



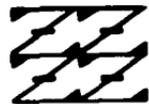
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA**

**"EFECTO DE LA DEHIDROEPIANDROSTERONA
SOBRE EL DESARROLLO Y FUNCION DE LA
GLANDULA TIROIDES EN EL EMBRION DE POLLO"**

T E S I S
PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G O
P R E S E N T A :
ESTRELLA ZAPATA GOMEZ

C N A M
F E S
Z A R A G O Z A



DIRECTOR DE TESIS: DR. ENRIQUE PEDERNERA ASTEGIANO

MEXICO, D. F.

1997

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Dedico esta tesis a :

***A Dios.**

***A Hamlet, mi padre.**

***A Esperanza, mi madre:**

Por darme la vida y porque su amor, su apoyo y su esfuerzo me dieron la fuerza para alcanzar esta meta.

***A Jaime, mi esposo y el amor de mi vida :**

Porque su amor y su cariño son mi apoyo para alcanzar mis sueños.

***A Yonathan y a Jaime Yovanni, mis hijos:**

Porque su sonrisa es mi mejor regalo y me animan a darles lo mejor de la vida.

***A Hamlet y a Rossy, mis hermanos:**

Porque su cariño, ejemplo y apoyo lo he tenido desde niña.

***A la Sra. Angelina y a todas mis cuñadas,**

Por el apoyo que me dieron para que realizara esta tesis..

Estrella

¡ al fin !!!!

AGRADECIMIENTOS

- A la Universidad Nacional Autónoma de México.
- A la Facultad de Estudios Superiores - Zaragoza.
- Al Departamento de Embriología de la Facultad de Medicina.
- Al Departamento de Fisiología del Centro de Investigaciones Biomédicas.
- Al Centro de Instrumentos, UNAM.
- Al Dr. Enrique Pedernera A. por su dirección, asesoramiento y sobre todo, su paciencia.
- Al Dr. Carlos Valverde por su apoyo y colaboración.
- A la M. en C. Brenda Anguiano por su apoyo y asesoramiento en el desarrollo del RIA.
- A la Dra. Carmen Méndez por su amistad, apoyo y asesoramiento en el manejo de los pollos.
- A la Biól. Rosario Ortiz por su apoyo en la técnica histológica.
- Al Dr. Gabriel Corkídi por su apoyo en la morfometría.
- Al Dr. Sergio Cuevas C. por su amistad y apoyo en el tratamiento estadístico.
- Al M. en C. Enrique Mendieta por su asesoramiento y gran apoyo.
- Al M.C. Raul Zavala por su amistad apoyo y motivación.
- A la M. en IBSH. Angélica Flores por sus consejos y gran apoyo.
- A la M. en BRA. Ma. Judith Villavicencio por su gran apoyo.
- A todos los profesores de la carrera de Biología de la FES-Zaragoza.
- A Emma Rodríguez M. por su apoyo y motivación, y sobre todo, por su gran amistad.
- A Anita, Yola, Elma y a todos aquellos que colaboraron de alguna forma en la elaboración de esta tesis.

;mil gracias!

Esta tesis fué realizada en el Departamento de Embriología de la Facultad de Medicina, UNAM, y en el Laboratorio de Fisiología del Centro de Investigaciones Biomédicas, UNAM; bajo la dirección del Dr. Enrique Pedernera A. y con el asesoramiento dentro de la FES-Zaragoza del M.en C. Enrique Mendieta M.

El jurado asignado fué:

Presidente : M.C. Raul Zavala Chavero.

Vocal : Dr. Enrique Pedernera Astegiano.

Secretario : M. en C. Enrique Mendieta Márquez.

Suplente : M. en BRA. Ma. Judith Villavicencio M.

Suplente : M. en IBSH. Angélica Flores Ramírez.

