios significativos en las concentraciones circulantes de HTs en respuesta a las migraciones. Estos cambios son más evidentes en especies eurhalínicas y durante la esmoltificación (cambios de salinidad durante la migración). En este período, que implica importantes cambios estructurales y funcionales, las concentraciones circulantes de T₄ oscilan de 0.8 a 1.0 ng/ml y se ha sugerido que las HT tienen un papel

preadaptativo que prepara al individuo para un nuevo habitat y explotar las nuevas fuentes alimenticias (Speker, 1988; Tagawa y Hirano, 1990; De Jesus y Hirano, 1992).

Adulto. Por razones obvias este es el período ontogenético mejor estudiado. La producción de las HTs puede ser alterada por diferentes factores. Por ejemplo la TSH aumenta todos los aspectos de la función tiroidea, mientras que la alimentación y el aporte de yodo en la dieta, la temperatura y otras hormonas, afectan sus vías metabólicas. La variación de concentraciones de T4 en respuesta a TSH no está influenciada por estados nutricionales u otros factores como el estrés (Eales, 1981). A continuación se resume la información mas relevante al respecto.

2.3 ASPECTOS FUNCIONALES

Las HTs tienen efectos en la actividad del sistema nervioso, la reproducción, la osmoregulación y los movimientos migratorios en los peces. Por otra parte la función tiroidea se modifica significativamente por el ciclo luz oscuridad (fotoperíodo). Esta diversidad de actividades sugiere que en los peces, las HTs juegan un papel fundamental en la activación y modulación de diferentes actividades metabólicas como son, por ejemplo, la calorígenesia, el crecimiento y en el metabolismo de proteínas, lípidos y carbohidratos.

Efectos en el Sistema Nervioso. Los efectos neurofisiológicos y conductuales de las HTs se han analizado en salmones, carpas doradas, truchas y otros. Cuando se sumergen salmones y peces dorados en soluciones con HTs aumenta su comportamiento locomotor y su conducta de alimentación. Los salmones aumentan el movimiento pero disminuyen el aprendizaje. En truchas bajo condiciones de aprendizaje, por ejemplo enseñarles a operar una palanca que dispara alimento, la administración T3 aumenta el número de veces que presionan la palanca. Estos y otros resultados señalan que la T4 tiene una acción facilitadora de eventos sinápticos en el cerebro medio tectal (Matty, 1985; Olmenjanluk y Eales, 1985).

Influencia de las HTs en la Reproducción. En carpas doradas intactas la tiroxina estimula el desarrollo ovárico, pero no tiene influencia en adultos hipofisectomizados de larga evolución (atrofia o regresión gonada). En carpas doradas, la respuesta ovárica a gonadotropinas de salmón se ve aumentada con la administración de T4, observándose un aumento en los ovocitos vitelogénicos, por lo que es posible que la tiroxina actúe sinérgicamente con la gonadotropina. Por su parte, las hormonas gonadales, i.e., los andrógenos, modifican la función tiroidea actuando sobre el hipotálamo y alterando el metabolismo periférico de las hormonas tiroideas. La testosterona aumenta la Vmax de la 5'D mientras que los estrógenos la disminuyen (Mc Latchey y Eales, 1988). También se ha propuesto que los efectos anabólicos de los andrógenos pueden estimular la función tiroidea de manera secundaria y finalmente que los andrógenos estimulan directamente a las células tiroideas (Matty, 1985; Cyr y Eales, 1988; Lundqvist, y col 1989). Además, la FSH y LH

heterólogas (mamíferos) aplicadas a peces, estimulan la actividad tiroidea y como en el resto de vertebrados el cortisol aumenta las concentraciones de T₄ (Brown y col, 1991). La GH tiene efectos tirotrópicos (Matty, 1985; Cyr y Eales, 1988).

Movimientos Migratorios y Osmorregulación. En los peces, al igual que en otros vertebrados las concentraciones circulantes de HTs se han relacionado con cambios en los patrones reproductivos, las temporadas de hibernación, las migraciones y los cambios en el medio externo. En las truchas arcoiris del lago Ontario ocurren variaciones estacionales tanto en peces inmaduros como en maduros. Las concentraciones plasmáticas de HTs exhiben dos aumentos pronunciados ("picos") a lo largo del año (Osborn y col, 1978), mientras que los salmones solo presentan un "pico" de T₄ y de T₃. En las truchas las concentraciones aumentan en el otoño alcanzando un máximo en noviembre. Durante este período aumenta la proporción T₄/T₃ lo que denota un descenso en el metabolismo hepático de la T₄, o posiblemente una menor utilización periférica. En la primavera las concentraciones hormonales vuelven a aumentar, pero la proporción T₄/T₃ permanece sin cambios. Es difícil relacionar estas variaciones estacionales con la función de la tiroides, particularmente cuando la proporción T₄/T₃ también cambia estacionalmente. Se ha sugerido que este patrón bianual es característico de los teleosteos; el "pico" de otoño-invierno está relacionado con la temperatura, el "pico" de primavera está relacionado con la reproducción. Además se ha encontrado que en la trucha arcoiris los valores plasmáticos de T₄ están inversamente relacionados con la temperatura (Osborn y col, 1978; Gordon, 1988; Eales y col 1982; Burke, 1983; Eales 1985).

Además de esta dependencia con las variaciones estacionales, la reproducción y la alimentación (Eales y col 1980; Leatherland 1982), existen sin lugar a dudas cambios en la actividad tiroidea asociados a los cambios migratorios, la salinidad del medio, y los procesos preparatorios que ocurren en los salmónidos antes de la migración al mar (esmotificación). En truchas arcoiris adaptadas al agua marina e inyectadas con TSH, las concentraciones plasmáticas de Na⁺ y Cl⁻ disminuyen transitoriamente. También en los teleosteos hipofisectomizados, la capacidad de sobrevivencia en agua dulce es nula y deben mantenerse con 1/3 de agua salada. Aunque la administración de T₄ aumenta la actividad de algunas enzimas relacionadas con el flujo de sodio; vgr. acetilcolinesterasa y la ATPasa Na-K dependiente de branquias, la administración de TSH no les permite sobrevivir en agua dulce a diferencia de como sí lo hace la prolactina.

Independientemente de las relaciones entre las concentraciones plasmáticas de HTs y la esmotificación, y aunque el medio salino tiene un efecto indirecto en la actividad tiroidea, en los teleosteos no existen evidencias de que las HTs regulen el balance iónico y osmótico. El aumento transitorio de HTs (T₄ y posiblemente T₃) puede determinar el inicio de la adquisición de euhialinidad seguido de un período largo de tolerancia a agua marina. La caída de T₄ coincide con la mayor actividad de la ATPasa en las branquias y es cuando se alcanza la máxima capacidad

adaptativa al ambiente marino. Además se sabe que cuando los peces son expuestos a corrientes de agua se disparan "picos" de T3 y T4 [T4 de 8.9 a 19.4 ng/ml y T3 de 4.9 a 5.4 ng/ml] probablemente como resultado de una mayor actividad motora (Youngson y MacLay, 1989). Por otra parte, las HTs facilitan la acción de otras hormonas como la GH, la cual a su vez estimula la desyodación T4 → T3. No se sabe si el efecto de la GH es directo o indirecto (somatomedinas) (Eales, 1990; Boeuf y Le Bail, 1989 y 1990; MacLatchy y Eales 1990)

Fotoperíodo. Además de las fluctuaciones estacionales, las concentraciones circulantes de HTs exhiben un ritmo circadiano cuya acrofase (hora de valores máximos) varía. En carpas doradas ocurren a las 16:00 hrs y en las truchas arcoiris a las 20:00 hrs. En los mamíferos se ha sugerido que estas variaciones circadianas de las HTs pueden ser causadas por regímenes de ayuno-alimentación, pero no hay evidencias de que esto ocurra en peces (Tagawa y Hirano, 1987; Cook y Eales, 1987; De Jesus y Hirano, 1990). Se conoce poco acerca de este ritmo, tal vez se encuentra relacionado con los ritmos de cortisol y prolactina, o de alguna forma con la termoregulación (Matty, 1985; Cyr y Eales 1988). En este contexto, la relación inversa entre HTs y temperatura está a su vez relacionada con el crecimiento máximo del individuo a temperaturas óptimas.

Efectos Calorigénicos. Aunque se conoce la cinética de las HTs gracias a los trabajos de Eales (Eales y col, 1982), no se puede decir lo mismo sobre su acción calorigénica a nivel periférico. Hasta la fecha, no hay acuerdo sobre este importante aspecto de la fisiología tiroidea de los peces. Así, mientras que la respiración celular solo aumenta con la administración de dosis farmacológicas de T4, el empleo de PTU y otras drogas antitiroideas deprimen el consumo de oxígeno. Las mitocondrias aisladas de hepatocitos de truchas tratadas con tiroxina muestran una reducción en la eficiencia de la fosforilación y un aumento en la actividad específica del sistema oxidativo enzimático (Massey y Smith 1988). Además, las dosis efectivas son menores que las requeridas para obtener la misma respuesta en mamíferos (Matty y col, 1982). De acuerdo a algunas interpretaciones, la desacoplación de la fosforilación oxidativa aumentaría el consumo de oxígeno para generar así la misma cantidad de energía química utilizable (ATPs). Sin embargo, existen resultados contradictorios y así por ejemplo, en peces tireoidectomizados no se ha logrado establecer la relación antes propuesta entre HTs y respiración celular (Gorbman, 1969; Matty y col 1982 y 1985).

Aún y cuando la controversia siga sin resolverse, si la acción calorigénica de las HTs en las aves y en mamíferos se ve como parte del proceso adaptativo asociado a la homeotermia al abandonar el medio acuático, parecería razonable que los poiquilotermos (como los peces) no muestren esta respuesta. Sin embargo, resulta menos razonable suponer que las HTs no participen en la regulación de la respiración celular.

Crecimiento. La relación crecimiento / metabolismo está bien demostrada. Así, en el caso de los peces, los tratamientos de inmersión e inyección de HTs promueven el crecimiento somatoponderal, y se ha comprobado que dentro de ciertos límites la respuesta es dosis dependiente, ya que las HTs en dosis elevadas son catabólicas. Esta respuesta a las HTs no excluye la posibilidad de que se trate de un efecto secundario mediado por la estimulación de la síntesis de GH; por lo que se requeriría utilizar animales hipofisectomizados o tiroidectomizados para comprobar que las HTs ejercen efectos directos a nivel del tejido muscular y óseo. La Tiroidectomía es imposible de realizar en la mayoría de especies de peces óseos por la naturaleza difusa de la glándula. Sin embargo, utilizando radiotiroidectomía y drogas biogénicas como la urea se ha demostrado un retardo del crecimiento en salmones y truchas, aunque estos métodos se pueden criticar por su efecto tóxico. Por otra parte en los peces hipofisectomizados la T4 o la T3 no son capaces por sí solas de promover el crecimiento y requieren de GH u otros factores locales promotores del crecimiento (NGF, factor insulinoide (IGF), somatomedinas). En este contexto y como ya se mencionó, las HTs estimulan la transcripción y traducción de GH y proteínas (Matty, 1982 y 1985). Las HTs también aumentan la concentración de aminoácidos libres en el plasma, así como la desamidación y la excreción de nitrógeno. También participan en el metabolismo de los lípidos y carbohidratos. Estimulan la movilización de lípidos, disminuyen la concentración de glucógeno en el hígado, aumentan los niveles de glucosa en la sangre, mientras que aumentan el glucógeno en el corazón y en el músculo. También aumentan la oxidación de glucosa hepática y la actividad de la citocromo oxidasa. En conjunto estos efectos de la HTs pueden contribuir a aumentar el contenido y la disponibilidad de proteína que participan en el crecimiento del organismo.

Dieta y Temperatura. Al igual que el resto de vertebrados, en los peces tanto el ayuno como la reducción de ingesta de calorías deprimen la función tiroidea y la conversión de T4 a T3 (Eales y Higgs 1977; Flood y Eales, 1982). Este efecto se revierte con la realimentación y al cabo de las 4 hrs se observan elevaciones hormonales significativas en las truchas arcoiris. Además, la función tiroidea depende del contenido de carbohidratos en la dieta y no de proteínas o lípidos (Hlmick y col 1991). Durante el ayuno las truchas acumulan yodotironinas y sus conjugados en la vesícula biliar. Durante la realimentación este bolo de yodotironinas se descarga en el intestino.

En truchas arcoiris el ayuno crónico se acompaña de concentraciones circulantes significativamente menores de T4 y T3 y la actividad 5D hepática está disminuida, mientras que las concentraciones circulantes de GH están aumentadas, se ha sugerido que estos cambios protegen la degradación tisular cuando el animal se encuentra en un estado catabólico crónico (Leatherland y Fabridge 1992).

La bien conocida dependencia de los poiquilotermos de la temperatura del medio se acompaña de cambios en las concentraciones circulantes de HTs. Así, por ejemplo, en la trucha arcoiris mantenida a 19°C los valores plasmáticos de T4 se encuentran aproximadamente de 1.1 ng/ml. Estos valores se elevan conforme disminuye la temperatura; alrededor de 2.5 ng/ml cuando la temperatura es de 11°C, y de 4 ng/ml con temperaturas de 5°C (Koburke y col 1987; Oppenheimer, 1992). Estos datos podían indicar que en los peces al igual que en lo homeotermos, la exposición al frío estimula la función tiroidea, la cual está estrechamente relacionada al gasto metabólico o al consumo energético del organismo. Sin embargo no hay evidencias que sugieran que las demandas metabólicas sean las mismas en diferentes temperaturas, y de hecho existen datos que indican que durante la adaptación a bajas temperaturas el metabolismo está marcadamente reducido (Hochachka y Somero 1989).

Efectos en la Piel. Se conoce la estimulación de las HTs en la piel de vertebrados; i.e. en la muda de reptiles y la coloración y diferenciación del plumaje en aves. En los peces se ha demostrado que aumentan la acumulación de pigmentos y de cristales de guanina: por ejemplo, el tratamiento con HTs aumenta el color plateado de los salmones. Además provocan la concentración de xantóforos y la dispersión de melanóforos en otros peces. En truchas radiotiroidectomizadas aumenta la pigmentación de melanina, esto se da por un aumento de melanóforos por unidad de área de piel. En carpas al utilizar tiouracilos aumenta la pigmentación de la piel (Sembart, 1956); en salmones los bociógenos no afectaron la pigmentación de la piel (Dales y Hoar 1954; Gorbman, 1969).

En todos los peces las HTs provocan el engrosamiento de la epidermis. Este efecto contrasta con el adelgazamiento (reducción) de la epidermis que se observa en los mamíferos después de administrar HTs (Massey y Smith 1968; Matty 1985). Así, en truchas radiotiroidectomizadas, ocurre un adelgazamiento de la piel (elementos epidermales y dermales), que se corrige con tratamientos con T4 (Gorbman, 1969). Además de los efectos intergumentarios la T4 también aumenta la proporción del pigmento porfiropsina visual en la retina (Matty y col 1982).

2.4 ACTIVIDAD DESYODATIVA EN PECES

A diferencia de los mamíferos, en los peces parece ser que la mayor parte de la T3, y quizás toda, se genera en los tejidos periféricos por la actividad enzimática de la familia de desyodasas. Entre 1985 y 1986 dos grupos de investigadores mostraron de manera independiente que en la trucha, la administración de TSH estimula la liberación de T4 pero no de T3. Este hallazgo implicaba que la T3 no se producía en la tiroides sino que provenía de la conversión extratiroidea de T4 a T3. Así, en el hígado de los salmónidos y anguillas más del 85% de la T4 se convierte a T3 (De Luza y Leloup, 1984; Tagawa y Hirano, 1987; Eales, 1990).

Actividad 5'D

En los peces, la actividad 5'D se ha estudiado en fracciones microsomales de diferentes tejidos, como se mencionó anteriormente es la vía responsable de la producción extratiroidea de la T₃ (Shields y Eales, 1986). La administración de T₃ a truchas arcoiris provoca la disminución de la V_{max} de la 5'D hepática y por tanto la producción de T₃ para exportación, lo que refleja una regulación de las desyodasas para mantener los niveles de HTs constantes (Eales y Finnaon, 1991).

En diversos órganos de la trucha arcoiris se han descrito las constantes cinéticas de la actividad desyodativa 5'D que se muestran en el CUADRO 4. Se utilizaron concentraciones bajas (0.08-1.3 nmo/L) y altas (1.6-25nmo/L) de T₄ y se identificaron dos sistemas 5'D diferentes. La actividad 5'D baja ocurre en el hígado, bránquias y músculo pero no en riñón ni en eritrocitos. En éstos tejidos, el pH óptimo es de 7 y la concentración de DTT de 7 a 10 mmo/L. La enzima es sensible al PTU y el DTT afecta la Km y la V_{max}, todo lo cual les permite sugerir que se trata de un mecanismo catalítico de "ping-pong". En contraste, la actividad 5'D alta se presentó sólo en hígado (pH 7, DTT 15 mmo/L) y riñón (pH 6, DTT 8 mmo/L). Esta actividad no es inhibida por el PTU y el DTT afectó la V_{max} pero no la Km, lo que representa un mecanismo de tipo secuencial. Los autores de este estudio concluyen que por lo menos existen dos tipos de enzimas 5'D que difieren en su distribución tisular, en la afinidad del sustrato (T₄) y en el mecanismo catalítico. Igualmente destacan que estas no se parecen a las formas 5'D descritas para vertebrados superiores, y que la 5'D alta se parece a la tipo II y la 5'D baja se parece a la tipo I. Esta última puede ser la principal vía desyodativa porque opera en el intervalo de las concentraciones fisiológicas de la T₄ en peces (MacLetchy y Eales, 1992).

CUADRO 4. CONSTANTES CINÉTICAS DE LA ACTIVIDAD 5'D EN DIFERENTES TEJIDOS DE LA TRUCHA ARCORIS

Tejido	Sustrato T ₄ (nmo/L)	Km X ± SEM	V _{max} X ± SEM	V _{max} /Km
5'D BAJA				
Hígado	0.08 - 1.3	0.098 ± 0.0008	3.74 ± 0.050	38.2
Músculo	0.08 - 1.3	0.198 ± 0.0005	0.79 ± 0.004	4.0
Branquias	0.08 - 1.3	0.168 ± 0.0003	0.62 ± 0.004	3.7
5'D ALTA				
Hígado	1.6 - 25	10 ± 0.76	8.21 ± 0.220	0.82
Riñón	1.6 - 25	14.7 ± 0.62	5.76 ± 0.090	0.37

Los valores corresponden a la doble recíproca de la actividad total, de dos lotes de tejidos diferentes. Las unidades de Km se expresan en nmo/L; y las de V_{max} en pmol/mgproth (MacLetchy y Eales 1992).

Por otra parte, en el hígado de otro teleosteo (*Ilapia Oreochromis niloticus*) se ha descrito una desyodasa 5' con propiedades de tipo I y tipo II. Las semejanzas con la tipo I son que el sustrato preferencial es rT3 y la Km está en el rango nmo/L de DTT. La reacción sin embargo no se inhibe con PTU ni con tioglucosa áurica, las cuales son propiedades más parecidas a la desyodasa tipo II (Mol y col 1993; St Germain, 1994).

Actividad 5D

Hacia principios de la década de los años 80 surgió una controversia respecto a la existencia de rT3 en peces y de la vía desyodativa correspondiente. Esta controversia fue provocada por los estudios de Eales y col, 1983, que es uno de los más importantes en el campo de la fisiología tiroidea en peces. Estos investigadores analizaron las concentraciones plasmáticas de rT3 en la trucha arcoiris utilizando dos métodos 1) Un Kit comercial para humano (Lab Serono) y 2) columnas en miniatura de Sephadex G-25 (Eales y col 1983). Utilizando el estuche comercial detectaron concentraciones circulantes de la hormona pero no observaron paralelismo entre las diluciones del suero de pez y la curvas estándar, lo cual lo atribuyeron a "sustancias que interfieren en la asociación del Anticuerpo con rT3". Empleando las columnas, la interferencia se minimiza. Con este último método, registraron valores de 40 pg/ml, pero los invalidaron puesto que estas concentraciones no disminuyeron cuando se hacían diluciones. También estudiaron la velocidad de eliminación metabólica de la rT3 por vía enterohepática y encontraron valores semejantes a los de mamíferos (7.7 ml/h/100g), lo cual lo explicaron por la débil unión con proteínas plasmáticas (Eales y col, 1983). En este mismo trabajo analizaron la actividad desyodativa al inyectar ¹²⁵I-rT3 y posteriormente cuantificando la cantidad de radioyodo liberado; o bien, al inyectar ¹²⁵I-T4 y midiendo la formación del producto rT3 mediante el método de cromatografía en columnas de Sephadex. Con ambos procedimientos los resultados fueron negativos. Los autores comentan lo siguiente: "La generación insignificante en los experimentos de doble isótopo indican que no existe desyodación en el anillo externo o fenólico en la degradación de la rT3. Esto contrasta con mamíferos donde la desyodación a 3,3'T2 representa la ruta mayor de degradación de rT3.". Como se puede apreciar la elección de los métodos para valorar los niveles hormonales de rT3 o la actividad enzimática no son los adecuados, por ejemplo: se sabe de la importancia de un RIA homólogo para la valorización de hormonas; con las columnas no reproduce las condiciones naturales (no añade sueros) y no da un tiempo óptimo para que se formen los complejos Antígeno-Anticuerpo. Con respecto a sus métodos para el análisis de la actividad enzimática, eligieron erróneamente el sustrato (el preferencial es T3) y en su explicación está considerando la desyodación en el anillo externo en vez del interno. Aunque concluyen que sin estudios *in vitro* no

se puede excluir la producción extratiroidea de rT3, también señalan que bajo las condiciones utilizadas las truchas no tienen rT3 ni la vía desyodativa correspondiente.

Sin embargo, entre 1990 y 1991 y de manera independiente, se reportó la presencia de rT3 en el suero de mojarra (*Tilapia nilotica*) utilizando estuches comerciales (Byambugu y col 1990), y en el suero de truchas arcoiris (Fenton y col, 1991) utilizando un RIA homólogo.

Posteriormente, Sweeting & Eales en 1992 (a y b) publicaron dos artículos en los cuales analizaron los productos de desyodación en fracciones microsomales hepáticas de truchas arcoiris utilizando HPLC o cromatografía en Sephadex LH-20. En el primer estudio (a) no detectaron rT3 ni T2 (3,3'), y concluyeron que en las truchas mantenidas a 12°C las principales vías desyodativas están dirigidas hacia el anillo externo para producir T3 a partir de T4, sin detectar la desyodación del anillo interno de T3 o T4. En el segundo estudio (b) analizaron la influencia que la administración de HTs tiene sobre las vías desyodativas, en truchas tratadas con T3 para elevar las concentraciones plasmáticas de esta hormona, se observó que el hígado produce rT3 a partir de T4. Los hallazgos de este estudio los llevó a proponer que existe una compleja regulación donde la T3 suprime la desyodación T4 → T3 y promueve la desyodación hacia rT3 y la desyodación 5'D en el anillo externo de la T3. Así, por ejemplo, en los peces piscívoros que comen huevos con elevadas concentraciones de HTs, la T3 puede disparar ese mecanismo de autorregulación que evitaría la generación de T3 en cantidades excesivas (catabólicas). Lo que representa un mecanismo de regulación periférica de HTs. Un mecanismo semejante operaría en las truchas en cautiverio cuya alimentación con CHOW se sabe que contiene elevadas concentraciones de HTs (Eales y col 1981).

En base a lo anterior Morin y col, 1993 propusieron que en salmones se puede producir rT3 cuando se presenta el "pico" de T4 anterior a la esmoltificación, cuantificaron la actividad desyodativa en el anillo externo (ORD o 5'D) y el interno (IRD o 5D) fracciones microsomales de diversos órganos de salmón, observaron que se da un aumento de la actividad ORD o 5'D en hígado, corazón y cerebro, en branquias y músculo esquelético no aumenta, y que en el cerebro también se presenta la actividad IRD o 5D. Dado que en la esmoltificación es cuando se da un desarrollo del tamaño y actividad del cerebro, los autores proponen que la actividad enzimática varía estacionalmente en la esmoltificación y la post-esmoltificación dándose un sistema de regulación interna al aumentar los niveles de T4 y se genera una protección para el cerebro contra concentraciones excesivas de T3.

Posteriormente Eales y col 1993 cuantificaron la actividad en fracciones microsomales de varios tejidos de salmones con esmoltificación inducida por el fotoperíodo. Al utilizar como sustrato a la T3 y la rT3, encontraron que la desyodación de la T3 se da exclusivamente en el anillo interno, lo que permite una regulación de las concentraciones plasmáticas, por el contrario, la rT3 se desyoda en el anillo externo. Sugieren que existen dos enzimas por separado que regulan las dos vías, siendo la 5'D parecida a la tipo II de mamíferos y la 5D parecida a la tipo III.

Recientemente Parry, Zhang y Eales, 1994 cuantificaron el contenido de HTs en la orina de truchas arcoiris, encontraron T3, T4 en formas nativas y conjugadas y rT3. Con respecto a esta última, afirman que sólo se puede presentar bajo ciertas condiciones, pero que esta tironina no se genera bajo condiciones fisiológicas normales.

Actividad Enzimática, Temperatura y Adaptación. Las adaptaciones a los cambios de temperatura del entorno físico, tienen un papel importante en la determinación de los patrones de la distribución de las especies. La temperatura afecta la estructura y función de las proteínas, además de ser una fuerza selectiva importante en la evolución de las mismas (Somero, 1978; Hochachka y Somero, 1973, 1984). Se conocen diferentes formas de adaptación inmediata en la actividad enzimática, las cuales dependiendo de la dirección del cambio se denominan regulación térmica positiva o negativa. Por otra parte, se sabe que la actividad enzimática también exhibe cambios estacionales semipermanentes o transitorios, denominados genéricamente cambios de aclimatación. Finalmente, también se postula que en la actividad enzimática existen cambios permanentes cuya instalación requiere de muchas generaciones para alcanzarlos (Hochachka y Somero 1969).

Numerosos estudios en los poiquilotermos han mostrado que algunos, pero no todos los sistemas enzimáticos son susceptibles a la regulación térmica positiva. En la trucha arcoiris la actividad de enzimas como la acetilcolinesterasa, la piruvato-cinasa (PyK), la lactato deshidrogenasa, etc., aumenta significativamente al disminuir la temperatura y esta mayor actividad es secundaria a un incremento en la afinidad enzima-sustrato o enzima-cofactor (E-S o E-C). Los cambios en la capacidad de acoplamiento E-S, son un medio por el cual se establecen los límites de tolerancia térmica de los organismos (López-Lemus, 1994). También se conoce que en un mismo tejido, existen dos o más variantes de una enzima, cuyas características cinéticas abarcan un amplio intervalo de temperaturas. En esta forma es posible promover una función enzimática térmicamente independiente sobre un amplio rango de temperaturas, que no sería posible si sólo estuviera presente una sola forma enzimática. Además, desde el punto de vista bioquímico, lo que es único en estos sistemas es que las variantes enzimáticas detectadas en estudios cinéticos no son isoenzimas en el sentido clásico de variaciones en la estructura primaria. Se trata de isoformas (alteraciones en el sitio de acoplamiento como consecuencia de variaciones térmicas) que se expresan en cada caso de manera específica. Así, durante la aclimatación se induce la producción de estas isoformas que permiten una compensación fisiológica a los cambios térmicos del hábitat. Específicamente, en las truchas, las K_m mínimas para las isoformas "calientes" y "frías" de la acetilcolinesterasa y de la PyK son esencialmente iguales, pero las V_{max} difieren sustancialmente. Esto representa una ventaja adaptativa, pues permite al organismo

disponer de un intervalo amplio para la regulación de la actividad catalítica (Hochachka y Somero, 1969).

Estos estudios han llevado a concluir que aunque la eficacia de control en un sitio dado puede variar con la temperatura, en términos generales, las propiedades regulatorias de las enzimas en poiquilotermos parecen ser altamente insensibles a los cambios de temperatura. En el caso de las variables "calientes" de enzimas con bajas temperaturas se requieren cambios muy grandes en las concentraciones de sustrato. Esta condición no es lo que permite un control en el rango de las reacciones. En términos evolutivos, existe una selección de enzimas que tienen valores de K_m que permiten cambios de actividad en respuesta a cambios fisiológicos en las concentraciones de sustrato, esto se refleja en patrones de variantes enzimáticas producidas durante la aclimatación y la evolución adaptativa. Se pueden visualizar diferentes isotipos producidos en la aclimatación que comparten propiedades de K_m necesarias para retener el control de la actividad catalítica. Sin embargo los efectos de estos cambios pueden variar entre las enzimas dependiendo de la concentración absoluta de las isoformas "frías" y "calientes".

Por otra parte, se sabe que además de los ajustes metabólicos compensatorios como el aumento en la tasa de glucólisis (5 veces) y lipogénesis (12 veces); así como el aumento en la síntesis de glucógeno, proteínas y ácidos nucleicos, los cambios de la temperatura también provocan una reestructuración biofísica y bioquímica de muchos componentes celulares y tisulares para que operen bajo este nuevo régimen térmico impuesto al organismo. Esta reestructuración incluye componentes como proteínas de membrana, ribosomales y de transporte que son esenciales para el proceso mismo de reestructuración. Así, en el caso de los lípidos de membrana y durante la exposición al frío tienden a aumentar el grado de insaturación de ácidos grasos. Como muchas enzimas están asociadas a membranas es posible que la nueva membrana y los nuevos isotipos estén altamente relacionados (Hochachka y Somero 1969).

Con respecto a los cambios permanentes se sabe que las especies adaptadas al frío parecen poseer mayores concentraciones de enzimas que las especies adaptadas al calor. Además, como se mencionó en el caso de los cambios en la aclimatación, la K_m de todas las variantes de una enzima es similar a diferentes temperaturas, esto crea una estabilidad termal en el rango de las temperaturas de un hábitat y sugiere que la K_m se ajusta para permitir valores regulatorios óptimos de la función enzimática.

Este alto grado de la conservación en K_m se ha estudiado en enzimas NAD-dependientes (lactato deshidrogenasa LDH) purificadas del músculo blanco de tres especies de sardinas habitantes de diferentes entornos térmicos del golfo de California, en México. En las tres especies, los valores de las K_m fueron extremadamente similares para LDH, este alto grado de conservación en la K_m en las diferentes especies, a su temperatura corporal particular, ha sido interpretado como una adaptación que asegura que las enzimas retengan cierta capacidad para aumentar su tasa de

catálisis cuando la concentración de sustrato aumenta durante activaciones metabólicas por ejemplo durante ejercicio vigoroso (López-Lemus, 1994). Así, estabilizando los valores de K_m dentro de un intervalo cercano o, de alguna forma, mayor que las concentraciones fisiológicas del sustrato, la enzima será capaz de obtener una fracción significativa de su velocidad potencial (V_{max}) bajo condiciones fisiológicas constantes e incrementar su actividad al aumentar los niveles de sustrato (Feraht, 1977; Hochachka y Somero, 1984).

Todo lo anterior juega, definitivamente, un papel importante en la determinación de los patrones biogeográficos de las especies involucradas, pues la adaptación de los sistemas metabólicos es un factor crítico en la colonización de un hábitat térmico único.

Planteamiento del problema

Como se ha revisado, la presencia de rT₃ en el suero de los teleosteos es controvertida. En la década de los años 80s el trabajo del grupo más influyente en el campo sostenía que esta tironina era virtualmente indetectable en el suero de la trucha arcoiris. Sin embargo, prácticamente una década más tarde, Byamungu y col, 1990 y Fenton y col, 1993 informamos la presencia de rT₃ en dos especies de teleosteos. Estas discrepancias obedecen principalmente a problemas metodológicos. Diferentes laboratorios incluyendo el nuestro han señalado la importancia de un RIA homólogo para medir las concentraciones circulantes de THs (Hoar, 1959; Aceves y col 1982; Stringer y Wynford-Thomas, 1982).

Por otra parte, el estudio de las vías y enzimas desyodativas en los peces apenas se inicia y nuevamente existen incongruencias con respecto a la información correspondiente en otros vertebrados. Así, en el caso de la vía 5'D, la disponibilidad del cDNA para la enzima 5'D-I hepática de la rata ha permitido descartar la existencia de isoenzimas con baja y alta afinidad. Esta clasificación errónea depende primordialmente de las condiciones del ensayo (Chopra, 1982). Para el caso de la enzima 5D, los estudios son aún más recientes y apenas iniciaron en 1992. La actividad 5D se ha detectado principalmente en el hígado y el cerebro tanto de truchas (Sweeting y Eales 1992 b) como de salmones (Morin y col 1993). Las constantes cinéticas de la enzima hepática son semejantes a las reportadas para la rata (Köhrlé, 1992), y se propone que esta vía desyodativa es activa solamente bajo ciertas condiciones; vgr., dieta y esmoilificación (Sweeting y Eales 1992b; Morin y col 1993; Eales y col 1993).

Por todo lo anterior y dado que en todos los vertebrados estudiados hasta la fecha la piel es el tejido que exhibe la mayor actividad 5D, y es en este órgano en el cual esta vía se ha caracterizado (Tien-Shang y col 1985), la presente tesis en la que se utilizó la piel de la trucha arcoiris, se diseñó para alcanzar los siguientes:

IV

OBJETIVOS

1. - Demostrar la existencia de la rT₃ en el suero de la trucha arcoiris y estandarizar el RIA homólogo para su cuantificación.
2. - Describir las características de la vía enzimática que produce a la rT₃ (5D-III)
3. - Medir las concentraciones y la actividad enzimática 5D-III en la ontogenia de la trucha arcoiris.

MATERIAL Y METODOS

Peces. Se utilizaron truchas arcoiris *Oncorhynchus mykiss* (antes *Salmo gairdneri* (Smith y Stearley, 1989)) provenientes del Centro Acuicola "El Zarco" (Edo de México). Los animales fueron mantenidos bajo condiciones de fotoperíodo natural y alimentados *ad libitum* con concentrado comercial (Purina). El período de estudio abarcó las semanas 14 a 84 de edad y se llevó a cabo durante los meses de Julio de 1989 a abril de 1991. Durante este período, a intervalos de 28 ± 4 días de aproximadamente seis animales, se registró la talla (longitud furcal) y el peso corporal de cada individuo. Además, se obtuvieron de cada uno, muestras de piel, músculo (debajo de la aleta dorsal) e hígado (los cuales fueron congelados a -70°C para su análisis posterior). También se obtuvo de cada individuo sangre de la vena caudal, que fue mantenida a temperatura ambiente para su coagulación, posteriormente, esta se centrifugó (3,000 rpm X 15 min) y el suero fue fraccionado y almacenado a -20°C para la ulterior cuantificación de la rT₃, utilizando la técnica del Radioinmunoensayo (véase apéndice I).

Conejos: Se obtuvo suero de conejos *Oryctolagus cuniculus*, raza Nueva Zelanda de la vena central de la oreja. La sangre se dejó coagular a temperatura ambiente, posteriormente se centrifugó a 3,000 rpm, los sueros se guardaron a -20°C para su uso ulterior en el radioinmunoensayo de la rT₃, el suero de conejo se utiliza para asegurar la mayor formación de los complejos Antígeno- primer anticuerpo- segundo anticuerpo (véase apéndice I).

Ratas. Se utilizaron ratas Wistar adultas de 250 g. De las ratas macho se obtuvieron muestras de piel e hígado; de las hembras (3a semana de gestación) se obtuvieron las placentas. Los tejidos se almacenaron a -70°C hasta su uso ulterior.

Hormonas. Las tironinas no radiactivas se obtuvieron de Henning Chemie & Pharmwerk (Berlín). Las hormonas marcadas con ¹²⁵I se compraron a New England Nuclear (Boston MA). La actividad específica de estas últimas fue: rT₃, 1220 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$; T₄, 1400 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ y de T₃, 1500 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$.

Anticuerpos. El antisuero anti-rT₃ generado en conejos fue previamente obtenido en el laboratorio utilizando un esquema básico de inmunización con adyuvante de Freund y BSA (126). El antisuero anti gamma-globulina de conejo (segundo anticuerpo) se compró a Sigma (R-0881) y se utilizó una dilución inicial 1:20 (véase apéndice I).

Suero Hipotiroideo. El suero de truchas al cual se le removieron las HTs con carbón activado, el cual es indispensable para el RIA de rT3. (véase apéndice I).

Reactivos. - Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico.

Procedimientos Analíticos

Radioinmunoensayo (RIA). Aunque la cuantificación de las tiroxinas por RIA es un procedimiento prácticamente rutinario en el laboratorio, diferentes grupos han enfatizado la importancia de que este sea un RIA homólogo (Aceves, y Valverde, 1982; Stringer y Wynford-Thomas, 1982). Este aspecto no es trivial y el término homólogo implica que el sistema de análisis debe ser idéntico o al menos ofrecer las mismas condiciones del espécimen biológico en el cual naturalmente se encuentran las moléculas que se desea medir. Este requisito exige el empleo, en la curva estándar, de suero hipotiroideo de la especie animal que se estudia. Con esto, se garantiza en la medida de lo posible, que las interacciones de los componentes del sistema, serán iguales en la curva estándar y en las muestras problema (Chard, 1982, Ruiz, y col, 1984) (véase apéndice I).

Montaje: Se lleva a cabo por duplicado en tubos de vidrio de 0.7 x 7 cm e incluye los siguientes juegos de tubos: a) Unión no específica (UNE) solamente contienen suero hipotiroideo (S.H.) y hormona marcada, b) CERO (Bo): contiene 1^oAc, hormona marcada y S.H., c) Estándar :contiene 1^oAc, hormona marcada, S.H. y Estándar el intervalo utilizado fué: 1.56, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200 y 500 pg/100µl) d) Suero problema: contiene 1^oAc, hormona marcada y suero problema.

En el CUADRO 5 se resumen los volúmenes de los reactivos que se añaden a los diferentes grupos de tubos descritos.

CUADRO 5 REACTIVOS Y VOLÚMENES DEL RADIONMUNOENSAYO (RIA)

	Suero hipotiroideo	Estándar rT3 Tris-HCl	1 ^o Ac 1:300	¹²⁵ I-rT3 10pg/100µl	Suero problema	Amortiguador +ANS (10 mg/10ml)
UNE	10 µl	-	-	100µl	-	390
CERO	10µl	-	100µl	100µl	-	290µl
Curva estándar	10µl	100µl	100µl	100µl	-	190µl
Suero problema	-	-	100µl	100µl	100µl	200µl

- Tris-HCl: Amortiguador de TRIS [hidroximetil] aminometano. Sigma Lot 60H5614 (0.05 mol/L, pH 8.6)

- ANS: 8 Anilino 1-Naphthalene Sulfonic Acid. Sigma No A-3125

Procedimiento :

- Se montan los diferentes grupos, se agitan e incuban por 24 hrs a temperatura ambiente (T.A.)
- Posteriormente se añaden 10µl de suero normal de conejo (SNC)
- Se añaden 25µl de 2°Ac 1:20
- Se incuba por 45 min a temperatura ambiente.
- Se añade PEG 20% (Polietilenglicol), para precipitar la fracción "unida" de la "libre" que queda en el sobrenadante
- Se centrifuga 30 min a 3000 rpm
- Se separan las fracciones por decantación
- Se cuenta cada una por un minuto, utilizando un contador de radiactividad gamma Beckman (gamma 5500)

En la presente tesis la estandarización del RIA para cuantificar las concentraciones de rT3, incluyó la evaluación de los siguientes parámetros:

1) Reproducibilidad

Se realizaron 13 curvas patrón para calcular la reproducibilidad y sensibilidad del ensayo

2) Paralelismo

Se realizaron diluciones sucesivas de suero de trucha para determinar el paralelismo así como para observar el comportamiento de los puntos dentro de la curva.

3) Especificidad

Se evaluó contra las tironinas activas T3 y T4 para conocer la especificidad del ensayo y el grado de inmunoreactividad cruzada de éstas hormonas.

4) Exactitud

Con el suero hipotiroideo de truchas se adicionó una cantidad conocida de hormona (rT3). La cantidad obtenida se espera que sea equivalente a la adicionada.

5) Volumen de la muestra problema

Se experimentó con dos volúmenes diferentes (50 y 100 µl) para establecer el volumen óptimo para la detección.

El Control de Calidad incluyó la evaluación de los siguientes puntos

1. - Cuantificación de la unión inespecífica (UNE) o daño.
2. - La pendiente de la curva a una concentración cero de Ag y 50% del punto de inhibición.
3. - La dosis de estándar al 50% del punto de inhibición.
4. - La variación inter-ensayo.
5. - La variación intra-ensayo.

Las representaciones gráficas de los ensayos se hacen de la siguiente forma: En las ordenadas se representan los valores B/B₀ que son calculados como el valor porcentual que el % U/T (unido/total) significa con respecto a la unión específica (CERO) y en las abscisas se grafican las diferentes concentraciones de hormona con sus respectivos logaritmos decimales (log). Donde el porcentaje U/T es el resultado de la siguiente expresión:

$$\%U/T = \frac{\text{cpm "unidas" - cpm "unidas" del UNE}}{\text{cpm totales - cpm "unidas" del UNE}} \times 100$$

Esta gráfica se utiliza para establecer las concentraciones de antígeno en la muestra problema por medio de interpolación. De los resultados obtenidos se realizaron los siguientes cálculos: media (\bar{x}); Desviación estándar (s); Error estándar (σ); Error estándar ($E.S. = s/\sqrt{n}$) y coeficiente de variación ($C.V. = s/\bar{x}$).

RIA de T₃ para cuantificar de la actividad 5D-III

Se realizó la incubación *in vitro* basándose en el método descrito por Tien-Shang Huang y col, 1985. En breve, el procedimiento consiste en añadir en tubos de vidrio de 0.7 X 7 cm lo siguiente :

- - 150 μ l de proteínas del tejido (360-960 μ g/ml);
 - - 150 μ l del cofactor (DTT 100 mmol/L) y
 - - 150 μ l de T₄ (0.2-1.0 nmol/L).
- El ensayo se incuba 3 h a 37 °C para piel de ratas, 1h a 37°C para placenta de rata y 3h a temperatura ambiente o 15°C para pieles de truchas. La reacción se detiene al agregar 900 μ l de metanol.
- Se agita y se centrifuga a 3000 rpm X 10 min
- Se separan el sobrenadante (sb) del precipitado (pp) por decantación.
- El sb se evapora utilizando una SAVANT (Speed Vac Concentrator)
- Posteriormente se resuspende en 200 μ l del amortiguador del RIA (Tris-HCl)
- Se monta el RIA en forma similar a cómo se describe anteriormente con las siguientes modificaciones: 5pg/100 μ l de ¹²⁵rT₃, 5 mg/10 ml de ANS y en la curva no se añade suero hipotiroideo. Los valores resultantes (pg/100 μ l) se utilizan para obtener la actividad específica que se expresa como: AE= ng (hormona producida)/mg prot/h.

Ensayo de la Actividad 5D-III. Todos los tejidos fueron homogeneizados con politrón en una dilución 1:10 utilizando HEPES tipo II (HEPES, 10 mmol/L; Sacarosa 0.32 mmol/L; EDTA, 1.0 mmol/L) pH 7.0. Posteriormente se centrifugaron a 3,000 rpm por 15 min. El sobrenadante (Sb) se fraccionó en volúmenes de aproximadamente 300 μ l y se guardaron a -70°C.

La actividad 5D-III se analizó utilizando dos diferentes métodos de detección. En el primer método se empleó la cromatografía descendente en papel (ver apéndice II)(Bellabarba, y col, 1988). Aunque más laborioso en comparación con el segundo método (RIA, ver apéndice I), la cromatografía es imprescindible puesto que permite identificar todos los productos de la desyodación y es posible comprobar la existencia de la vía 5D en los tejidos estudiados. Para el caso de la cromatografía, dependiendo del sustrato (T3 o T4), los resultados se expresan como la actividad específica de la enzima en nmol/L de T2 o de rT3/mg de proteína/hora, respectivamente (véase apéndice I). Para el RIA, los resultados se expresan en ng de rT3/mg de proteína/hora.

El esquema de flujo de la Figura 7 muestra las dos técnicas de ensayo empleadas. Para la optimización de una y otra se utilizó un conjunto de sobrenadantes de pieles de truchas de 41 a 84 semanas de edad. Esta optimización incluyó la caracterización de los siguientes parámetros (en el paréntesis se indica la técnica con la que fueron analizados):

- Intervalo de Proteínas [RIA]
- pH [RIA]
- DTT [RIA y Cromatografías]
- Sustrato preferencial (T3) [Cromatografías]
- Sustrato secundario (T4) [RIA y Cromatografías]
- Inhibidor PTU [RIA y Cromatografías]
- Temperaturas.[RIA]

Caracterización Cinética de la 5D-III en la Piel de la Trucha.

Una vez establecidas las condiciones óptimas del ensayo, se determinaron las constantes cinéticas de Michaelis-Menten (Km y Vmáx) (Leonard, 1988). En todos estos experimentos la actividad enzimática se cuantificó con RIA.

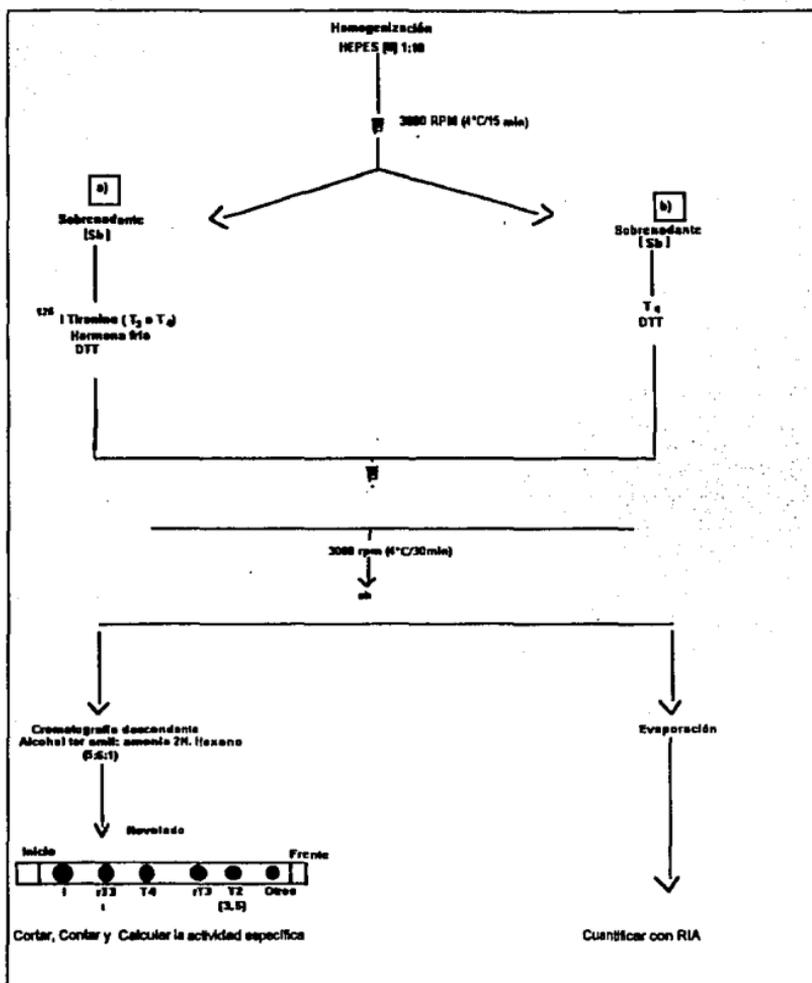


FIGURA 7. Técnicas Empleadas para la Cuantificación de la Actividad 5D-III. a) Al emplear Cromatografías descendentes en papel (Bellabarba, 1968). b) Al emplear RIAs. (Aceves y col, 1982; Stringer y Wyndorf-Thomas, 1982; Chard, 1982; Ruiz y col 1984).

Actividad 5D-III en la Piel de la Trucha. Aspectos Comparativos.

Una vez establecidas las condiciones óptimas para cuantificar la actividad 5D-III en la piel de la trucha, ésta se comparó con la de otros tejidos de mamíferos en los cuales la enzima 5D-III ya ha sido caracterizada: piel, hígado y placenta de rata (Cavaletti y col, 1977; Chopra y col 1978; Roti, 1981 y 1982; Kaplan, 1984; Tien-Shang y col, 1985; Yoshida y col, 1985; Emmerson y col 1988 a y b; Santini y col, 1992 a y b; Köhrle, 1992). En el caso de la piel de la trucha, se utilizó el conjunto antes mencionado. Para la rata se utilizaron conjuntos de tres animales adultos. Como se indica en la sección de resultados, la cuantificación de la actividad enzimática se realizó con uno u otro procedimiento [RIA y Cromatografías].

Actividad 5D-III en la Piel de la Trucha. Aspectos Ontogénicos

Concentraciones Circulantes de rT₃. Esta yodotironina se cuantificó individualmente en el suero de los individuos de las semanas 14 a 84 utilizando RIA. Los resultados se expresan en ng/ml.

Ontogenia de la Actividad 5D-III en la Piel de la Trucha. Para analizar la ontogenia de esta actividad enzimática se cuantificó en forma individual los sobrenadantes de pieles de truchas cuyas edades abarcaron de la semana 14 a la 84. Cada una fue medida por duplicado y la actividad se cuantificó con RIA.

Para el análisis de los aspectos ontogénicos se utilizó una regresión múltiple, con lo que se obtuvo coeficientes de correlación de los siguientes parámetros: concentraciones de rT₃, la edad, el peso y la talla. Con los anteriores se estableció una relación que nos permitió explicar la variación de la actividad específica en el intervalo de tiempo del estudio.

VI

RESULTADOS

Resultados del Radioinmunoensayo

Se muestran los resultados de 13 curvas En la FIGURA 8 y en el CUADRO 6.

CUADRO 6 PARÁMETROS OBTENIDOS DE LA CURVA PATRÓN.

Estándar	No.de datos	Media U/T (%)	(B/Bo) %	desviación estándar	error estándar
UNE	13	10.2	-	1.8	0.44
CERO	13	22.19	100	2.4	0.87
1.56	13	-	89.81	5.07	1.88
3.12	13	-	85.61	5.12	1.42
6.25	13	-	78.44	7.18	1.99
12.5	13	-	66.21	4.73	1.31
25	13	-	52.62	4.99	1.38
50	13	-	40.73	7.54	2.09
100	13	-	28.72	8.44	2.34
200	13	-	18.92	7.37	2.04
500	13	-	10.65	4.69	1.30

Especificidad

Esto se evaluó utilizando en el ensayo suero hipotiroideo de humano, al comparar estos resultados con los descritos en el cuadro 6 se observó que se pierde sensibilidad al utilizar suero hipotiroideo de humano.

	U/T (%)	B/Bo (%)
UNE	8.3	
CERO	30.2	100
1.56		100
3.12		98
6.25		88.7
12.5		79.09
25		78.7
50		60.57
100		42.8
200		17.4
500		14.3

Paralelismo.

Para comprobar lo anterior se preparó un suero agregado, (suero hipotiroideo con rT3 (=500pg)) y se realizaron diluciones sucesivas.

Dilución	Concentración esperada (pg/100 µl)	Concentración obtenida (pg/100 µl)	ES %
1:1	500	502.5	0.4
1:2	250	250.5	1.22
1:5	100	97.5	2.04
1:10	50	50	1.63
1:20	25	26.5	1.22
1:40	12.5	11.5	1.22
1:80	6.25	5.5	0.4
1:160	3.125	2.55	0.4
1:320	1.562	1.55	0.3

Cada uno representa la media de tres ensayos realizados por separado. ES: error estándar

Reactividad Cruzada.

Se realizó la evaluación utilizando T3 y T4 con los que se obtuvo lo siguiente:

T3 = 0.0005% al 50% de inhibición.

T4 = 0.002 % al 50% de inhibición.

Lo anterior se observa en la FIGURA 9.

Exactitud.

Se obtuvieron los siguientes resultados al utilizar tres diferentes concentraciones de hormona añadida al suero hipotiroideo

Estándar	rT3 añadida (pg/100 µl)	Obtenida (pg/100 µl)	ES %
Bajo	7.55	7.2	0.20
Medio	50	49.95	0.01
Alto	200	202	0.57

Cada uno representa la media de dos ensayos realizados por separado. ES: error estándar.

Por lo tanto la exactitud es del 97 al 99%.

Volúmen de suero problema.

Se probaron dos volúmenes diferentes:

Muestra	rT3	rT3
	pg/50 μ l	pg/100 μ l
1	7	14
2	6.8	11
3	5.0	9
4	6.8	15

Los valores obtenidos en el volumen de 100 μ l caen en el intervalo sensible de la curva por lo que se decidió utilizar este volumen en las muestras problema.

Los parámetros del control de calidad son:

UNE 10.2 ± 1.6 (% U/T)

CERO 22.19 ± 2.4 (% U/T)

Rango 1.56 a 500pg/100 μ l (ng/dl) cuyo rango sensible es de 3 - 200 pg/100 μ l.

Sensibilidad: 3 pg/100 μ l

Dosis estándar al 50% de inhibición: 30 pg

Variación intra-ensayo 5.6% (ES= 1.29).

Variación inter-ensayo 3.1% (ES= 3.1).

Exactitud: 97 - 99%

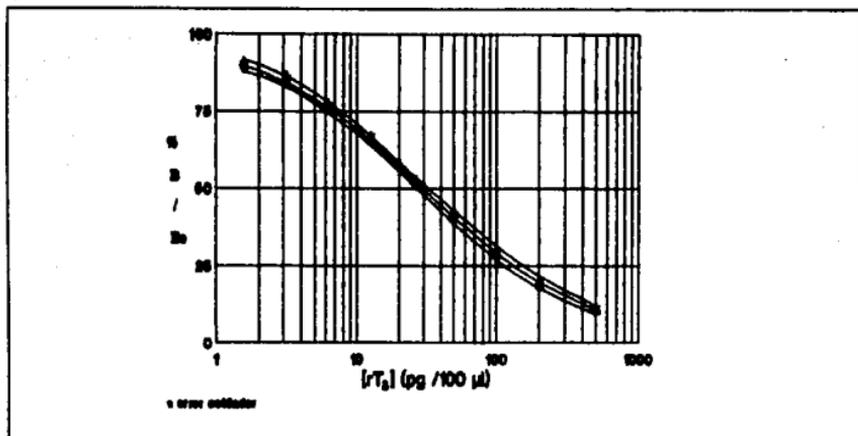


FIGURA 8. CURVA PATRON. Cada punto representa $n=13 \pm$ error estándar. Se aprecia que el intervalo sensible va de 3 a 200 pg y se tienen 50% de inhibición con 30 pg.

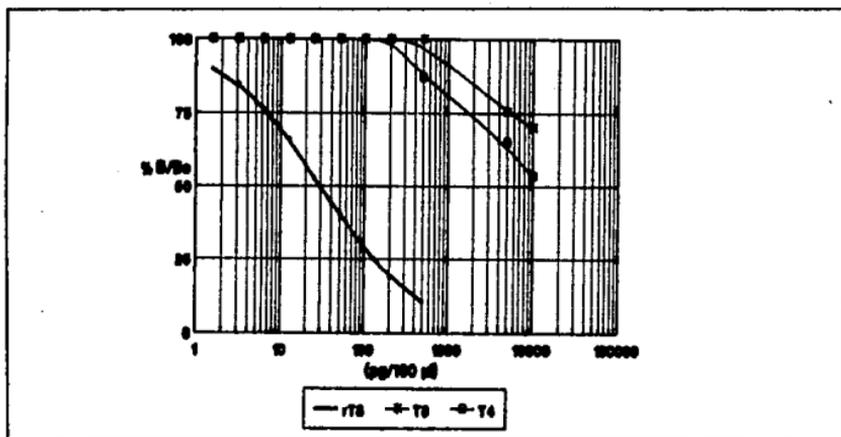


FIGURA 9. REACTIVIDAD CRUZADA. Se muestra la especificidad del anticuerpo para rT3. El desplazamiento provocado por T3 o T4 es dos órdenes de magnitud mayor que el ligando específico. Se obtuvieron los siguientes porcentajes al 50% de inhibición T3 = 0.005%, T4 = 0.002%.

Caracterización de la Actividad 5D-III

Concentración de Proteínas, Efecto del pH y Concentración de Cofactor. Como se muestra en la FIGURA 10, la actividad 5D-III en la piel de la trucha cuantificada por RIA fue proporcional a la concentración de proteínas utilizadas en el intervalo de 0.1 a 0.4 mg/ml. La influencia del pH sobre la actividad enzimática se evaluó en el intervalo de 5 a 9. Los resultados (FIGURA 11) mostraron que el pH óptimo es de 7. El efecto del cofactor se analizó utilizando concentraciones de 25 a 800 mmol/L de DTT; y la actividad de la enzima se cuantificó con RIA. Como se aprecia en la FIGURA 12 a partir de 100 mmol/L la actividad enzimática no se modifica significativamente. Con base en estos resultados, en los ensayos subsiguientes se utilizaron concentraciones de proteína alrededor de 0.4 mg/ml, pH de 7.0 y 100 mmol/L de DTT.

Efecto del Inhibidor (PTU). Como se mencionó anteriormente el establecer este parámetro es muy importante para poder identificar la vía desyodativa cuya actividad se está determinando. Como se aprecia en las FIGURAS 13 y 14, e indistintamente del método de cuantificación empleado, el PTU no tiene efecto en la actividad enzimática 5D-III de la piel de la trucha.

Sustrato Preferencial (T3) y Secundario (T4). Al analizar la actividad 5D-III por cromatografía y al utilizar concentraciones de 0.01 a 0.8 $\mu\text{mol/L}$ de T3, el mayor porcentaje de T2 producido se observó alrededor de 0.03 $\mu\text{mol/L}$ (FIGURA 15). En contraste, con el sustrato secundario, el mayor porcentaje de T3 producida se observó al rededor de 0.1 $\mu\text{mol/L}$ de T4 (FIGURA 16). La actividad 5D-III con este último sustrato también se cuantificó con RIA y la mayor actividad se observó a partir de 1.0 y 2.5 $\mu\text{mol/L}$ de T4 (FIGURA 17).

Efecto de la Temperatura Se analizaron temperaturas de 4, 15, aproximadamente 20 y 38°C. La mayor actividad 5D-III en la piel de la trucha se observó a 15°C (FIGURA 18).

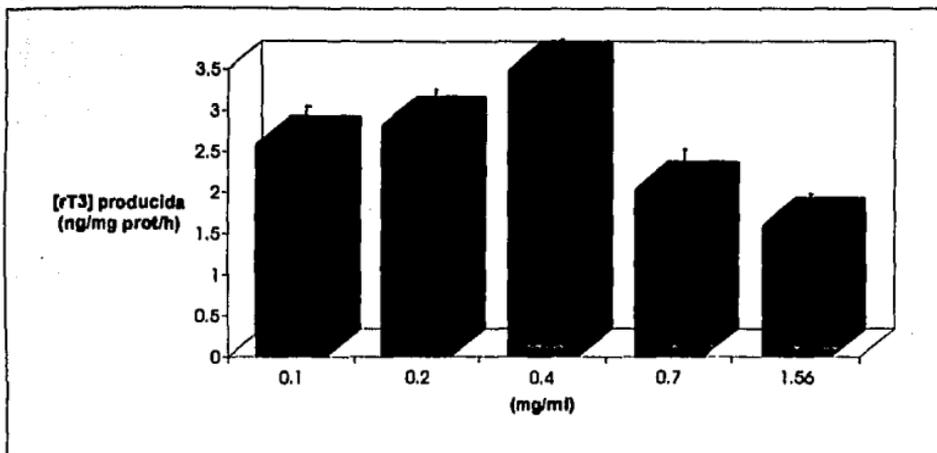


FIGURA 10. CONCENTRACION DE PROTEINA Y ACTIVIDAD 5D-II EN LA PIEL DE LA TRUCHA ARCOIRIS.

Se utilizaron pieles de un conjunto de 12 individuos cuyas edades oscilaron de 41 a 94 semanas.

Las condiciones del ensayo fueron: 0.8 $\mu\text{mol/L}$ T4, 100 mmol/L DTT, 3h, 15°C y la actividad enzimática se cuantificó por RIA. Bajo estas condiciones de trabajo la concentración óptima de proteínas está alrededor de 0.4 mg/ml

Cada barra es el promedio de un ensayo hecho por cuadruplicado \pm E.E.

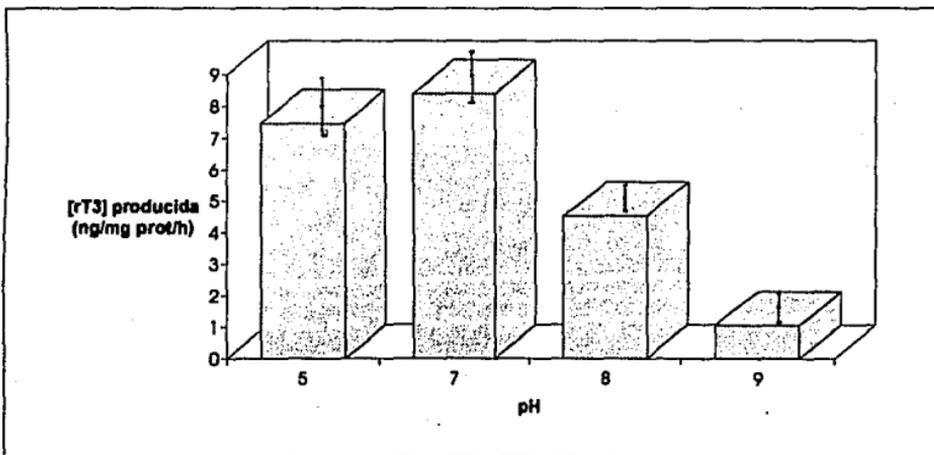


FIGURA 11. EFECTO DEL pH SOBRE LA ACTIVIDAD 5D-II EN LA PIEL DE LA TRUCHA ARCOIRIS.

Se analizó un intervalo de pH de 5 a 9. Cada barra representa el promedio de un ensayo por cuadruplicado

Como en el caso de la Figura anterior, se utilizó un conjunto de 12 individuos. Las condiciones del ensayo

fueron: 0.4 mg/ml de proteína, 0.8 $\mu\text{mol/L}$ de T4, y 100 mmol/L DTT. Incubación 3h a 15°C. La mayor actividad se observa a pH de 7.0 \pm E.E.

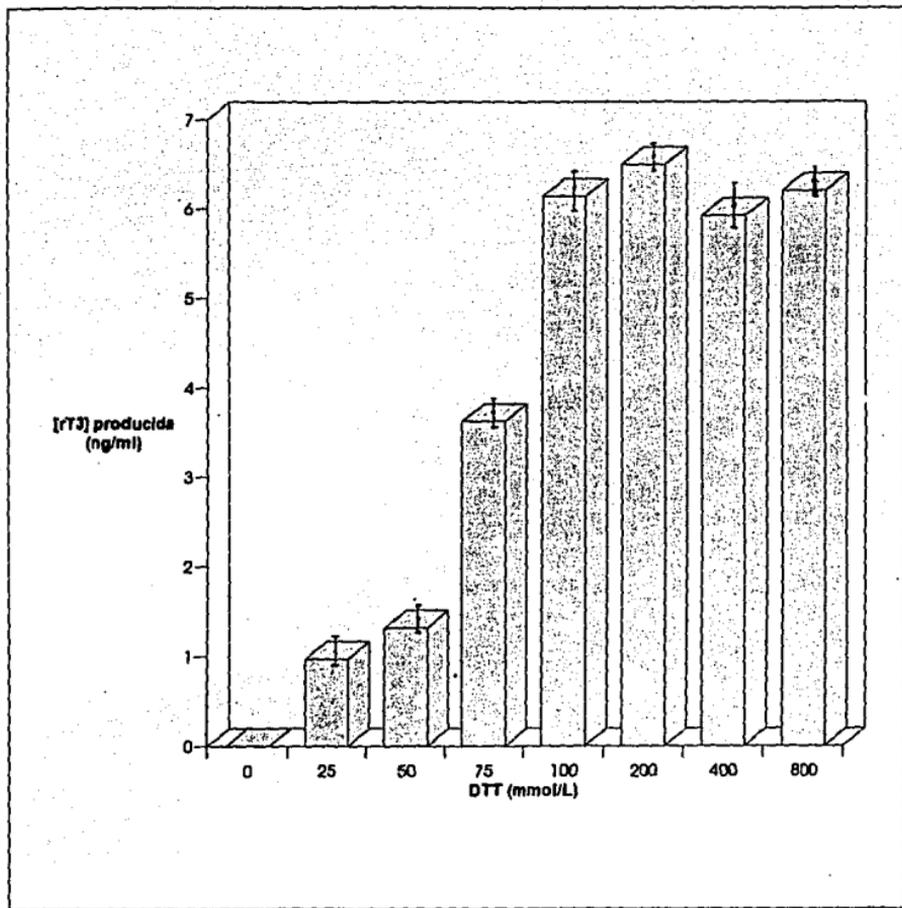


FIGURA 12. INFLUENCIA DEL COFACTOR (DTT) SOBRE LA ACTIVIDAD 5D-III EN LA PIEL DE LA TRUCHA ARCOIRIS.

Cada barra representa la media de un ensayo por cuadruplicado \pm E.E. Las condiciones de ensayo fueron: proteina, 0,3 mg/ml; T4, 0,8 μ mol/L. Tiempo de incubaci3n 3 h a 15°C. Los resultados se expresan como la concentraci3n (ng/ml) producida. Fue cuantificada por RIA. Se observa que a partir de 100 mmol/L de DTT la actividad enzimatica no se modifica significativamente.

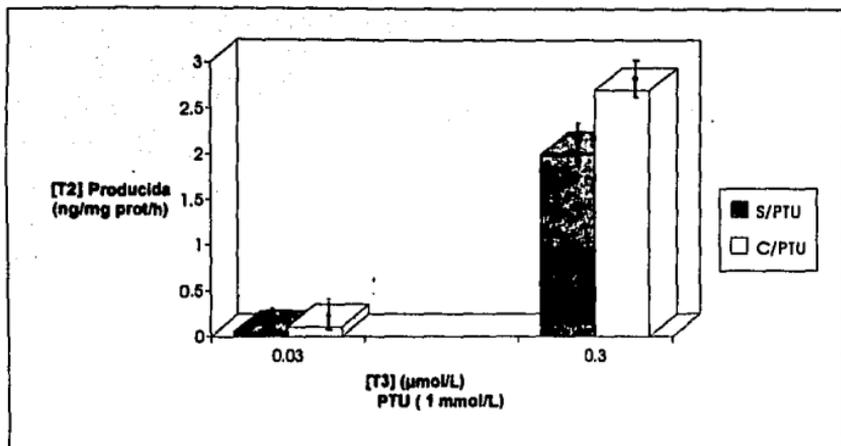


FIGURA 13. EFECTO DEL PTU SOBRE LA ACTIVIDAD 5D-III EN LA PIEL DE LA TRUCHA ARCOIRIS.

Los resultados son el promedio de dos ensayos independientes cada uno por duplicado \pm E.E. Los valores representan la actividad específica de la enzima en ng/mg/h de la hormona producida (T2). El ensayo se cuantificó por cromatografía descendente en papel. Las condiciones del ensayo fueron: hormona fría 1500 o 15000 f mol; hormona marcada, 397 f mol; tiempo de incubación 3h a temperatura ambiente. Se muestra que el PTU no tiene efecto sobre la actividad enzimática.

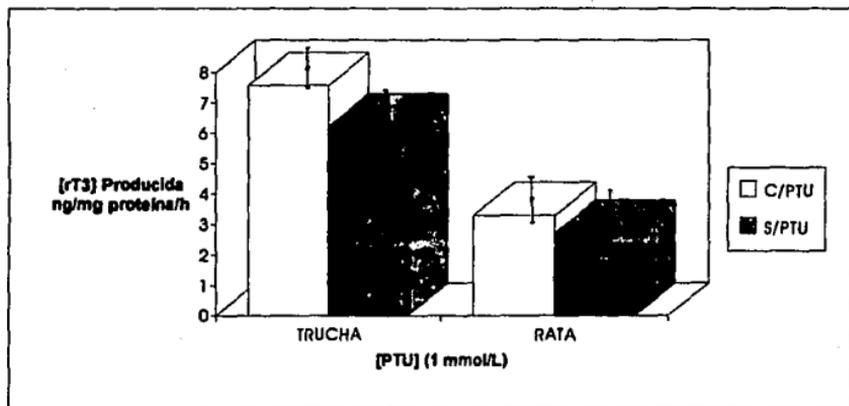


FIGURA 14. EFECTO DEL PTU SOBRE LA ACTIVIDAD 5D-III EN PIEL DE TRUCHA Y DE RATA.

Los resultados son el promedio de un ensayo por duplicado \pm E.E. Los resultados se expresan como la actividad específica. El ensayo se cuantificó con RIA. Las condiciones del ensayo fueron: proteína 0.33 y 0.6 mg/ml (trucha y rata, respectivamente); T4, 0.8 µmol/L. Tiempo de incubación 3h a 15°C (trucha) o 36°C (rata). Se observa que el PTU no tiene efecto sobre la actividad enzimática.

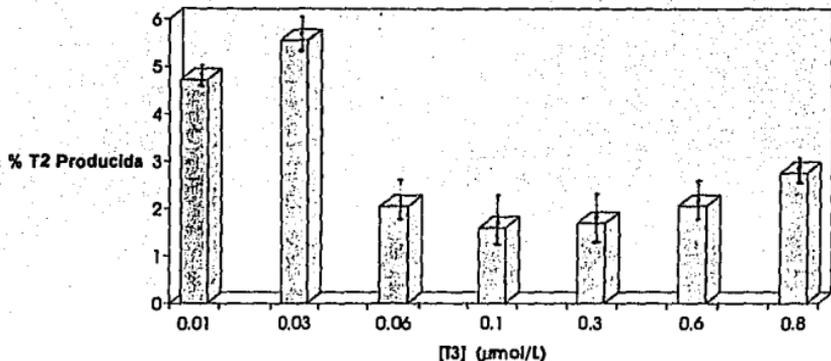


FIGURA 15. EFECTO DEL SUSTRATO PREFERENCIAL (T3) EN LA ACTIVIDAD 5D-III EN LA PIEL DE LA TRUCHA ARCOIRIS. Los resultados son el promedio de un ensayo por duplicado \pm E.E. y se expresa como el porcentaje de la hormona producida (T2). El ensayo se cuantificó por cromatografía descendente en papel. Las condiciones del ensayo fueron: hormona fría 800 a 79800 fmol; hormona marcada 200 fmol; proteína, 0.4 mg/ml; tiempo de incubación 3h a 15°C. El mayor porcentaje de producción de T2 marcada se observó con 0.03 μ mol/L.

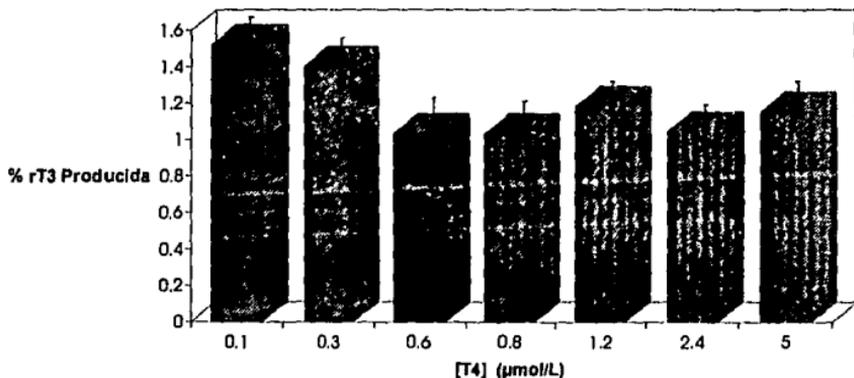


FIGURA 16. EFECTO DEL SUSTRATO SECUNDARIO (T4) EN LA ACTIVIDAD 5D-III EN LA PIEL DE LA TRUCHA ARCOIRIS. Las barras representan el promedio de un ensayo por duplicado \pm E.E. Los resultados representan el porcentaje de la hormona producida (rT3). El ensayo se cuantificó por cromatografía descendente en papel. Las condiciones del ensayo fueron: hormona fría, 9800 a 499800 fmol; hormona marcada, 200 fmol; Proteína, 0.4 mg/ml, tiempo de incubación: 3h a 15°C. Se observa que la concentración con la que se obtuvo un mayor porcentaje de rT3 producida fue de 0.1 μ mol/L.

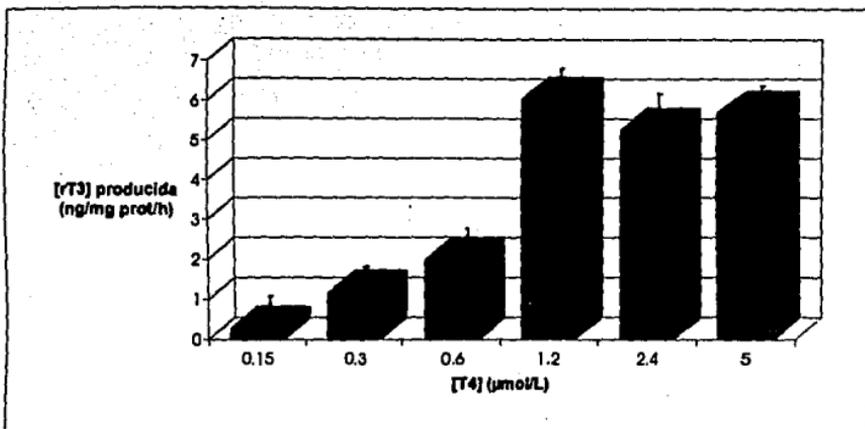


FIGURA 17. CONCENTRACION DE SUSTRATO Y ACTIVIDAD 5D-III EN LA PIEL DE LA TRUCHA ARCOIRIS. Se muestra el promedio de un ensayo por cuadruplicado \pm E.E. y los resultados se expresan como la concentración total producida. El producto de ésta (rT3) se cuantificó por RIA. Las condiciones del ensayo fueron: proteína, 0.3 mg/ml; DTT, 100 mmol/L; incubación 3 h a 15°C. Se observa que la concentración óptima de sustrato a partir de la cual la actividad 5D-III no se modifica es alrededor de 1.2 µmol/L de T4.

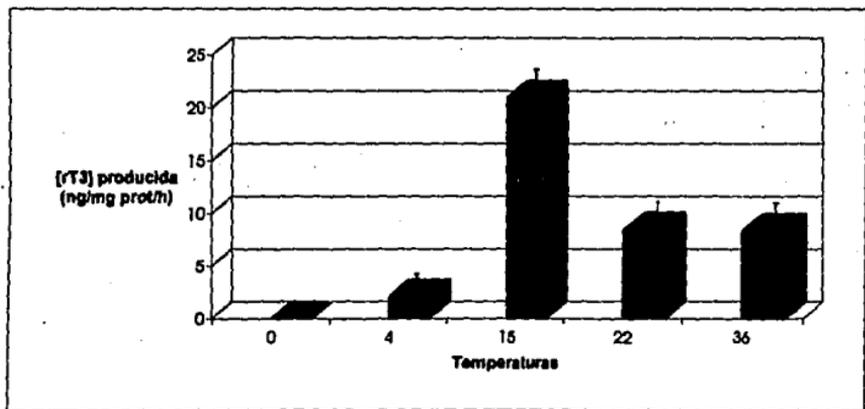


FIGURA 18. EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA ACTIVIDAD 5D-III EN LA PIEL DE LA TRUCHA ARCOIRIS. Cada barra representa la media de un ensayo por duplicado \pm E.E. Las condiciones del ensayo fueron: proteína, 0.3 mg/ml; T4, 0.8 µmol/L; DTT, 100 mmol/L; incubación 3h a 0, 4, 15, 22 y 36°C. Se observa que la temperatura óptima es de 15°C.

Constantes Cinéticas de la 5D-III en la Piel de la Trucha

Una vez optimizados las diferentes variables y técnicas para cuantificar la actividad 5D-III, se realizaron una serie de ensayos encaminados a determinar las constantes cinéticas de la enzima. En estos ensayos se evaluaron los siguientes parámetros: concentración de sustrato (T4, 0.2 a 1 $\mu\text{mol/L}$); concentración de cofactor (DTT, 25 a 100 mmol/L). Todos los ensayos se llevaron a cabo utilizando una concentración de proteínas de 0.3- 0.4 mg/ml , y se realizaron a temperatura ambiente y a 15°C.

En el CUADRO 7 se resumen las constantes cinéticas de Michaelis-Menten. Estos valores corresponden a la Km y Vmax verdaderas y se obtuvieron a partir de las graficas tipo Lineweaver-Burk que se muestran en las FIGURAS 19 a 22. Puede apreciarse que mientras que el valor de la Km prácticamente no se modifica, la Vmax sufre un incremento significativo cuando el ensayo se realiza a 15°C.

CUADRO 7. CONSTANTES CINÉTICAS DE LA 5D-III EN LA PIEL DE LA TRUCHA ARCOIRIS

	Alrededor de 20 °C		15°C	
	Km	Vmáx	Km	Vmáx
DTT	100 mmol/L	33 $\mu\text{mol/mg/h}$	100 mmol/L	149 $\mu\text{mol/mg/h}$
T4	0.8 $\mu\text{mol/L}$	5.26 pmol/mg/min	0.83 $\mu\text{mol/L}$	9.25 pmol/mg/min

Aspectos Comparativos

Con el objeto de validar los resultados obtenidos en la piel de la trucha y realizar la comparación intraespecífica, se optimizaron los parámetros de ensayo para los diferentes órganos/tejidos de mamífero utilizados. Como se muestra en la FIGURA 23, la temperatura óptima para cuantificar la actividad 5D-III en la piel de la rata fue de 36°C. En lo que respecta a la concentración del cofactor (FIGURA 24), la actividad enzimática en la piel de la rata es óptima a 400 mmol/L de DTT, esto es, 4 veces mayor que la requerida por la piel de la trucha. Estos resultados fueron prácticamente iguales para la placenta (FIGURA 25).

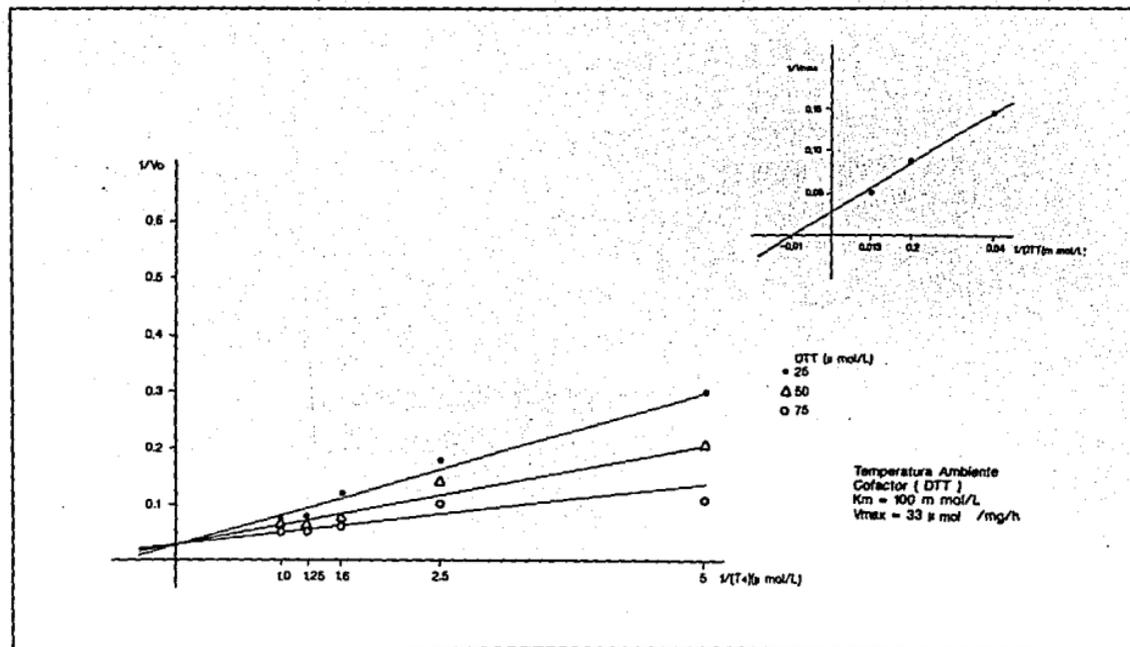


FIGURA 19. GRAFICA DE LINEWEAVER-BURK PARA EL COFACTOR (DTT) DE LA ENZIMA 5D-III DE LA PIEL DE LA TRUCHA ARCOIRIS. El ensayo se realizó a temperatura ambiente (aprox 20°C). En el recuadro se observa la doble recíproca de los interceptos en el eje de las abscisas. En la tabla se muestran las constantes de Michaelis-Menten.

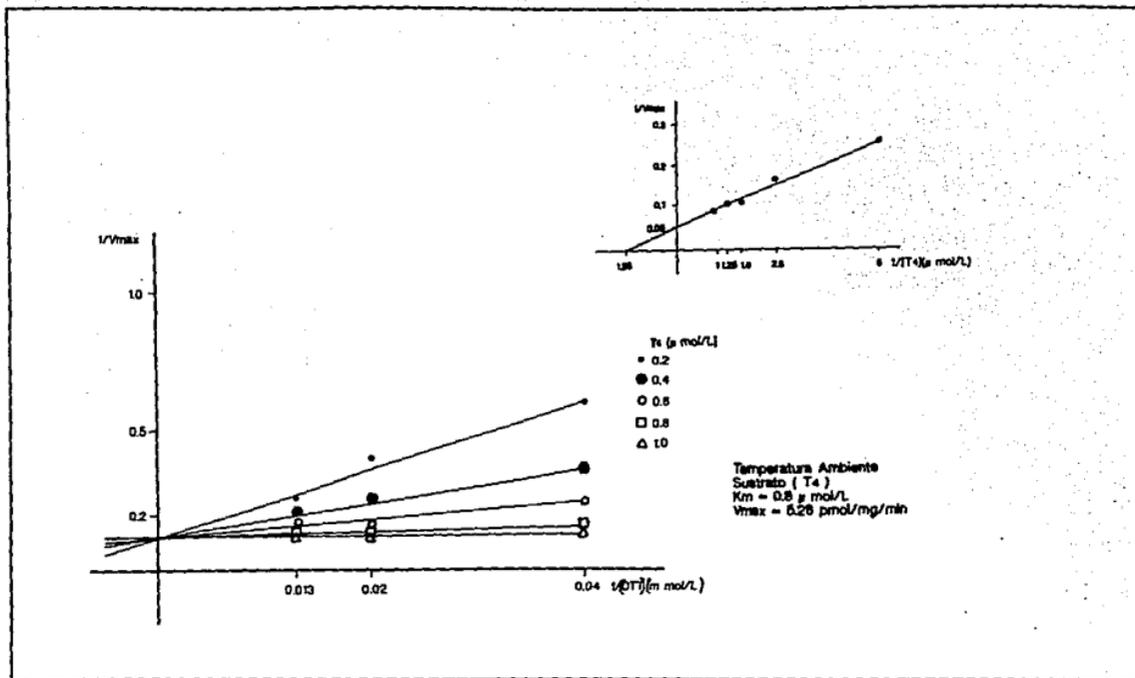


FIGURA 20. GRAFICA DE LINEWEAVER-BURK PARA EL SUSTRATO (T_s) DE LA ENZIMA 5D-III EN LA PIEL DE LA TRUCHA ARCORIS.
 El ensayo se realizó a temperatura ambiente (aprox 20°C). En el recuadro se observa el doble recíproco de los interceptos en el eje de las abscisas. En la tabla se muestran las constantes cinéticas de Michaelis-Menten.

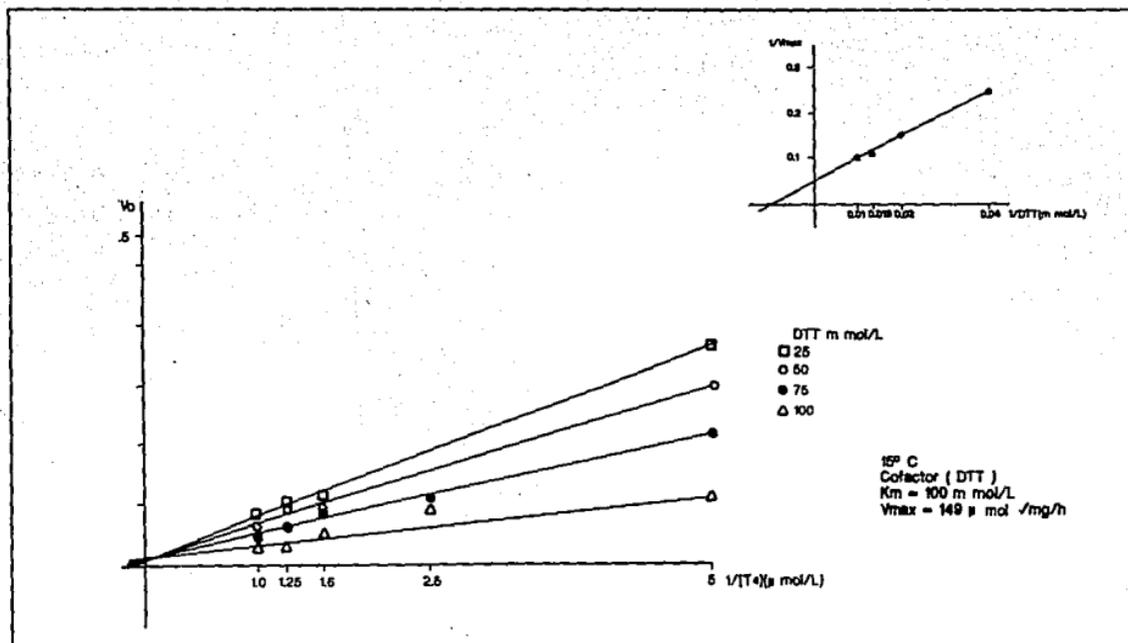


FIGURA 21. GRAFICA DE LINEWEAVER-BURK PARA EL COFACTOR (DTT) DE LA ENZIMA SD-III DE LA PIEL DE LA TRUCHA ARCOIRIS. El ensayo se realizó a 15°C. En el recuadro se muestra la doble recíproca de los interceptos en el eje de las abscisas. En la tabla se muestran las constantes cinéticas de Michaelis-Menten.

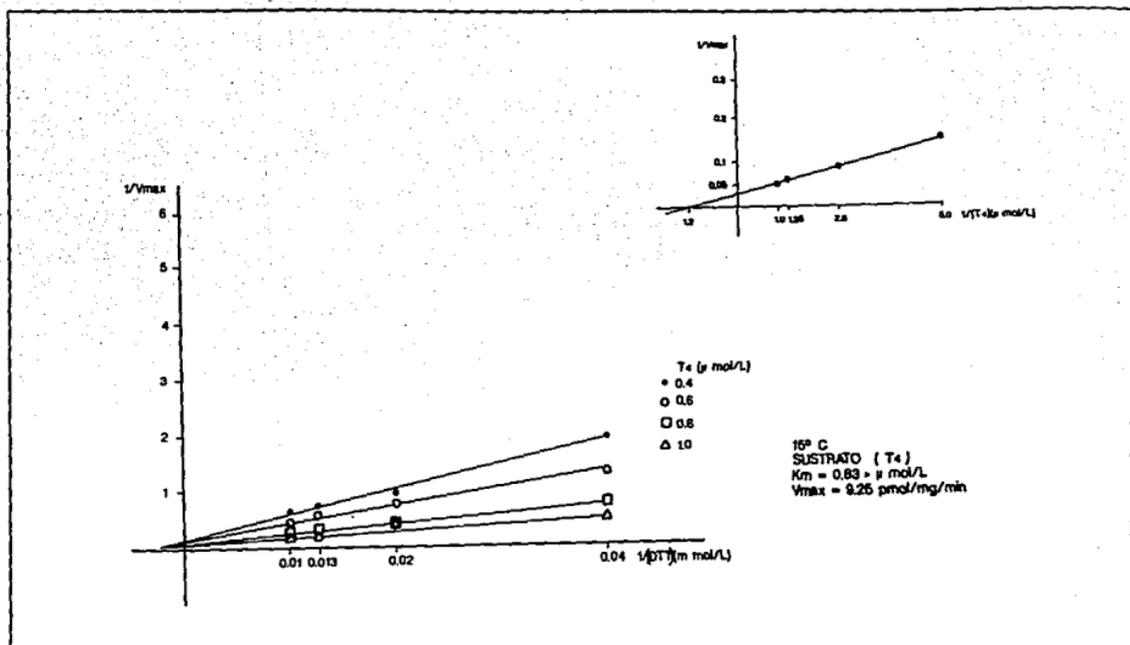


FIGURA 22. GRAFICA DE LINEWEAVER-BURK PARA EL SUSTRATO (T_4) DE LA ENZIMA SD-III DE LA PIEL DE LA TRUCHA ARCORIS.
 El ensayo se realizó a 15°C. En el recuadro se muestra la doble recíproca de los interceptos en el eje de las abscisas. En la tabla se muestran las constantes cinéticas de Michaelis-Menten.

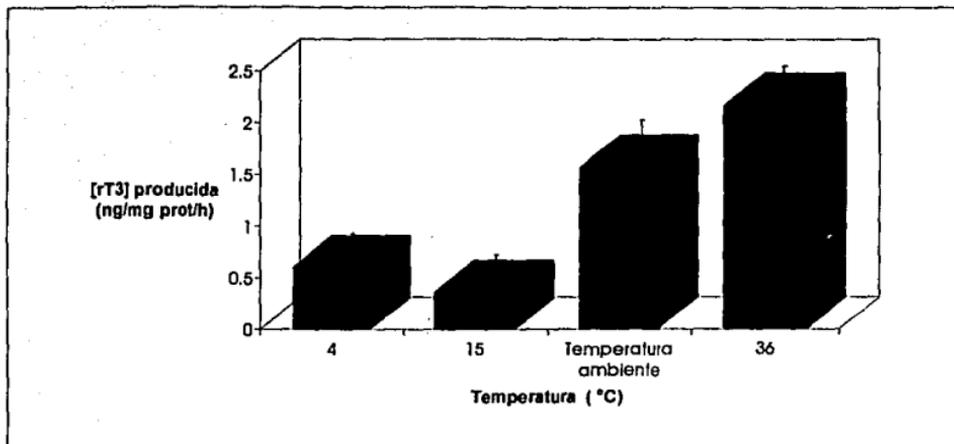


FIGURA 23. EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA ACTIVIDAD 5D-II EN LA PIEL DE RATA
 Cada barra representa la media de un ensayo hecho por duplicado \pm E.E. Los resultados se expresan como actividad específica (ng/mg prot/h). Las condiciones del ensayo fueron: proteína, 1.3 mg/ml; DTT, 400 mmol/L; 3 h a 4, 15, Temperatura ambiente (22), y 36°C. Como se aprecia la temperatura óptima esta en los 36°C.

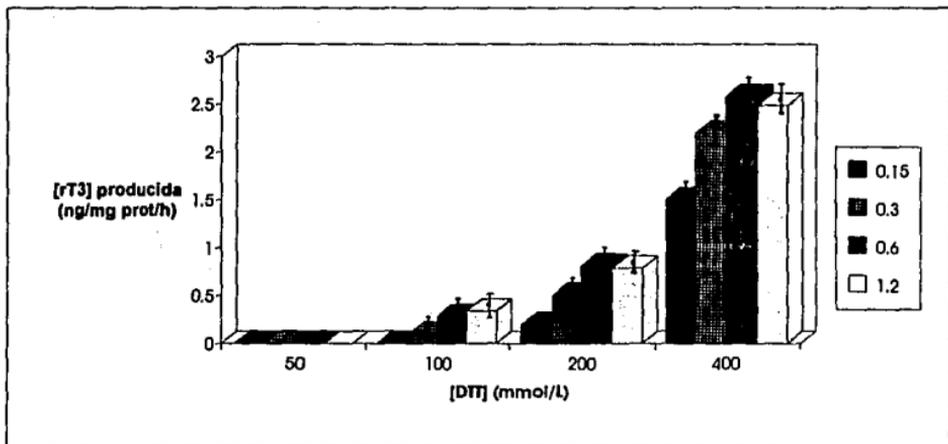


FIGURA 24. EFECTO DEL COFACTOR (DTT) Y SUSTRATO (T4) EN LA PIEL DE RATA.
 Cada barra representa la media de un ensayo por duplicado \pm E.E. Los resultados se expresan como la actividad específica. El ensayo se cuantificó con RIA. Las condiciones del ensayo fueron: proteína 0.33mg/ml; T4, 0.15, 0.3, 0.6, y 1.2 μ mol/L; DTT, 50, 100, 200, y 400 mmol/L; Incubación, 3h a 36°C. Como se observa, la mayor actividad se obtiene con concentraciones mayores de cofactor (400 mmol/L) y de T4 a partir 0.36 μ mol/L.

Concentración de Sustrato y Cofactor. La mayor actividad 5D-III en la piel de la rata (FIGURA 26) se observó utilizando una concentración 0.15 $\mu\text{mol/L}$ de T4, en comparación con la requerida por la piel de la trucha (1 $\mu\text{mol/L}$). (FIGURA 17) esta concentración es menor. En contraste, en el hígado de una y otra especie, se requieren concentraciones semejantes de sustrato (0.6 $\mu\text{mol/L}$) y DDT (400 $\mu\text{mol/L}$) para obtener la mayor actividad enzimática (FIGURAS 27 y 28). Por otro lado, la actividad 5D-III en la placenta es óptima utilizando concentraciones de sustrato relativamente menores (0.3 $\mu\text{mol/L}$) que las requeridas por la enzima hepática, sin embargo la placenta requiere la misma concentración de DTT (400 $\mu\text{mol/L}$) que la enzima hepática. (FIGURA 29).

Al utilizar el sustrato preferencial T3 y evaluar la actividad con cromatografía en pieles de trucha y de rata, así como en la placenta, se observa que en la trucha la actividad 5D-III es significativamente mayor en comparación con los órganos de mamífero (FIGURA 30).

Efecto del PTU. Bajo condiciones de ensayo óptimas para una y otra especie, el PTU no tiene efecto sobre la actividad enzimática (FIGURA 14). Igualmente, utilizando dos tiempos de incubación, el inhibidor no modifica la actividad 5D-III en la placenta (FIGURA 31).

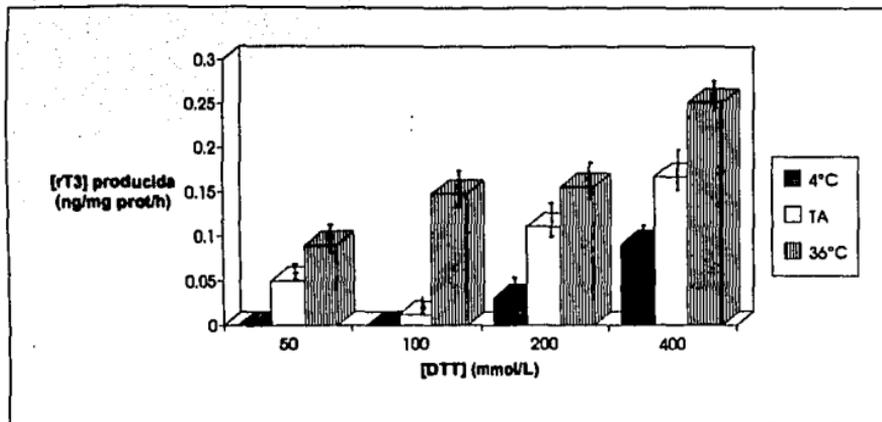


FIGURA 25. EFECTO DEL COFACTOR (DTT) Y LA TEMPERATURA (°C) EN LA PLACENTA DE RATA.
 Cada barra representa el promedio de un ensayo por duplicado \pm E.E. Los resultados se expresan como la actividad específica. Las condiciones del ensayo fueron: proteína: 16.4 mg/ml; T4, 0.6 μ mol/L; DTT, 50, 100, 200 y 400 mmol/L. Se observa que la mayor actividad se obtuvo con 400 mmol/L de DTT a 36°C.

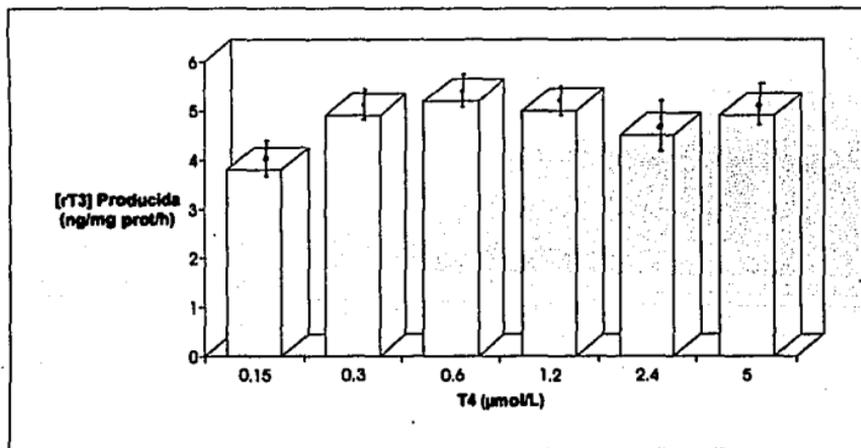


FIGURA 26. CONCENTRACION DE SUSTRATO Y ACTIVIDAD 5D-II EN LA PIEL DE RATA.
 Se muestra el promedio de un ensayo por cuadruplicado \pm E.E. los resultados se expresan como la actividad específica. El ensayo se cuantificó con RIA. Las condiciones de ensayo fueron: proteína, 0.6 mg/ml; DTT, 400 mmol/L; incubación 3h a 36°C. La mayor actividad enzimática se observó a partir de 0.3 μ mol/L de T4.

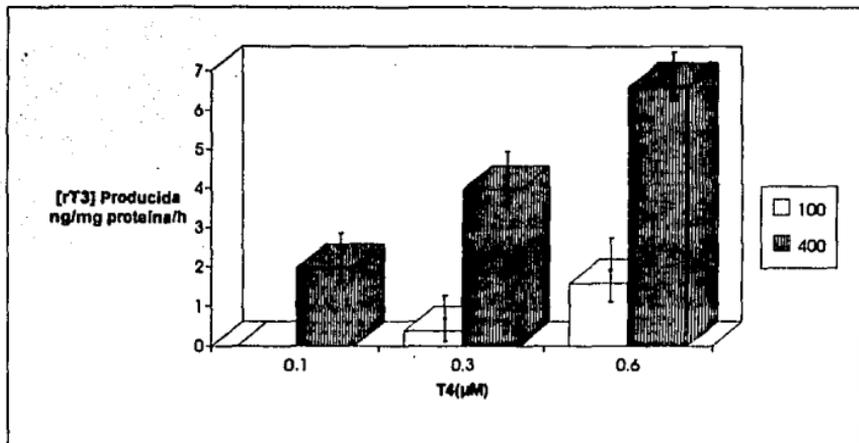


FIGURA 27. EFECTO DE LA CONCENTRACION DEL COFACTOR (DTT) Y DEL SUSTRATO (T4) EN LA ACTIVIDAD 5D-III EN EL HIGADO DE LA TRUCHA ARCOIRIS. Cada barra representa la media de un ensayo por duplicado \pm E.E. Los resultados se expresan como la actividad específica que fue cuantificada por RIA. Las condiciones del ensayo fueron: proteína, 0.5 mg/ml; T4, 0.1, 0.3 y 0.6 μ mol/L; DTT, 100 y 400 mmo/L; incubación 3 h a 15 °C. La actividad es proporcional a la concentración de sustrato y cofactor, por lo que presenta mayor actividad con 0.6 μ mol/L de T4 y 400 mmo/L de DTT.

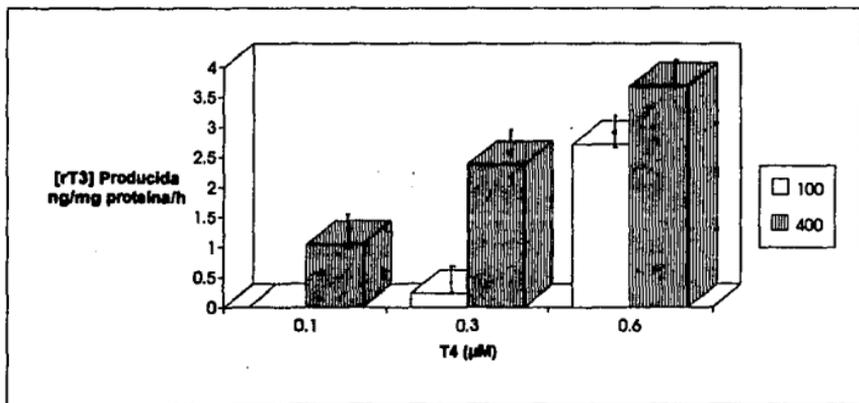


FIGURA 28. EFECTO DE LA CONCENTRACION DEL COFACTOR (DTT) Y DEL SUSTRATO (T4) EN LA ACTIVIDAD 5D-III EN EL HIGADO DE LA RATA. Cada barra representa la media de un ensayo por duplicado \pm E.E. Los resultados se expresan como la actividad específica. Las condiciones del ensayo fueron: proteína, 0.6 mg/ml; T4, 0.1, 0.3 y 0.6 μ mol/L; DTT, 100 y 400 mmo/L; incubación 3 h a 36 °C. La actividad es proporcional a la concentración de sustrato y cofactor, siendo mayor con 0.6 μ mol/L de T4 y 400 mmo/L de DTT.

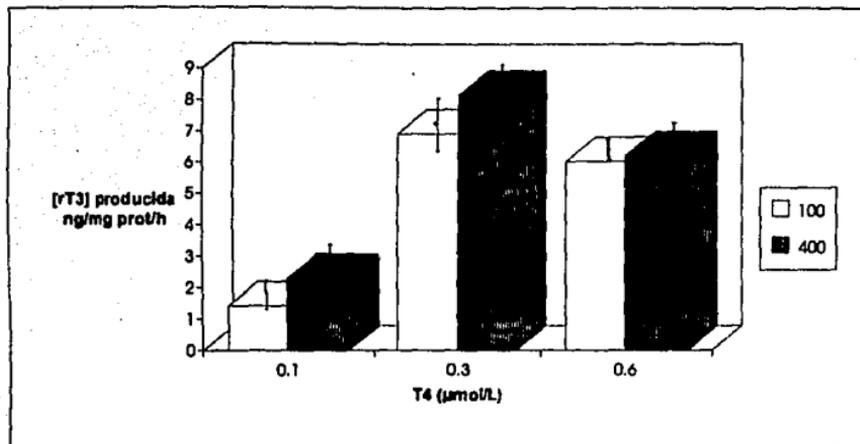


FIGURA 29. EFECTO DE LA CONCENTRACION DEL COFACTOR (DTT) Y DEL SUSTRATO (T4) EN LA ACTIVIDAD 5D-III EN LA PLACENTA DE RATA. Cada barra representa la media de un ensayo \pm E.E. por duplicado. Los resultados se expresan como la actividad especifica. Las condiciones del ensayo fueron: proteina, 1 mg/ml; T4, 0.1, 0.3 y 0.6 μ mol/L; DTT, 100 y 400 mmol/L; incubaci3n 3 h a 37 $^{\circ}$ C. La actividad es mayor con 0.3 μ mol/L de T4 y 100 mmol/L de DTT.

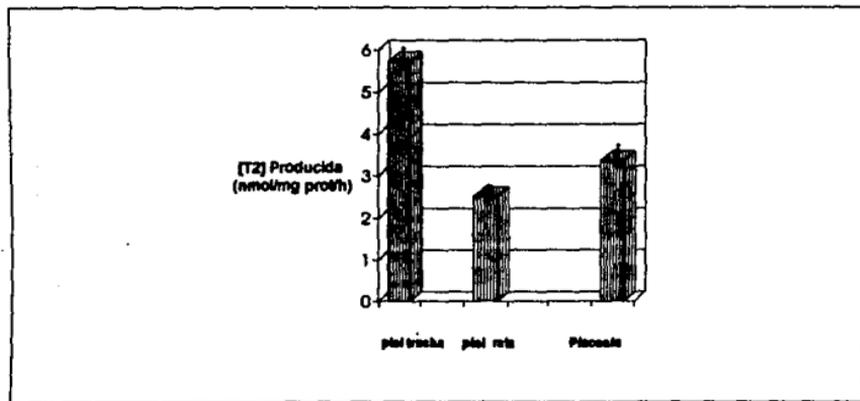


FIGURA 30. COMPARACION DE LA ACTIVIDAD 5D-III EN PIEL DE TRUCHA Vs PIEL Y PLACENTA DE RATA Los resultados son el promedio de un ensayo por duplicado \pm E.E. Los valores representan la actividad especifica de la enzima en nmol de la hormona producida (T2) cuantificada por cromatografia. Las condiciones del ensayo fueron: hormona fría, 3000 fmol y hormona marcada, 309 fmol. Para piel de trucha y de rata proteina, 0.82 y 0.9 mg/ml; para placenta 11 mg/ml. Tiempo de incubaci3n 3h temp amb. para pieles y para placenta 1h a 37 $^{\circ}$ C. La actividad 5D-III fue sensiblemente mayor en la trucha en comparaci3n con la rata.

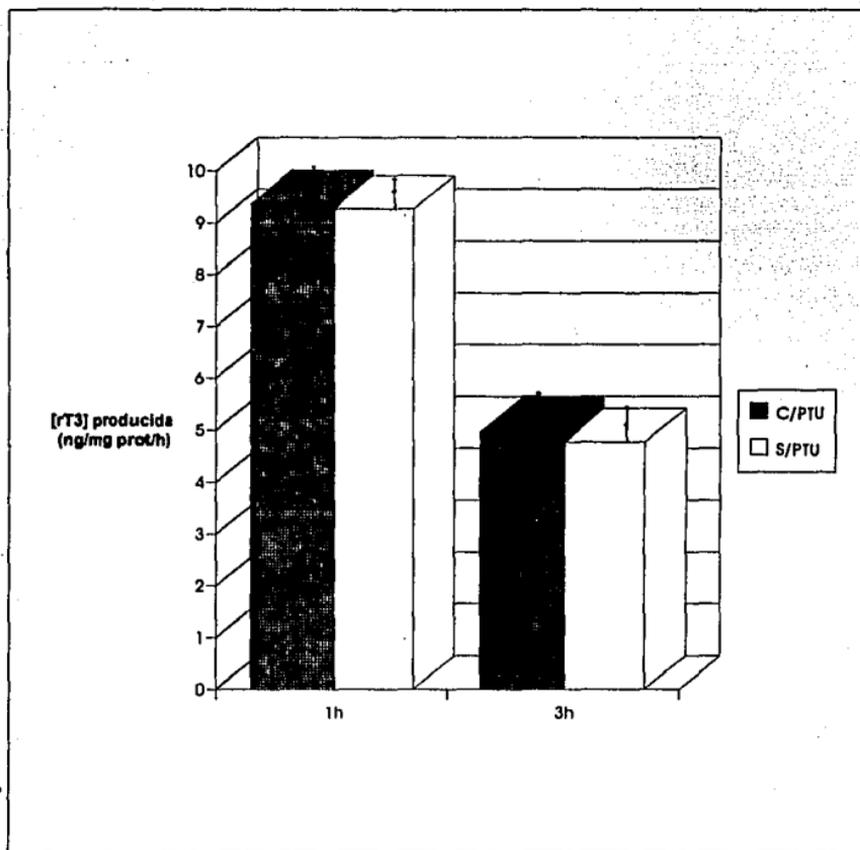


FIGURA 31. EFECTO DEL PTU SOBRE LA ACTIVIDAD 5D-III EN PLACENTA DE RATA.

Se muestra el promedio de un ensayo por duplicado \pm E.E. los resultados se expresan como la actividad específica. Las condiciones del ensayo fueron: proteína, 1mg/ml; DTT, 100 mmol/L; T₄, 1.2 μ mol/L, incubación 1 h a 38°C. Se observa que el PTU no influye en la actividad específica.

Aspectos Ontogenéticos

Niveles Circulantes de rT3. Después de estandarizar el RIA para rT3 (ver apéndice I), se midió la concentración de esta hormona en extractos de todo el pez de edades entre 14 a 36 semanas (se realizó en extractos debido a que el tamaño de los peces es tan pequeño que no se pueden sangrar) y en el suero de truchas de edades entre 41 a 84 semanas. Para analizar estos resultados, los individuos se agruparon tomando en cuenta la edad (semanas) y el incremento en talla y peso. Así, se integraron los grupos (1 al 7) que se muestran en el CUADRO 8. Los resultados muestran que la concentración de rT3 es inversamente proporcional al incremento somato-ponderal de los peces (FIGURA 32).

Ontogenia de la Actividad 5D-III en la Piel de la Trucha. La actividad enzimática se cuantificó a partir de la semana 14. Utilizando el criterio arriba señalado (niveles de rT3), los individuos se agruparon como se resume en el CUADRO 8. Los resultados muestran que la actividad 5D-III es inversamente proporcional al crecimiento somato-ponderal (peso/talla) de los peces (FIGURA 32).

CUADRO 8. EDAD, PESO, TALLA, ACTIVIDAD ESPECÍFICA (A.E.) DE LA 5D-III EN LA PIEL DE LA TRUCHA *ARCORUS* Y CONCENTRACIONES CIRCULANTES DE rT3

Edad (Semanas)	n	Grupo	Peso (g)	Talla (cm)	A.E. de 5D-III ng/mg prot/h	rT3 ng/ml
14-18	20	1	3.70 ± 0.22	5.56 ± 0.11	4.58 ± 0.41	378 ± 28.8
18-22	19	2	5.55 ± 0.33	6.76 ± 0.15	3.25 ± 0.47	334 ± 30.8
26-36	14	3	25.40 ± 3.38	11.79 ± 0.6	3.095 ± 0.46	188 ± 36.2
41-48	16	4	100.69 ± 5.44	19.06 ± 0.27	2.55 ± 0.30	1.39 ± 0.5
53-60	17	5	243.6 ± 23.95	24.48 ± 0.79	2.41 ± 0.46	2.23 ± 0.2
65-72	18	6	525 ± 28.31	31.38 ± 0.51	2.35 ± 0.22	1.82 ± 0.6
79-84	12	7	667 ± 75.19	34.88 ± 1.01	1.96 ± 0.22	1.5 ± 0.1

Los valores corresponden al promedio ± error estándar, A.E. p=0.0048.

Al observar que tanto la actividad enzimática (5D-III) como la concentración circulante de su producto (rT_3) son inversamente proporcionales al crecimiento de los animales, se decidió analizar si la variación de la actividad específica se puede explicar como una función del resto de las variables (edad, peso, talla, rT_3). Así, se utilizó un modelo de regresión múltiple.

Se utilizó el siguiente modelo:

$$A = \beta_0 + \beta_1e + \beta_2p + \beta_3t + \beta_4 rT_3 + E$$

Donde:

- A: Actividad Específica
- β_0 : constante
- β_1e : edad
- β_2p : peso
- β_3t : talla
- $\beta_4 rT_3$: rT_3
- E : error

Al realizar un primer análisis de las variables comprendidas de la semana 14 a la 84, se observó que los resultados mantienen constante la dispersión de la actividad específica (A.E.) conforme la edad, el peso y la talla (medida con la varianza), lo que indica que los valores son homocedásticos, esto es que animales de la misma edad presentan diferencias, pero esto no se encuentra influenciado por la edad (la varianza es prácticamente la misma para todas las edades), lo anterior le da validez a los modelos de regresión lineal. Debido a la gran variación que se presentó entre los individuos de una misma edad se decidió agruparlos como se describió en las tablas 7 y 8.

En esta forma, se obtuvieron los coeficientes de correlación por pares que se resumen en el CUADRO 9 y una correlación R^2 global de 0.995 con valor de significancia de 0.0092. Este resultado sugiere que el crecimiento somato-ponderal y los niveles circulantes de T_3 pueden explicar el 99.5% de la variación de la actividad específica de la 5D-III.

CUADRO 9. MATRIZ DE CORRELACIÓN DE PEARSON POR PARES PARA ACTIVIDAD ESPECÍFICA (AE), EDAD, PESO, rT3, TALLA, LN TALLA Y √TALLA.

	AE	EDAD	PESO	rT3	TALLA	LN TALLA	√TALLA
AE	1.0000 (7) P= .	-.9290 (7) P= .002	-.9030 (7) P= .005	.8533 (7) P= .031	-.7504 (7) P= .052	-.9016 (7) P= .006	-.8273 (7) P= .022
EDAD	-.9290 (7) P= .002	1.0000 (7) P= .	.9966 (7) P= .000	-.4351 (7) P= .329	.9237 (7) P= .003	.9861 (7) P= .000	.9715 (7) P= .000
PESO	-.9030 (7) P= .005	.9966 (7) P= .000	1.0000 (7) P= .	-.4789 (7) P= .277	.9379 (7) P= .002	.9906 (7) P= .000	.9849 (7) P= .000
rT3	.8533 (7) P= .031	-.4351 (7) P= .329	-.4789 (7) P= .277	1.0000 (7) P= .	-.4568 (7) P= .303	-.5325 (7) P= .218	-.5127 (7) P= .239
TALLA	-.7504 (7) P= .052	.9237 (7) P= .003	.9379 (7) P= .002	-.4568 (7) P= .303	1.0000 (7) P= .	.8893 (7) P= .007	.9791 (7) P= .000
LN TALLA	-.9016 (7) P= .006	.9861 (7) P= .000	.9906 (7) P= .000	-.5325 (7) P= .218	.8893 (7) P= .007	1.0000 (7) P= .	.9614 (7) P= .001
√TALLA	-.8273 (7) P= .022	.9715 (7) P= .000	.9849 (7) P= .000	-.5127 (7) P= .239	.9791 (7) P= .000	.9614 (7) P= .001	1.0000 (7) P= .

Estos resultados sugieren que tanto la actividad 5D-III como la rT3 circulante son inversamente proporcionales al aumento somato-ponderal de los animales. El análisis de correlación lineal simple de la AE Vs Edad, con el siguiente modelo $A = \beta_0 + \beta_1 e + E$, arrojó un valor de $R^2 = 0.86$ con valor de significancia de 0.0025. Lo que indica que la edad por sí misma sí exhibe una relación con la AE y es totalmente significativo. EL coeficiente de correlación entre la AE y la edad es negativo (-0.93) y significativo ($P = 0.002$) lo que indica que son inversamente proporcionales (a mayor edad, menor AE). Los resultados del análisis para AE Vs Talla, utilizando el modelo: $A = \beta_0 + \beta_1 t + E$. Los resultados fueron $R^2 = 0.56$ con valor de significancia de 0.05. Esto es porque la relación no es lineal, es decir la talla (la longitud) no está representando el área total. Sin embargo si se hace una transformación de la talla con un logaritmo natural (ln t) que en términos biológicos está representando el área de la trucha, con lo anterior se obtiene $R^2 = 0.812$ con valor de significancia de 0.005 lo que explica el 81% de la variación de la actividad específica obtenida y es significativo.

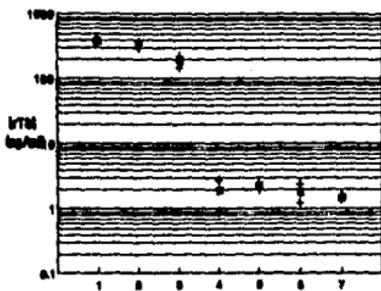
Otra transformación que se realizó fue la raíz cuadrada de la talla (\sqrt{t}), que se relaciona con el volumen del pez, con lo que se obtuvo $R^2= 0.86$ con valor de significancia de 0.02 por lo que es significativo. Al realizar la regresión de la AE con el $\ln(t)$ y se obtuvo $R^2= 0.83$ con valor de significancia de 0.02 por lo que ambas explican un 83.3% de la variación de la AE. Los coeficientes de correlación (Pearson) en las dos transformaciones son negativos -0.901 y -0.8273 para \ln talla y \sqrt{t} respectivamente y son significativos. Como en la edad se observó que son inversamente proporcionales.

En el caso de la AE Vs Peso utilizando el modelo: $A = \beta_0 + \beta_1 p + E$. Se obtuvo $R^2= 0.81$ con valor de significancia de 0.0053. El coeficiente de correlación es negativo (-0.90) y es significativo ($P=0.005$) por lo que conforme aumenta el peso disminuye la actividad específica

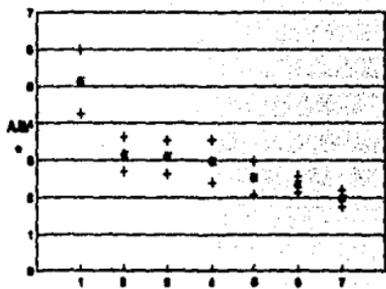
Por lo que respecta a la correlación AE Vs rT3 se realizó tomando en cuenta las semanas 14 - 84, como se mencionó anteriormente de las semanas 14 a 36 se midieron la rT3 en todo el animal, de la semana 41-84, se evaluó en el suero.

Realizando la regresión lineal simple de rT3 Vs AE, se obtuvo lo siguiente: $R^2= 0.728$ con valor de significancia de 0.03. El coeficiente de correlación entre estas dos variables es de 0.8533 (con significancia de 0.031), lo que indica una clara relación de proporcionalidad entre la AE y la concentración de la hormona.

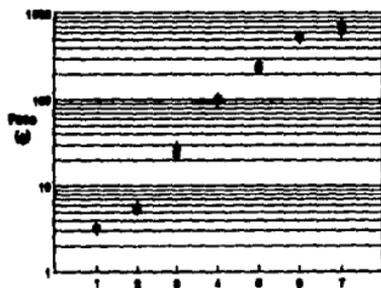
Sin embargo cuando se consideró solamente las semanas 41 - 84 se obtuvo $R^2= 0.008$ y F con valor de significancia de 0.91 por lo que la concentración de rT3 en suero no está relacionada linealmente con la actividad específica y se aceptaría la hipótesis de que son independientes. Esto se explica porque la rT3 tiene una alta tasa de depuración renal (Parry, Zang y Eales, 1994), por lo que las concentraciones son muy bajas, y por lo tanto, no están representando la producción del organismo.



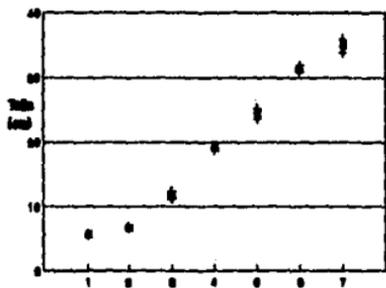
Grupos de Edad



Grupos de Edad



Grupos de Edad



Grupos de Edad

FIGURA 32. PERFIL TEMPORAL DEL INCREMENTO SOMATOPONDERAL (PESO/TALLA), LOS NIVELES CIRCULANTES DE rT3 (ng/ml) Y DE LA ACTIVIDAD 5D-III EN LA PIEL DE LA TRUCHA ARCOIRIS CON RESPECTO A LA EDAD (SEMANAS). Los números en las abscisas corresponden a los diferentes grupos según la edad en semanas (Grupo 1, 14-16; Grupo 2, 18-22; Grupo 3, 26-30; Grupo 4, 41-46; Grupo 5, 53-60; Grupo 6, 65-72; Grupo 7, 79-84). Las concentraciones de rT3 de las semanas 14 - 30 fueron evaluadas en extractos de todo el pez, de las semanas 41 a la 84 se evaluaron en suero. Se observa que tanto los niveles de rT3 como la actividad específica de la 5D-III (A.E. * ng/mg prot/h) son inversamente proporcionales al crecimiento (peso/talla) de las truchas. En las gráficas cada punto representa el promedio \pm error estándar.

DISCUSION

La presente tesis aborda un problema controvertido de la fisiología tiroidea en los peces (truchas arcoíris). Para intentar resolver dicha cuestión el trabajo desarrollado consistió por una parte en la estandarización del RIA homólogo que permite cuantificar las concentraciones de rT3 en el suero de la trucha arcoíris. Un segundo aspecto complementario, consistió en la caracterización cinética de la vía desyodativa de la 5D-III que genera dicha tironina. Además se evaluaron y correlacionaron los valores de la rT3 circulante, con la actividad específica de la 5D-III a lo largo de la ontogenia de estos peces.

Radioinmunoanálisis de rT3

La especificidad del anticuerpo anti-rT3 utilizado en el presente trabajo se evaluó contra las dos principales tironinas circulantes; T3 y T4, y la reactividad cruzada al 50% de inhibición fue despreciable (T4; 0.002 y T3; 0.005%). Estos resultados muestran que el anticuerpo es específico contra rT3. Por otro lado la dosis estándar al 50% de inhibición es de 30 pg y el intervalo de sensibilidad de la curva patrón va de 3 a 200 pg. Los parámetros del control de calidad del procedimiento fueron evaluados en un lapso de 4 meses en un total de 13 ensayos. El porcentaje de la variación intra e interensayo osciló de 3.2 a 5.8 y de 2.8 a 5.0 respectivamente. La exactitud varió del 97 al 99%. Estos resultados satisfacen los criterios de control de calidad habituales para este tipo de procedimientos (Stringer y Wynford-Thomas, 1982) y muestran que el empleo del RIA para rT3 bajo las condiciones de trabajo aquí descritas, permite cuantificar con certeza y precisión las concentraciones de dicha tironina en el suero de la trucha arcoíris.

La cuantificación de las concentraciones de rT3 en las truchas arcoíris en edades de 14 a 84 semanas mostró que conforme aumenta la talla y el peso de los peces los valores de rT3 descienden progresivamente (CUADRO 8). Este perfil temporal de la tironina correlaciona significativamente y de manera inversa ($R = 0.85$, $R^2 = 85.3\%$; E.E. = 1.21) con el aumento de la masa corporal de los animales.

En conjunto estos resultados que hasta donde sabemos son el primer reporte de las concentraciones circulantes de rT3 en esta especie de peces óseos; así como los resultados recientes en la mojarra *Tilapia nilotica* (Byamungu y col, 1990), indican que los teleosteos poseen rT3. Por otra parte y de acuerdo a estudios previos de nuestro laboratorio (Aceves y col, 1982), la clara contradicción entre los resultados del presente trabajo y los informados previamente por otros investigadores en la trucha arcoiris (Eales y col, 1983), obedece principalmente a diferencias metodológicas (RIA heterólogo Vs RIA homólogo). Como se mencionó anteriormente, la importancia que el RIA sea homólogo radica en que se ofrecen las mismas condiciones de lo que se desea medir, esto es, un primer anticuerpo específico dirigido contra el antígeno de la especie en cuestión, un segundo anticuerpo dirigido contra el primero, y un fluido semejante al de las muestras problema en donde se den las mismas interacciones antígeno-anticuerpo, en adición a lo anterior las mediciones realizadas en los RIAs heterólogos son menores, lo que provoca una disminución de la sensibilidad, especificidad y exactitud del método. Lo anterior se ha comprobado en nuestro laboratorio en la medición de T3 y T4 en el suero de truchas arcoiris utilizando RIAs homólogos (Crozco y col, 1992).

La validación de este RIA homólogo nos permitió demostrar la presencia de rT3 en la trucha arcoiris. Así, podemos concluir que como en el resto de los vertebrados, los peces presentan todas las tironinas.

Caracterización de la Vía Enzimática

La actividad 5D-III se analizó utilizando dos diferentes métodos de detección. En el primer método se empleó la cromatografía descendente en papel (ver apéndice II). Aunque más laborioso en comparación con el segundo método (RIA, ver apéndice I), la cromatografía es imprescindible puesto que permite identificar todos los productos de la desyodación y es posible comprobar la presencia de la vía 5D en los tejidos estudiados.

CUADRO 10. PRINCIPALES PARÁMETROS DE LA ACTIVIDAD 5D-III EN LA PIEL DE LA TRUCHA, COMPARACIÓN CON LA PIEL Y PLACENTA DE RATA.

	P I E L		PLACENTA
	TRUCHA	RATA	
Protéina (mg/ml)	0.4	0.6	1
DTT (mmol/L)	100	400	400
T ₃ (µmol/L)	0.3	0.06	0.6
T ₄ (µmol/L)	0.8	0.3	0.3
Temperatura (°C)	15	36	36
T. Incubación (h)	3	3	1
pH	7.0	7.0	7.0
PTH (1 mmol/L)	Sin efecto	Sin efecto	Sin efecto
A. E. (ng/mgprot/h)*			
X±D.S.	6.48 ± 1.93	3.20 ± 1.9	8.99 ± 1.94
n	28	18	10
No. Ensayos	7	6	3

* rT₃ producida

Condiciones y validación del Ensayo. En el CUADRO 10 se resumen y comparan los principales parámetros obtenidos en esta tesis para cuantificar la actividad 5D-III en la piel de la trucha y en la piel y placenta de rata. Como se puede apreciar además de la temperatura óptima, la actividad de la vía enzimática en la piel de la trucha difiere con la de la rata en los requerimientos del cofactor (100 Vs 400 mmol/L) y discretamente en lo que al sustrato secundario se refiere (T₄, 0.8 Vs 0.3-0.6 µmol/L). Estas diferencias resultan congruentes si se consideran las características fisiológicas de uno y otro organismo. En efecto la trucha es un poiquilotermo que alcanza su mayor desarrollo en temperaturas alrededor de 15°C (Ver apéndice III). Por otra parte, en los peces, las concentraciones circulantes de tirocinas son mayores que en los mamíferos (lo que está relacionado con la ausencia de TBG), lo cual podría ser un factor que influyera en el aporte o concentración local del sustrato.

Por otra parte y con el objeto de validar los resultados obtenidos en esta tesis se ensayó la actividad 5D-III en la piel y en el hígado de la rata; así como en el hígado de la trucha. Con respecto a la piel de rata, los resultados obtenidos (CUADRO 11) son semejantes a los reportados en la literatura. En el caso del hígado (CUADRO 12), las condiciones necesarias para cada tejido son iguales excepto por la temperatura, la cantidad de hormona producida es mayor en hígado de trucha en comparación con el de la rata.

CUADRO 11. ACTIVIDAD 5D-III EN LA PIEL DE RATA. COMPARACIÓN ENTRE LOS RESULTADOS DE LA PRESENTE TESIS CON LO REPORTADO EN LA LITERATURA.

	PRESENTE TRABAJO	TIEN-HUANG-SHANG 1985
Proteína (mg/ml)	0.6	0.4
DTT(mmol/L)	400	400
T ₄ (μ mol/L)	0.3	0.26
Temperatura (°C)	36	36
T. Incubación (h)	3	4
pH	7	7.4
A. E. (ng/mg prot/h)	3.20 \pm 1.9	4.1 \pm 0.8

* rT₃ producida.

CUADRO12 . COMPARACIÓN DE LA ACTIVIDAD 5D-III EN EL HÍGADO DE LA TRUCHA Y DE LA RATA

	TRUCHA	RATA
Proteína (mg/ml)	0.5	0.6
DTT (mmol/L)	400	400
T ₄ (μ mol/L)	0.6	0.8
Temperatura (°C)	15	36
T Incubación (h)	1	1
A E (ng/mg prot/h *)		
X \pm D.E.	9.03 \pm 2.44	5.23 \pm 1.55
X \pm E.E.	9.03 \pm 0.61	5.23 \pm 0.38
n	4	4
ensayos diferentes	2	2

* rT₃ producida

Cinética de la 5D-III en la piel de la trucha.

Los resultados de esta tesis muestran claramente la termodependencia que la actividad 5D-III exhibe en la piel de la trucha. Específicamente, este efecto de aclimatación que se conoce ocurre en poiquilotermos para otras enzimas (Hochachka y Somero, 1969; López-Lemus, 1994), se manifestó en la velocidad catalítica de la enzima cuyo valor de V_{max} prácticamente se duplicó cuando el ensayo se realizó a 15°C. Se ha sugerido que este fenómeno de aclimatación representa la generación de isoformas de la enzima, cuyos valores de K_m son esencialmente iguales y que se expresan durante la adaptación de los organismos al intervalo de temperaturas de su habitat.

Esta interpretación y la generación de isoformas de la enzima se robustece si se comparan los resultados de esta tesis con los parámetros cinéticos reportados para la 5D-III en la rata que es el homeotermo mejor estudiado. Como se resume en el CUADRO 13, las constantes cinéticas de la actividad 5D-III en la piel de uno y otro organismo (trucha y rata) son prácticamente iguales, y sólo difieren en la temperatura a la cual la actividad catalítica es óptima. Así y aunque indirectamente, estos resultados nos permiten sugerir la generación de isoformas de la 5D-III en la trucha y son congruentes con la fisiología de este poiquilotermo cuyo desarrollo es óptimo en temperaturas 15°C (ver apéndice III).

CUADRO 13. CONSTANTES CINÉTICAS DE LA ACTIVIDAD 5D-III EN LA RATA Y EN LA TRUCHA

	HIGADO RATA	CORTEZA CEREBRAL RATA	PIEL RATA	PIEL TRUCHA
Km ($\mu\text{mol/L}$)	1-5	0.038	0.3	0.83
Vmax ($\mu\text{mol/mg/h}$)	3.0	1.7	9.6	9.25

Los datos fueron tomados de Cavalleri y col, 1977; Chopra y col 1978; Engler y col 1984; Tien-Shang H, 1985. Los ensayos se realizaron a 36°C en la rata.

En este mismo contexto conviene señalar que además de contener diversos órganos sensoriales, las funciones básicas de la piel son: 1) proteger contra daños físicos, químicos, térmicos, radiantes y biológicos. 2) Participa en el metabolismo (excreción o absorción) de agua y metabolitos específicos (McFarland y col, 1987). Así en los organismos poiquiloterms acuáticos como es el caso de los peces la piel juega un papel importante por su constante contacto con dicho medio, el agua va a amortiguar los cambios en la temperatura y en la deshidratación y por lo tanto reduce cambios en las tasas metabólicas. En el caso de los homeoterms se mantienen en un medio menos estable, lo que requiere mayor energía de regulación y de cambios adaptativos en la piel y como se mencionó anteriormente las HTs juegan un papel muy importante en el buen funcionamiento de este órgano (Engler, 1984).

Ontogenia.

Los resultados de la presente tesis muestran que la actividad 5D-III en la piel de la trucha arcoiris disminuyó de manera gradual y sostenida a lo largo de las 70 semanas que abarcó el estudio, y que este descenso en la actividad enzimática se correlaciona de manera inversa y significativa con el resto de las variables analizadas. Nuevamente, este hallazgo es congruente con la curva de desarrollo que exhiben las truchas (ver apéndice III) y que se caracteriza por un crecimiento continuo, con el consecuente aumento de los requerimientos y gasto metabólico (Lagler, 1977). Igualmente, el descenso de esta actividad es congruente con la disminución de las concentraciones circulantes de rT3. Lo anterior se comprobó con el análisis de regresión múltiple, utilizando el modelo descrito en los resultados. Con este modelo se obtuvo una R^2 de 0.995 con significancia de 0.0092, esto es la edad, el peso, la talla y rT3 explican el 99.5% de la variación de la actividad específica (dicho de otro modo, existe una clara relación lineal entre estas cuatro variables y la actividad específica de la 5D-III en la piel de la trucha).

Al comprobarse la existencia de rT3 y de la vía desyodativa correspondiente se apoya la noción de que en los teleosteos, como en el resto de los vertebrados (anfibios a mamíferos), las HTs constituyen una parte fundamental en los procesos de balance (homeostásis/homeorresis) metabólico.

VIII

CONCLUSIONES

- 1.- Se estandarizó la técnica para la medición de la rT3 en el suero de la trucha arcoiris, y se cuantificó la rT3 en la ontogenia.
- 2.- Se estandarizó la medición de la actividad 5D-III en la piel de la trucha arcoiris.
- 3.- La principal fuente de rT3 en la trucha arcoiris es la piel.
- 4.- Las características del ensayo enzimático en comparación con el realizado con la piel de mamíferos (ratas) son:
 - - Requiere de una mayor concentración de proteínas y de sustrato
 - - Requiere de una menor concentración de cofactor (100 nmol/L DTT)
 - - La temperatura óptima es de 15°C.
 - - Produce una mayor concentración de producto (8.48 Vs 3.20 ng/mg prot/h).
- 5.- Durante la ontogenia se observó que la actividad específica de la 5D-III disminuye conforme aumenta la edad.
- 6.- Los Teleosteos presentan rT3 y su vía desyodativa correspondiente (5D-III) y, como en el resto de los vertebrados (anfibios a mamíferos) las HTs constituyen una parte fundamental en los procesos de balance (homeostásis/homeomesis) metabólico.

BIBLIOGRAFIA

- - Aceves, C; G. Legarreta y C. Valverde-R. 1982. Importancia de un Radioinmunoanálisis Homólogo de Tiroxina en el suero de bóvidos y caprinos. *Veterinaria Mex.* 13: 207-212.
- - Alberts, B; D. Bray; J. Lewis. 1991. *La Biología Molecular de la Célula*. Interamericana. México: 350-360.
- - Anderson, R. G. W. 1993. Potocytosis of Small Molecules and Ions by Caveole. *Trends in Cell Biology*, 3, 3: 69-72.
- - Angulano, B; C. Aceves; L. Navarro; A. Ramírez; M. Luna; G. Perera y C. Valverde-R. 1991. Neuroendocrine Regulation of Adrenal 5' Monodeiodination during Acute cold Exposure in the Rat. I. Effects of Hypophysectomy. *Endocrinology*, 128: 1: 504-508.
- - Baker, K. F; O. Berg and M. Gordon. 1955. Observations on Radiothyroidectomy in Juvenil Platyfish. *Anat. Record*, 122: 453-454.
- - Baker, K. F. 1958. Heterotopic Thyroid Tissues in Fishes. I. The Origin and the Development of Heterotopic Thyroid Tissues in Platyfish. *J. Morphol.* 103: 91 - 134.
- - Behne, D; A. Kyriakopoulos; H. Meinhold; and J. Kohrie. 1990. Identification of Type I Iodothyronine 5'Deiodinase as Selenoenzyme. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 173: 1143-1149.
- - Bellebarba, D; R. E. Peterson; K. Sterling. 1968. An Improved Method for Chromatography of Iodothyronines. *J. Clin. Endocr. Met.* 28: 305-307.
- - Benfey, T. J; E. M. Donaldson and T. G. Owen. 1989. An Homologous Radioimmunoassay for Coho Salmon (*Oncorhynchus kisutch*) Vitelogenin, with General Applicability to Other Pacific Salmonids. *Gen. Comp. Endocrinol.* 75: 78-82.
- - Berry, M. J; J. D. Kieffer; J. W. Hamey and P. R. Larsen. 1991 a. Selenocysteine Confers the Biochemical Properties Characteristic of the Type I Iodothyronine Deiodinase. *The Journal of Biological Chemistry*, 266, 22: 14155-14158.
- - Berry, M.J; J. D. Kieffer & P. R. Larsen. 1991 b. Evidence that Cysteine, not Selenocysteine, is in the Catalytic Site of Type II Iodothyronine Deiodinase. *Endocrinology*, 129, 1: 550-552.
- - Berry, B.M; L. Banu; P. R. Larsen. 1991 c. Type I Iodothyronine Deiodinase is a Selenocystein-Containing Enzyme. *Nature*, 349: 438-440.
- - Berry, M. J. & P. R. Larsen. 1992. The Role of Selenium in Thyroid Hormone Action. *Endocrine Reviews*, 13, 1: 207-209.
- - Boeuf, G. and L. M. Uin and J. G. Eales. 1989. Plasma Levels of Free and Bound Thyroid Hormones During Parr-Smolt Transformation in Atlantic Salmon *Salmo salar* L. *Can. J. Zool.* 67: 1654-1658.
- - Boeuf, G and P.Y LeBail. 1990. Growth Hormone and Thyroid Hormone Levels During Smolting in Different Populations of Atlantic Salmon. *Progr Comp Endocrinol*: 193-197.
- - Bras, O; D. G. Cyr and J. G. Eales. 1990. Factors Influencing the affinity and Capacity of T3-Binding Sites in Hepatic Nuclei of Rainbow Trout, *Onchorhynchus mykiss*. *J. Exp. Zool.* 254: 63-71.

- Brown, S. B. and J. G. Eales. 1977. Measurement of L-Thyroxine and 3,5,3'-Triiodo-L-Thyroxine Levels in Fish Plasma by Radioimmunoassay. *Can. J. Zool.* 55: 293-299.
- Brown, S. B.; D. L. MacLatchy, T. J. Hara and J. G. Eales. 1991 Effects of Cortisol on Aspects of 3,5,3'-Triiodo-L-Thyronine Metabolism in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Gen Comp Endocrinol.* 81: 207-216.
- Burke, M. and J. F. Leatherland. 1983. Seasonal Changes in Serum Thyroid Hormone Levels of the Feral Brown Bullhead, *Ictalurus nebulosus* Lesueur. *J. Fish Biol.* 23: 585 - 593.
- Byamungu, N; S. Cornelli; K. Mol; V. Darras and E. R. Kühn. 1990. Stimulation of Thyroid Function by Several Pituitary Hormones Results in an Increase in Plasma Thyroxine and Reverse Triiodothyronine in Tilapia (*Tilapia nilotica*). *Gen Comp Endocrinol.* 80: 33-40.
- Cavalleri, R. R; L. A. Gavin; Bulf y col. 1977. Conversion of Thyroxine to 3,3', 5'Triiodothyronine (reverse T₃) by Soluble Enzyme System in Rat Liver. *Biochem Biophys Res Commun.* 79: 897-902.
- Chard, T. 1982. An Introduction to Radioimmunoassay and Related Techniques. Elsevier, Biomedical Press. Amsterdam. 284 pp.
- Chopra, I. J; S.Y. Wu; Y. Nakamura; D. H. Solomon. 1978. Monodeiodination of 3,5,3'Triiodothyronine and 3,5',5'Triiodothyronine to 3,3'Diiodothyronine *in vitro*. *Endocrinology.* 102: 1099-1106.
- Chopra, I. J. 1992. Nature, Sources, and Relative Biological Significance of Circulating Thyroid Hormone in Werner and Ingbar's The Thyroid. 6th edition. L. Braverman, MD; R.D. Utiger, M.D. eds. JB Lippincott Co. Philadelphia. Chpt 7: 127-143.
- Cook, R. F. and J. G. Eales. 1987. Effects of Feeding and Photocycle on Diel Changes in Plasma Thyroid Hormone Levels in Rainbow Trout, *Salmo gairdneri*. *The Journal of Experimental Zoology.* 242: 161-169.
- Cyr, D. G. and J. G. Eales. 1988. Influence of Thyroidal Status on Ovarian Function in Rainbow Trout, *Salmo gairdneri*. *The Journal of Experimental Zoology.* 248: 81-87.
- Dales, S and W. S. Hoar. 1954. Effects of Thyroxine and Thiourea on the Early Development of Chum Salmon (*Oncorhynchus keta*). *Canadian Journal of Zoology.* 32: 244-254.
- Davis, P. J. 1992. Cellular Actions of Thyroid Hormones In Werner and Ingbar's The Thyroid 6th edition. L. Braverman, MD; R.D. Utiger, M.D. eds. JB Lippincott Co. Philadelphia. Cph 9: 190-203.
- De Jesus. E. G. T and T. Hirano. 1992. Changes in Whole Body Concentrations of Cortisol, Thyroid Hormones and Sex Steroids during Early Development of the Chum Salmon *Oncorhynchus keta*. *Gen and Comp Endocrinol.* 85: 55-81.
- De Luze, A. and J. Leloup. 1984. Fish Growth Hormone Enhances Peripheral Conversion of Thyroxine to Triiodothyronine in the Eel (*Anguilla anguilla* L.). *Gen and Comp Endocrinol.* 56: 308-312.
- Deme, D; A. Virion; J. Pommier. 1985. NADPH-Dependent Generation of H₂O₂ in a Thyroid Particulate Fraction Requires Ca⁺⁺. *FEBS Lett.* 188: 107-109.
- Demeester-Mirkine N; J. E. Dumont. 1980. The Hypothalamo-Pituitary Thyroid, In De Visscher M (ed): The Thyroid. Raven, New York. 145
- Dumont, J. E. 1971. The Action of Thyrotropin on Thyroid Metabolism. *Vitam. Horm.* 29: 287-290.

- - Dummont, J. E; G. Vassart; S. Refetoff. 1989. *Thyroid Disorders in The Metabolic Basics of Inherited Diseases II*. Mc Graw Hill. New-York. Chap 73: 1843-1879.
- - Dupy, C; A. Virion; J. Pommier. 1986. Solubilization and Characteristics of the thyoid NADPH-dependent H₂O₂ generating system. *Biochem Biophys Res Commun.* 141: 839.
- - Eales, J. G; D.A. Higgs. 1977. Influence of Food Deprivation on Radiothyronine and Radioliodide Kinetics in yearling Brook Trout *Salvelinus fontinalis* (Mitchill), With a Consideration of Extent of L-Thyronine Conversion to 3,5,3'-Triiodo-L-Thyronine. *Gen Comp Endocrinol.* 32: 29- 40.
- - Eales, J. G; M. Hughes and L. Uin. 1981. Effect of Food Intake on Diet Variations in Plasma Thyroid Hormone Levels in Rainbow Trout *Salmo gairdneri*. *Gen Comp Endocrinol.* 45: 167-174.
- - Eales, J. G; J. P. Chang; G. Van der Kraak; R. J. Ormenjanuk and L. Uin. 1982. Effects of Temperature on Plasma Thyroxine and Iodide Kinetics in Rainbow Trout *Salmo gairdneri*. *Gen Comp Endocrinol.* 47: 295-307.
- - Eales, J. G; R. J. Ormenjanuk and S. Shoatak. 1983. Reverse T₃ in Rainbow Trout, *Salmo gairdneri*. *Gen Comp Endocrinol.* 50: 395-408.
- - Eales, J. G. 1985 . The Peripheral Metabolism of Thyroid Hormones and Regulation of Thyroidal Status in Poikilotherms. *Can. J. Zool.* 63: 1217-1231.
- - Eales, J. G. 1990. Thyroid Function in Poikilotherms. *Prog Comp Endocrinol:* 415-420.
- - Eales, J. G; D. A. Higgs; L. M Uin; D. L. MacLachy; O. Bres; J. R. Mc Bride. and B. S. Doonan. 1990. Influence of Dietary Lipid and Carbohydrate levels and Chronic 3,5,3'-Triiodo-L-thyronine Treatment on Thyroid Function in Immature Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss*. *Gen Comp Endocrinol.* 80: 146-154.
- - Eales, J. G. and R. R. Finneon. 1991. Response of Hepatic Thyroxine 5'-Deiodinase of Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss*, to Chronic Ingestion of 3,5,3'-Triiodo-L-Thyronine. *The Journal of Experimental Zoology.* 257: 230 -235.
- - Eales, J. G; P.-P. Moring; T. J. Taang and T. J. Hara. 1993. Thyroid Hormone Deiodination in Brain, Liver, Gill, Heart and Muscles of Atlantic Salmon (*Salmo salar*) during Photoperiodically-Induced Parr-Smolt Transformation. II Outer and Inner-Ring 3,5,3'-Triiodo-L-Thyronine and 3,3',5'- Triiodo-L-Thyronine (Reverse T₃) Deiodination. *General and Comparative Endocrinology.* 90: 157-187.
- - Edelhoch, H. 1965. The Structure of Thyroglobulin and its Role in Iodination. *Recent Prog Horm Res.* 21 1.
- - Emmerson, C. H; G. Bambini, S. Alex; E. Castro, E. Roll and L. E. Braverman. 1988. The Effect of Thyroid Dysfunction and Fasting on Placenta Inner Ring Deiodinase Activity in the Rat. *Endocrinology.* 122, 3: 809-816.
- - Engler, D. A. G. Burger. 1984. The Deiodination of Iodothyronines and of Their Derivates in Man. *Endocrine Rev.* 5: 151-184.
- - Erickson, L. E. 1981. Exocytosis and Endocytosis in the Thyroid Follicle Cell. *Mol Cell Endocrinol.* 22: 1-7.
- - Erickson, L. E; G. Fredriksson. 1990. Phylogeny and Ontogeny of the Thyroid Gland. *The Thyroid Gland Raven, New York:* 1-35.

- - Faramarz, I.-B. 1988. Thyroid Thermogenesis: Regulation of (Na^+ + K^+)-Adenosine Triphosphatase and Active Na,K Transport. *Amer. Zool.* 28: 363-371.
- - Farwell, A. P; R. M. Lynch; W. C. Okulicz; A. Coml and J. Leonard. 1990. The Actin Cytoskeleton Mediates the Hormonally Regulated Translocation of Type I Iodothyronine 5'Deiodinase in Astrocytes. *The Journal of Biological Chemistry.* 256. 30: 18546-18553.
- - Fekks, D; G. Hennemann; T. J. Visser. 1982. Inhibition of Iodothyronine Deiodinase by Phenolphthalein Dyes. *FEBS Lett.* 137: 40-44.
- - Fenton, B; A. Orozco; L. Navarro, C. Valverde-R y C. Aceves. 1991. Triyodotironina reversa (rT3) en la trucha arcoiris. Su Perfil Temporal en Suero Durante su Desarrollo. XXXIV Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas. Colima Col, México. Resumen C-118.
- - Fisher, D. A. 1975. Thyroid Function in the Fetus Perinatal Thyroid Physiology and Disease. Fisher D.A and G.N. Burrow ed, Raven Press. New York: 21-47.
- - Flecher, D. A; A. H. Klein. 1981. Thyroid Development and Disorders of Thyroid Function in the Newborn. *N Engl J Med.* 304: 702.
- - Flood, C. and J. G. Eales. 1982. Effects of Starvation and Refeeding on Plasma T4 and T3 Levels and T4 Deiodination in Rainbow Trout. *Salmo gairdneri.* *Can J Zool.* 61: 1949-1953.
- - Gangong, W. F. 1976. Manual de Fisiología Médica. El Manual Moderno (5ª ed). México: 230-273.
- - Gorbman, A. 1969. Thyroid Function and its Control in Fishes. In *Fish Physiology.* Vol II Chpt 4 Academic Press. New York: 241-271.
- - Gordon, E. G. 1988. Environmental Influences on Thyroid Function in Teleost Fish. *Amer Zool.* 28: 329-339.
- Ham, W. A. 1975. Tratado de Histología. Interamericana. México: 261-279.
- - Hennemann, G and R. Docter 1990. Plasma Transport Proteins and Their Role in Tissue Delivery of Thyroid Hormones. In *The Thyroid Gland.* Monte A. Graer (ed). Raven Press Ltd. New York Chp 8: 221-231.
- - Himick, A. B; D. A. Higgs and J. G. Eales. 1991. The Acute Effects of Alteration in the Dietary Concentrations of Carbohydrate, Protein and Lipid on Plasma T4, T3 and Glucose Levels in Rainbow Trout, *Onchorhynchus mykiss.* *Gen Comp Endocrinol.* 82: 451-458.
- - Hoar, W. S. 1959. Endocrine factors in the ecological adaptation of fishes. In "Comparative Endocrinology" (A.Gorbman, ed) Wiley. New York: 1-23.
- - Hoch, H; C. G. Lewallen. 1974. Low Affinity Binding of Thyroxine to Proteins of Human Serum. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 38: 683-688.
- - Hochachka, P. W. & G. N. Somero. 1969. Biochemical Adaptation to the Environment. in *Fish Physiology.* Vol VI. Environmental Relations and Behavior. Hoar W.S. and D.J. Randall eds. Academic Press. San Diego: 99-156.
- - Ichikawa, K and K. Hashikume. 1991. Cellular Binding Proteins of Thyroid Hormones. *Life Sciences.* 49: 1513-1522.

- - Köhrle, J.; R. D. Hesch; J. L. Leonard. 1992. Intracellular Pathways of Iodothyronine Metabolism. In Werner and Ingbar's *The Thyroid*. 6th edition. L. Braverman, MD; R.D. Utiger, M.D. eds. JB Lippincott Co. Philadelphia. Cph 8:144-189.
- - Köhrle, J.; G. Brabant; R. D. Hesch. 1987. Metabolism of the Thyroid Hormones. *Hormone Res.* 28: 56-78.
- - Kaplan, M. M.; E. A. Shaw. 1984. Type II Iodothyronine 5'-Deiodinase by Human and Rat Placenta *In vitro*. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 59. 2: 253-257.
- - Kaplan, M. M. 1984. The Role of Thyroid Hormone Deiodination in the Regulation of the Hypothalamo-Pituitary Function. *Neuroendocrinology*. 38: 254-260.
- - Kaplan, M. M.; C. Pan; P. R.Gordon; J. K. Lee and B. A. Gilchrist. 1988. Human Epidermal Keratinocytes in Culture Convert Thyroxine to 3,5,3'-Triiodothyronine by Type II Iodothyronine Deiodination: A Novel Endocrine Function of the Skin. *J. Clinical Endocrinology and Metabolism*. 68. 4 :815-822.
- - Kobuke, L.; J. Specker and H. A. Bern. 1987. Thyroxine Content Eggs and Larvae of Coho Salmon *Oncorhynchus kisutch*. *Journal of Experimental Zoology*. 242: 89-94.
- - López-Lemus, L. G. 1994. Diferencias Termo-Adaptativas en Enzimas Deshidrogenasas NAD-Dependientes de Peces Marinos Pelágicos Templados y Tropicales. *Ciencia Pesquera*. Inst. Nal. Pesca. Sria de Pesca. México. 10: 89-95.
- - Lagler, K. F.; J. E. Bardach; R. R. Miller; D. R. May Passino. 1977. *Ichthyology*. John Wiley & Sons. New York: 343-344.
- - Larsen, P. R.; J. E. Silva; M. M. Kaplan. 1981. Relationships Between Circulating and Intracellular Thyroid Hormones. *Physiological and Clinical Implications*. *Endocrinol Rev.* 87: 102-108.
- - Leatherland, J. F. 1982. Environmental Physiology of the Teleostean Thyroid Gland: a review *Env Biol Fish.* 7: 83-90.
- - Leatherland, J. F. and K. J. Farbridge. 1992. Chronic Fasting Reduces The Response of the Thyroid to Growth Hormone and TSH, and Alters the Growth Hormone-Related Changes in Hepatic 5'Monodeiodinase Activity in Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss*. *Gen and Comp Endocrinol.* 87: 342-353.
-
- Leonard, J.T.; T.J. Visser. 1988. Biochemistry of Deiodination. In *Thyroid Hormone Metabolism*. G. Hennemann (ed). Marcel Dekker INC. New York and Basel Part II. *Metabolism*. Chp 6: 189-220.
- - Leonard, J. L.; T. J. Visser. 1991. Biochemical Basis of Thyroid Hormone Deiodination In *Thyroid Hormone Metabolism*. Sing- Yung Wu (eds). Blackwell Scientific Publications Oxford. Chpt 1:1-28.
- - Lintrop, S. P and J. H. Youson. 1983. Binding of triiodothyronine to hepatic Nuclei from Sea Lampreys (*Petromyzon marinus*) at various stages of the life cycle. *Gen Comp Endocrinol.* 49: 428-432.
- - Lundqvist, H H. B. Borg and I. Berglund. 1989. Androgens Impair Seawater Adaptability in Smolting Baltic Salmon (*Salmo salar*). *Can J. Zool.* 67: 1733-1736.
- - MacLatchy, D. L. and J. G. Eales. 1990. Growth Hormone Stimulates Hepatic Thyroxine 5'-Monodeiodinase Activity and 3,5,3'-Triiodothyronine Levels in Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*). *Gen Comp Endocrinol.* 78: 164-172.
- - Mac Latchy, D.L. and J. G. Eales. 1992. Properties of T4 5'-Deiodinating Systems in Various Tissues of the Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss*. *Gen Comp Endocrinol.* 86: 313-332.

- - Massey, B. D. and C. L. Smith. 1968. The Action of thyroxine on Mitochondrial Respiration and phosphorylation in the trout *Salmo trutta fario*. *Comp Biochem Physiol.* 25: 241-245.
- - Matty, A. J; M. A. Chaudhry and K. P. Lone. 1982. The Effect of Thyroid Hormones and Temperature on Protein and Nucleic Acid Contents of Liver and Muscle of *Sarotherodon mossambicus*. *Gen Comp Endocrinol.* 47: 497-502.
- - Matty, A. J. 1985. The Thyroid Gland In Fish Endocrinology. Croom Helm. Australia. Chp 2: 54-83.
- - Mc Farland, W; F.H. Pough; T. J. Cade; J. B. Heiser. 1987. Vertebrate Life. John Wiley & Sons. New York: 113-182.
- - Mc Latchy, D. L. J. G. Eales. 1988. Short-Term Treatment with Testosterone increases plasma 3,5,3'-L-Thyronine and hepatic L-Thyroxine 5' Monodeiodinase Levels in Arctic Charr *Salvelinus alpinus*. *Gen. Comp. Endocrinol* 71: 10-18.
- - Mc Naabb, A. 1992. Mechanism of Action of Thyroid Hormones. Thyoid Hormones. Chpt 8, Prentice Hall. Endocrinology Series. New Jersey. 116: 135-160.
- - Mol, K; W. Kaptein; V. W. Darnas; W.J. De Greef; E. R. Kühn; T.J. Visser. 1993. Different Thyroid Hormones Deiodinating Enzymes in Tilapia (*Oreochromis niloticus*), Liver and Kidney. *FEBS Lett.* 321: 140-141.
- - Moncayo Lopez, M. E. 1989. Peces que se cultivan en México. *Lab Ecología Marina. Eac. Nac. de Ciencias Biológicas I.P.N. México:* 39-45.
- - Morin, P. P; T. J. Hara and J. G. Eales. 1993. Thyroid Hormone Deiodination in Brain, Liver, Gill, Heart and Muscle of Atlantic Salmon (*Salmo salar*) during Photoperiodically-induced parr-smolt transformation. I. Outer and Inner-Ring Thyroxine Deiodination. *Gen and Comp Endocrinol.* 90: 142-158.
- - Nikodem V.M; K.J. Petty; T. Mitsuhashi and B. Desvergne. 1990. Structure and Mechanism of Action of Thyroid Hormone Receptors in The Thyroid Gland. Monte A. Greer (ed). Raven Press Ltd. New York Chp 10: 301-321.
- - Nunez, J; J. Pommimer. 1982. Formation of Thyroid Hormones. *Vitam Horm.* 89: 175-178.
- - Nunez, J.J. 1988. Mechanism of Action of Thyroid Hormones. in *Hormones and Their Action Part I* Elsevier Science Publishers. New York. Cph 5: 61-79.
- - Ohmura, Y; H. Hayashi, T. Kondo; Y. Kondo. 1987. Thyroglobulin Structure Necessary for Hormone Formation: Identification of a "donor" Residue in the Primary Structure of Bovine Thyroglobulin Subunit. *Ann Endocrinol.* 48: 141-145.
- - Olmenjanik, R. J and J. G. Eales. 1985. Immersion of Rainbow Trout in 3,5,3'-Triodo-L-thyronine (T₃): Effects on Plasma T₃ Levels and Hepatic Nuclear T₃ Binding. *Gen and Comp Endocrinol.* 58: 81-88.
- - Oppenheimer, J. H. 1992. Thyroid Hormone Action and the Molecular Level. In *Werner and Ingberg's The Thyroid.* 6th edition. L. Braverman, MD; R.D. Utiger, M.D. eds. JB Lippincott Co. Philadelphia. Cph 10: 204-224.
- - Orozco, A. A. Ruiz Y C. Valverde-R. 1992. The Importance of Employing Homologous Serum Free of Thyronines in Radioimmunoassays to asses Circulating Thyroid Hormones in Rainbow Trout. *Boletín de Estudios Médicos y Biológicos. UNAM. Vol XL. Num 1-4: 41-47.*

- - Osborn, R. H; T. H. Simpson and A. F. Youngson. 1978. Seasonal and Diurnal Rhythms of Thyroid Status in the Rainbow Trout *Salmo gairdneri*. Richardson. J. Fish Biology. 12: 531-540.
- - Parry, J. E. C. Zhang and J. G. Eales. 1994. Urinary Excretion of Thyroid Hormones in Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss*. Gen Comp. Endocrinol. 95: 310-319.
- - Refetoff, S; N. I. Robin and V. S. Fang. 1970. Parameters of Thyroid Function in Serum of 16 Selected vertebrates Species: A Study of PBI, Serum T4, Free T4, and the Pattern of T4 and T3 Binding to Serum Proteins. Endocrinology. 86: 793-805.
- - Riley Jr, W. Wand J. G. Eales. 1993. Characterization of L-thyroxine into hepatocytes isolated from juvenile Rainbow trout [*Oncorhynchus mykiss*]. Gen and Comp Endocrinol. 90: 31-42.
- - Riley Jr, W.W. and J.G. Eales. 1994. Characterization of 3,5,3-Triiodo-L-Thyronine Transport Into Hepatocytes Isolated from Juvenil Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Comparison with L-Thyroxine Transport. Gen and Comp. Endocrinol. 95: 301-309.
- - Rosas Moreno, M. 1985. Biología Acuática y Piscicultura en México. Limusa, México: 90-257.
- - Roti, E; S. L. Fang; K. Green, C.H. Emerson; L. E. Braverman. 1981. Human Placenta is an Active Site of Thyroxine and 3,3',5-Triiodothyronine Tyrosyl Ring Deiodination. J. Clin Endocrinol. Metab. 53. 3: 498-501.
- - Roti, E; S. L Fang; E. Braverman & CH, H. Emerson. 1982. Rat Placenta is an Active Site of Inner Ring Deiodination of Thyroxine and 3,3',5-Triiodothyronine. Endocrinology. 110. 1: 34-37.
- - Ruiz, A, Tovallín-Ahumada, R.Mora-B y C. Valverde-R. 1984. Desarrollo y Estandarización de un Radioinmunoensayo para Cuantificar T3 Reverse en Suero Humano y de Bóvidos. Rev. Invest. Clin. (Méx). 36: 213-218.
- - Sefran, M; J. L. Leonard. 1991. Comparison of the Physicochemical Properties of the Type I and Type II Iodothyronine 5'Deiodinase. J. Biol. Chem. 266: 3233-3238.
- - Santini, F; R. E. Hurd and I. J. Chopra. 1992 a. A Study of Metabolism of Deaminated and Sulfoconjugated Iodothyronines by Rat Placental Iodothyronine 5-Monodeiodinase. Endocrinology. 131. 4: 1689-1694.
- - Santini, F; I. J. Chopra; E. Hurd; D. H. Solomon and G. Chua Teco. 1992 b. A Study of the Characteristics of the Rat Placental Iodothyronine 5-Monodeiodinase: Evidence That It is Distinct from the Rat Hepatic Iodothyronine 5'-Monodeiodinase. Endocrinology. 130. 4: 2325-2331.
- - Seljelid, R; A. Reith; K. F. Nakken. 1970. The Early Phase of Endocytosis in Rat Thyroid Follicle Cells. Lab Invest. 23: 595-598.
- - Sharff, J. & D. L. St Germain. 1992. The cDNA for the Type I Iodothyronine 5'-Deiodinase Encodes an Enzyme Manifesting Both High Km and Low Km Activity. The Journal of Biological Chemistry. 267. 1: 12539-12544.
- - Shields, C. A. and J. G. Eales. 1986. Thyroxine 5'Monodeiodinase Activity in Hepatocytes of Rainbow Trout, *Salmo gairdneri*. Distribution, Effects of Starvation and Exogenous Inhibitors. General and Comparative Endocrinology. 83: 334 - 343.
- - Smith, G. R. and R. F. Stearley. 1989. The Classification and Scientific Names of Rainbow and Cutthroat Trouts. Fisheries. 14. 1: 4-10.

- Specker, J. 1988. Preadaptive Role of Thyroid Hormones In Larval and Juvenile Salmon: Growth, the Gut and Evolutionary Considerations. *Amer. Zool.* 28: 337-349.
- - St Germain, D. L. 1994. Iodothyronine Deiodinases. *TEM.* 5. 1: 84-85.
- - Sterling, & Lazarous. 1977. The Thyroid and Its Control. *Ann Rev Physiol.* 39: 349-372.
- - Stringer, B. M. and D. Wynford-Thomas. 1982. Importance of Maintaining Species Homology in Thyroid Hormone Radioimmunoassays: Modification of "human" Radioimmunoassay Kits for use with Rat Samples. *Hormone Research.* 4: 392-397.
- - Sullivan, C. V; D. S. Darling, W. W. Dickhoff. 1987. Nuclear Receptor for L-Triiodothyronine in Trout Erythrocytes. *Gen Comp Endocrinol.* 65: 149-152.
- -Sweeting, R. M. and J. G. Eales. 1992 a. HPLC Analysis of *In vitro* Hepatic Deiodination Products of Thyroid Hormones in the Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Gen Comp Endocrinol.* 65: 367-375.
- - Sweeting, R. M. and J. G. Eales. 1992 b. The Acute Influence of Ingested Thyroid Hormones on Hepatic Deiodination Pathways in the Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss*. *Gen Comp Endocrinol.* 65: 376-384.
- - Tagawa, M; and T. Hirano. 1987. Presence of Thyroxine in Egg and Changes in Its Content during Early Development of Chum Salmon *Oncorhynchus keta*. *Gen and Comp Endocrinol.* 66: 129-135.
- - Tagawa, M and T. Hirano. 1990. Changes in Tissue and Blood Concentrations of Thyroid Hormones in Developing Chum Salmon. *Gen and Comp Endocrinol.* 78: 437-443.
- - Takesu, N; O. Shinichi; Ichiro Komiya and T. Yamada. 1992. Requirements of Follicle Structure for Thyroid Hormone Synthesis; Cytoskeletons and Iodine Metabolism in Polarized Monolayer Cells on Collagen gel and Double Layered Follicle - Forming Cells. *Endocrinology.* 131. 3: 1143-1148.
- - Tanabe, O. Y; I. Ishii and Y. Tamaki. 1969. Comparison of Thyroxine-Binding Plasma Proteins of Various Vertebrates and Their Evolutionary Aspects. *Gen and Comp Endocrinol.* 13: 14-21.
- - Tien-Shang Huang; I. J. Chopra; A. Beredo; D.H. Solomon and G. N. Chua Teco. 1985. Skin is an Active Site for the Inner Ring Monodeiodination of Thyroxine to 3, 3'-triiodothyronine. *Endocrinology.* 117. 5: 2108-2113.
- - Valverde-R, C; C. Aceves y L. Navarro. 1993. Hormonas a la medida y para toda ocasión. *Ciencia y Desarrollo.* 111: 22-33.
- - Van Herle, A. J.; G. Vassart, J. E. Dumont. 1979. Control of Thyroglobulin Synthesis and Secretion. *N Engl J Med.* 301: 239-242.
- - Vandenhove, E; M. F. Vandembroucks. 1980. Secretion of Thyroid hormones. In *The Thyroid Gland*. Raven. New York:6
- - Virion, A; F. Courtin; J. Pommier. 1985. Spectral Characteristics and Catalytic Properties of Thyroid Peroxidase-H₂O₂ Compounds in the Iodination and Coupling Reactions. *Arch biochem Biophys.* 242: 41
- - Visser, T. J. 1988. Metabolism of Thyroid Hormone In *Hormones and Their Actions Part I*. Elsevier Science Publishers BV (Biomedical Division). New York. Chpt 6: 81-103.
- - Visser, T. J; M. M. Kaplan; P. R. Larsen. 1982. Kinetic Evidence Suggesting Two Mechanism for Iodothyronine 5'-Deiodinase in Rat Cerebral Cortex. *Proc Natl Acad. Sci.* 79: 5080-5085.

- - Weintraub, B. D; B. S. Stannard; J. A. Menger.1985. Glycosylation and Posttranslational Processing of Thyroid-Stimulating Hormone: Clinical Implications. *Recent Prog Horm Res.* 41: 577-590.
- - Wolff, J. 1984. Transport of Iodide and Other Anions in the Thyroid Gland. *Physiol Rev.* 44: 45-50.
- - Wolff, J. 1983. Congenital Goiter with Defective Iodine Transport. *Endocrinol Rev.* 4: 240-245.

X
APENDICES

Apéndice I

Radioinmunoensayo (RIA)

El RIA es una técnica de análisis fisicoquímico, que deriva del ensayo de unión competitiva de proteínas (CPBA) establecido en 1960 por Ekins, y modificado posteriormente por Berson y Yalow, 1971. En éste se utilizan anticuerpos (Ac) como proteínas receptoras. El proceso se rige por la ley de acción de masas, el principio se basa en la reactividad de un anticuerpo (Ac) cuya concentración fija, limita en el sistema el número de sitios de acoplamiento por los que compiten, por una parte el antígeno radiactivo (Ag^{*}), presente en concentraciones fijas y escasa masa, y por otra, el antígeno no marcado (Ag) que se agrega en concentraciones conocidas (puntos de la curva estándar) y en cantidades desconocidas (muestras problema). Así, a medida que se incrementa la concentración de antígeno no marcado, disminuye la probabilidad de que el antígeno radiactivo se acople al anticuerpo y forme el complejo Ag^{*}-Ac siendo cada vez mayor la proporción de complejos Ag-Ac formados, lo que da lugar a una menor cantidad de radiactividad medible en el complejo.

Estandarización y Control de Calidad del RIA.

Al igual que todos los procedimientos analíticos de tipo cuantitativo, el RIA requiere satisfacer los siguientes requisitos:

A) Reproducibilidad. Se basa en la variación intra-ensayo y en la variación inter-ensayo. Esto se logra minimizando las variables usadas en los ensayos.

B) Precisión. Se define como la capacidad del sistema para distinguir entre dos concentraciones de antígeno en cualquier posición de la curva estándar o de inhibición. Se valora cuantitativamente por medio del coeficiente de variación (CV)

$$CV = s/\bar{x}$$

Donde : s= Variación estándar de las mediciones

x = El número de las variables.

C) Sensibilidad. Es la cantidad más pequeña de antígeno no marcado que puede ser detectado. La sensibilidad máxima depende de la afinidad del anticuerpo y se obtiene cuando la concentración del antígeno marcado es insignificante y la concentración de antígeno no marcado o frío se aproxima a cero. Una de las ventajas del RIA, es la alta sensibilidad que resulta de la interacción Ag-Ac y hace posible medir concentraciones muy pequeñas de antígenos.

D) Especificidad. Es el grado de interferencia creado por otras sustancias que sean diferentes a la que se desea medir. La especificidad del anticuerpo para el antígeno se encuentra influenciada por la heterogeneidad de anticuerpos específicos y la reactividad cruzada con antígenos similares, o con moléculas que pueden ocupar sitios inmunoreactivos.

La heterogeneidad significa que un antígeno inducirá la formación de varios anticuerpos, también se refiere al número y a la localización de sitios de unión en el anticuerpo particular. El antígeno se combina con anticuerpos de acuerdo a su respectiva constante de equilibrio. La reactividad cruzada se refiere, por ejemplo a la que se obtiene con antígenos diferentes que comparten determinantes antigénicos comunes, los cuales son reconocidos por la misma población de Ac.

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

El control de calidad requiere evaluar los siguientes aspectos:

- 1) Cuantificación de la unión inespecífica (UNE) o daño;
- 2) La pendiente de la curva estándar a una concentración cero de Ag y 50% del punto de inhibición;
- 3) La dosis estándar en el 50% del punto de inhibición;
- 4) La variación inter-ensayo y
- 5) La variación intra-ensayo.

Apéndice II

Cromatografías

La cuantificación de la actividad enzimática 5D-III requiere:

La purificación de la hormona marcada (Navarro L, 1991, en prensa). Con éste objeto, se utilizaron columnas SEP-PACK C18 Cartridge de Millipore (Waters Associates).

- Se lava la columna con 5 ml de Amortiguador de Fosfatos $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{MeOH}$ 40/60 0.01mol/L.
- Se añade la hormona (aprox 500 μl de T4, 1400 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ o T3, 1500 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$)
- Se lava dos veces con 0.5 ml de fosfatos 0.1M Na_2HPO_4 0.1mol/L
- Se lava con 0.5 ml de amortiguador de fosfatos $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4$
- Se lava con 200 μl , $\text{CH}_3\text{OH}/\text{NH}_4\text{OH}$ (metanol:amoníaco 99:1)
- Se repite esto último hasta que la radiactividad sea aproximadamente de 500 cpm (aprox. 20 fracciones).
- Contar cada una por 0.1 min.
- Se obtienen 2 "picos", el primero es de todo, el segundo de la hormona marcada purificada, se ecogen los puntos que presentan el mayor número de cuentas.

Una vez que se purificó la hormona se montó de la siguiente forma:

- - Hormona marcada (T3* o T4*) purificada
- - Hormona fría (T3 o T4)
- - Cofactor DTT (mmol/L)

De lo anterior se toman 100 μl y se añaden 100 μl del sobrenadante del tejido.

- Se incuba a 37°C en el caso de ratas por 1 h, o a temperatura ambiente (TA=22°C) por 3 h
- Se detiene la reacción con 200 μl de etanol
- Se agita y se centrifuga a 3000 rpm a 4°C por 20-30 min.

Identificación

Para identificar los productos de la reacción del ensayo se realizó una cromatografía descendente en papel (Bellabarba, 1968). Se utilizó un sistema de corrido de: Alcohol ter amílico:amoníaco 2N:Hexano 5:8:1.

La fase acuosa inferior se utiliza para la saturación de la cámara y la fase superior (mezcla de Ter amil-OH y hexano), se utilizó como solvente para la corrida.

Se elabora una mezcla de 50 μl de estándar (K1, 110 mg/ 25 ml; T4, 50 mg/ 25 ml; T3, 50 mg/ 25 ml; rT3, 25 mg/ 25 ml; T2 25 mg/ 25ml) y 100 μl del sobrenadante de la incubación del

ensayo *in vitro* que se aplica a tiras de papel Whatman # 3 (#MM) y se dejan correr en éste sistema descendente entre 15 y 22 hrs.

Revelado.

Se revelan las tiras utilizando: 1% de cloruro de paladio ($PdCl_2$) -para el yoduro- y 2% de aminotipirina en 2% de carbonato de sodio. y luego con 2% de ferricianuro de potasio ($K_3Fe(CN)_6$) para las Iodotironinas.

Posteriormente se cortan las tiras, se cuentan cada una y se evalúa. La actividad enzimática se expresa como porcentajes y actividad específica (AE) de la siguiente forma:

A.E.= ng (hormona generada)/mg tejido/h o pmol (hormona generada)/mg tejido/h

Con lo anterior se obtiene un patrón como el siguiente:

Truticultura y ciclo de vida de la trucha arcoíris

La truticultura es una rama de la piscicultura que se dedica al cultivo de las truchas, como la trucha arcoíris y la de anoyo. Por ser la truticultura una zootecnia que exige para su desarrollo aguas frías, cristalinas líticas y oxigenadas, propias de regiones montañosas, el nivel de piscicultura extensiva tiene muchas limitaciones por lo escaso del recurso acuático que reúne las características apropiadas para su desarrollo (Rosas Moreno, 1985; Moncayo López, 1987).

La familia Salmonidae está representada en las aguas dulces mexicanas por dos especies una nativa y otra introducida: *Oncorhynchus mykiss* (trucha arcoíris) *Salvelinus fontinalis* (trucha de anoyo) respectivamente. Estos peces son de uso deportivo y han sido distribuidos artificialmente. Los peces de esta familia tienen la limitante de ser muy exigentes en las cualidades físico-químicas del agua en que se desarrollan, propias de nuestras regiones montañosas de: Chihuahua, Durango, Chiapas, Michoacán y Jalisco. Este recurso dulceacuícola es muy escaso. A últimas fechas se han experimentado la truticultura extensiva en cuerpos de agua temporales con resultados satisfactorios, estos son: Opoeco, Cuitzilán, Zinzino y San Gregorio en la meseta tarasca, son aguas claras, oxigenadas y con temperaturas de 14-20°C abundante entomofauna de 8 a 9 cm³ de oxígeno por litro. Las truchas en estos cuerpos de agua han alcanzado peso de 1,200 g en 11 meses, con una carga mínima, son especies de mucha demanda comercial, en forma ahumada son muy populares.

Características de la de trucha arcoíris

Cuerpo alargado, ligeramente comprimido con longitud promedio de 0.4 a 0.6m, ojos de tamaño moderado, boca terminal ligeramente oblicua, premaxilar no protáctil, maxilar largo, dientes bien desarrollados sobre las mandíbulas maxilar, dentario, vómer, palatinos. Branquiaspinas de longitud moderada de 16 a 22 mm; Aleta adiposa presente, aleta dorsal a mitad del cuerpo con 10 a 12 radios blandos, aleta caudal grande y moderadamente furcada, aleta anal mediana con 8 a 12 radios, las abdominales son pequeñas, procesos axilares presentes, pectorales medianas, escamas cicloideas pequeñas, línea lateral completa y encorvada de 100 a 150 escamas perforadas en la línea lateral, de 27 a 80 ciegos pilóricos con 80 a 88 vértebras.

Hábitat

Las truchas arcoíris viven en agua fría (14°C), lítica (luz indirecta), cristalina, ligeramente ácida (pH 6.8), bien oxigenada (10 cm³), se adapta a cuerpos de agua lenticos, fríos, de poca

profundidad (de 1 a 1.3m), fondo de grava o de arena y con abundante entomofauna. La temperatura óptima es de 15.5 a 16°C, su temperatura máxima crítica letal es de 25°C, soporta por mucho tiempo los 21°C.

Datos biológicos, hábitos reproductivos

En las partes montañosas del Estado de México, desova en los meses de noviembre a febrero, los individuos precoces desovan desde octubre, y los tardíos hasta marzo. Es una especie que hace nido y desovan en los arroyos con fondo de arena con temperaturas de 10 a 17°C, los machos son agresivos y atacan a otros machos, construyen el nido de forma concava en la arena, de día o de noche.

Los machos se aparean, a menudo eyaculan sobre los óvulos de una hembra, los huevos quedan entre la grava del fondo del nido, la hembra cava y con la arena de los bordes tapa el nido, las hembras pueden desovar en diferentes nidos de 800 a 1000 huevos. Una hembra de 1Kg pone de 3000 a 5000 huevos, los huevos pueden medir de 3 a 5 mm de diámetro, son demerco y de color rosa o salmón, algunas veces naranja. Se incuban entre 8 y 13°C y tardan de 28 a 35 días en eclosionar. Los alevines comienzan a comer a los 20 días.

Las poblaciones de truchas que viven en lagos donde se alimentan y crecen, penetran en invierno a los arroyos que desecan a los lagos, para reproducirse. Después de que los alevines nacen en el arroyo, regresan a los lagos, pues en estos encuentran más alimento, este es el comportamiento de las truchas como las de Meta de pino, Zirahuén Pucutá y otros cuerpos de agua en Durango, Chiapas, Chihuahua y Michoacán.

Los estadios por los que pasa una trucha desde el huevo hasta el adulto son:

- 1) Peces adultos: se inicia el ciclo con peces sexualmente maduros, esto indica que tanto el macho como la hembra, tienen sus gónadas llenas de gametos, ya listos para ser expulsados a la más ligera presión de la región abdominal.
- 2) Desova: el proceso cuando se da la liberación de los gametos
- 3) Fecundación.
- 4) Huevo embrionado en el que ya se formó un embrión.
- 5) Huevo oculado: Cuando el embrión está completamente desarrollado y está próximo el avivamiento. Se reconoce por los ojos del embrión los cuales se distinguen con facilidad.
- 6) Avivamiento: Cuando el alevín rompe las membranas del huevo y nada libremente.
- 7) Alevín: La larva recién salida del huevo se caracteriza por ser incolora, tiene bolsa vitelina, tubo digestivo incompleto, ojos bien desarrollados, sin escamas, mide de 20 a 25 mm, no se alimenta.
- 8) Cría: Tienen escamas, no hay bolsa vitelina, le funciona el tubo digestivo, por lo general son zooplancófagas.

9) Juvenil: Aun no define sus hábitos alimenticios, son inmaduros sexualmente.

10) Adultos: Hábitos alimenticios definidos (entomófagos), madurez sexual, estadio VI (óvulos miden más de 10 mm de diámetro), listos para la reproducción.

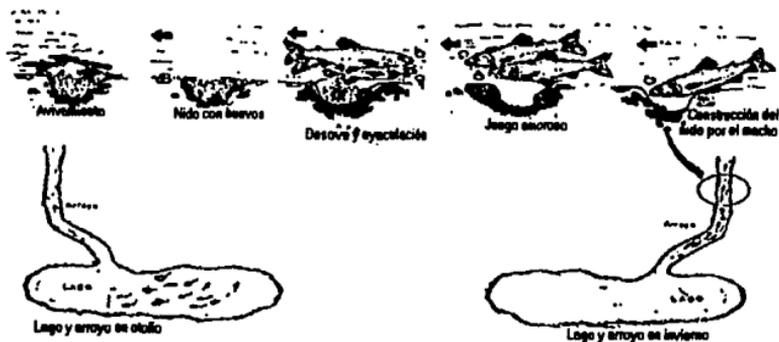


FIGURA 33. CICLO DE VIDA Y REPRODUCCIÓN NATURAL DE LA TRUCHA ARCOIRIS (ROBAS MORENO, 1985).

Madurez Sexual

Los machos maduran antes que las hembras aprox en 1 o 2 años y las hembras de 2 a 3 años. La talla que alcanzan es de 3-4 m, se ha observado que pueden seguir desovando durante 5 u 8 años consecutivos, en Cuitziltán se han capturado hembras con un peso de 1,800 g y una longitud de 5.2 m, sus ovarios miden 80 cm de largo y 3 cm de diámetro.

Crecimiento

Este depende de tres factores que son: oxígeno, temperatura y alimento. El ritmo de crecimiento de las truchas en cautiverio, como por ejemplo en la estación trutícola "El Zarco" es muy baja crece de 125 a 150g en un año debido a la irregularidad y baja calidad del alimento. Además, la temperatura abajo de la óptima (la óptima es de 15.5 a 18°C y en el Zarco es de 8°C). En la estación trutícola Pucuateo, crece de 200 a 225g en un año, por lo general en medios lóticos crece menos que en medios lénticos. En el charco temporal de Cuitziltán Mich, llegaron a crecer 1,200g en 11 meses (comprobado más de dos veces). En los medios lóticos las truchas tienen

resuelve sus necesidades de oxígeno y temperatura, pero la escasez de alimento limita su crecimiento.

Alimentación

Con respecto a su alimentación se sabe que es una especie carnívora entomófaga, ligeramente ictiófaga, sus crías son zooplancótonas y consumen cladóceros (*Daphnia* y *Bodnia*) y copepodos. La parasitan nemátodos, crustáceos, tremátodos, protozoarios y bacterias (FIGURA 34).

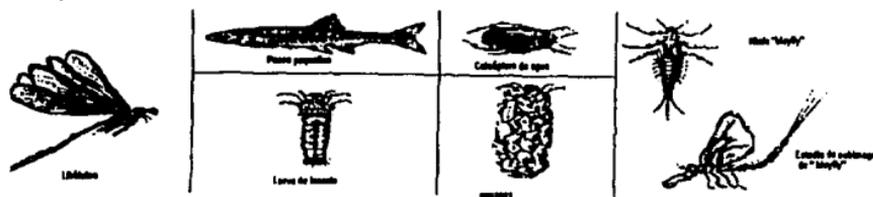


FIGURA 34. PRINCIPAL ALIMENTO DE LA TRUCHA ARCOIRIS (ROSAS MORENO, 1985).

Reproducción Artificial

Los pasos que se siguen en la estación trufícola "El Zarco" son:

- 1) Captura y selección de los reproductores
- 2) Desove manual, fecundación y lavado del huevo. Se coloca a la trucha con el abdomen hacia arriba y con un suave masaje en la región abdominal se sacan a los óvulos que caen en una charola que no tiene agua, se repiten los masajes hasta que la hembra queda vacía, después se hace la eyaculación del macho de la misma forma que en la hembra, con una pluma de ave se mezclan los dos y se dejan de 5 a 10 min. Después se lava con agua hasta que los huevos quedan limpios y se pasan a las incubadoras.
- 3) Incubación. Las piletas de incubación son de concreto, de forma rectangular de 10 X 0.3 X 0.3m con agua corriente. Se colocan los bastidores, que son pequeñas mesitas con tela de alambre que sostiene de 3000 a 4000 huevecillos. El tiempo de incubación es de 28 a 35 días en temp. de 8°C, la oxigenación es de 9 a 11 cm³ de oxígeno por litro, se mantienen en la semiobscuridad, a diario se revisan y se eliminan los muertos o contaminados por hongos o bacterias.

4) Alevinaje. Es el tiempo desde que nace hasta que se reabsorbe la bolsa vitelina. Los alevinos eclosionan y se van al fondo de la piletta, su bolsa vitelina es tan voluminosa que no le permite grandes desplazamientos, se mueven por cortos tramos y arrastrándose. Entre 15 y 20 días después de nacido, reabsorbe su bolsa vitelina y empieza a comer.

5) Cría. Cuando nace mide de 20 a 25mm cuando reabsorbe su bolsa vitelina mide 30cm y se alimenta con hígado crudo de caballo, res, etc. o con alimentos pelletizados para alimentar truchas en sus primeras etapas del desarrollo.

6) Engorda. Si se quiere que crezcan más rápido, se ponen en estanques de crías más grandes, de 20 X 2 X 0.8m colocando 100 crías por m² suministrando alimento pelletizado, aquí permanecen hasta que alcanzan de 0.12 a 0.15 m que es cuando se liberan a los estanques de engorda, charcos temporales o arroyos, que reúnen las características que exigen.

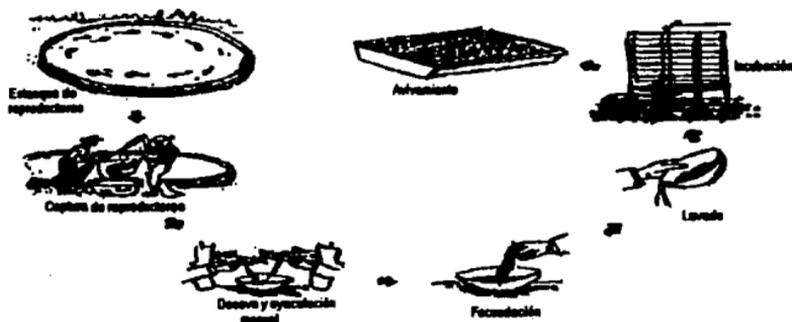


FIGURA 35. REPRODUCCIÓN ARTIFICIAL DE LA TRUCHA ARCOIRIS (ROSAS MORENO, 1985).

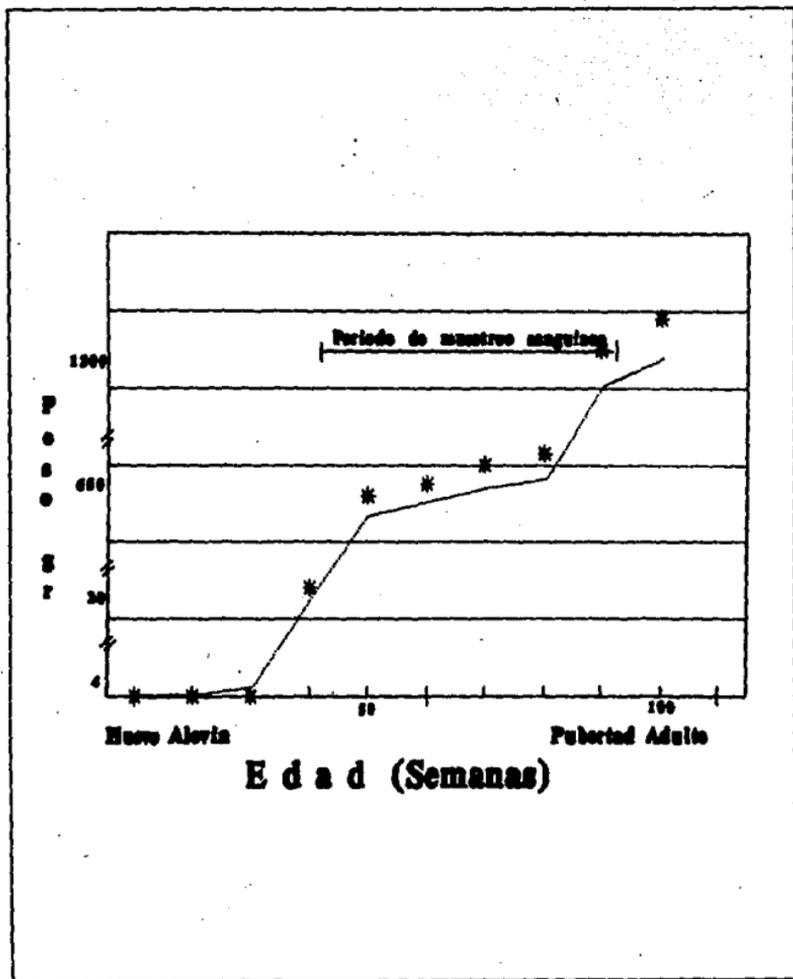


FIGURA 28. PERFIL DE CRECIMIENTO DE TRUCHAS DEL CENTRO TRUTRICOLA "EL ZARCO".