INDICE

Resumen	1
Introducción.....	2
<i>Tiroides</i>	3
<i>Suprarrenales</i>	14
Planteamiento,Justificación, Hipótesis y Objetivos.....	22
Material y Métodos.....	23
Resultados.....	30
<i>Histológicos</i>	30
<i>Bioquímicos</i>	36
Discusión.....	42
Conclusiones.....	46
Bibliografía.....	47
Anexo 1.....	52
Anexo 2.....	55

RESUMEN

En el presente trabajo se estudió la participación de la dehidroepiandrosterona (DHEA) un andrógeno suprarrenal, en el desarrollo y la función de la glándula tiroides en el embrión de pollo. Se administró DHEA durante la incubación del embrión de pollo y se evaluó la actividad de la glándula tiroides al nacimiento. Se utilizaron huevos fértiles que recibieron por aspersion en el tiempo cero de incubación, una dosis única de DHEA (120 µg/ml). La absorción de DHEA se realizó en forma gradual y a los 21 días cada huevo absorbió 2nM. Un día después de la eclosión, los pollos se sacrificaron colectando la glándula tiroides y la sangre de éstos. Se hizo un estudio morfométrico de los folículos tiroideos para evaluar los cambios encontrados. Con el suero, se cuantificó las concentraciones de hormonas tiroideas como triyodotironina (T₃) y tiroxina (T₄). Las medias de radioinmunoanálisis específico en los resultados obtenidos, con respecto a los testigos fueron: una disminución del área folicular en la glándula tiroides y una disminución en la concentración circulante de hormonas tiroideas: T₃ disminuyó de 76.7 ng/dl a 57.83 ng/dl , con una disminución menos drástica de T₄ (0.451 µg/dl a 0.393 µg/dl). Concluyendo que la administración de DHEA, modifica la función tiroidea en la etapa embrionaria del pollo.

INTRODUCCION

Esta tesis forma parte de un proyecto que estudia la interrelación de las hormonas esteroideas suprarrenales con otras glándulas durante el desarrollo de aves domésticas.

Las aves domésticas como pollos, patos, pavos etc. presentan una velocidad de crecimiento mayor que la de los mamíferos y tienen una alta tasa de conversión alimenticia (cantidad de alimento necesario para producir un kilogramo de carne) y como todos los organismos vivos su desarrollo y crecimiento se ve afectado por factores externos, como son las nutricionales, ambientales y por factores internos, tales como los genéticos, celulares y neuroendócrinos.

Por lo tanto, todos los estudios que se realicen para obtener información sobre su complejo sistema fisiológico en su desarrollo y crecimiento son importantes para el mejoramiento de su producción y calidad.

El propósito del presente trabajo de tesis fué estudiar la participación de la dehidroepiandrosterona (DHEA), en el desarrollo y función de la glándula tiroides del pollo en su etapa embrionaria. La DHEA es una hormona esteroide producida por las glándulas suprarrenales en los vertebrados (Ganong, 1994).

La mayoría de los estudios que se han realizado hasta la fecha sobre el efecto de la DHEA sobre tiroides, utilizan mamíferos como ratas y conejos en etapa prepúber y adulta; sin embargo, hay pocos sobre la etapa prenatal y ninguno en aves; por tal motivo, se requiere explorar los cambios que se pueden presentar en la morfología y fisiología de la glándula tiroides por efecto de una administración de DHEA en el desarrollo embrionario del pollo.

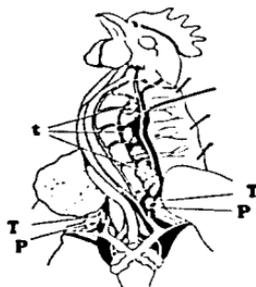
TIROIDES.-

La glándula tiroides es una glándulas endócrina tiene un importante papel en la regulación del metabolismo celular a través de la síntesis y secreción de dos hormonas: la Triyodotironina (T₃) y Tiroxina (T₄), que intervienen en muchas funciones metabólicas de los organismos.

Localización e irrigación:

La glándula en los organismos homeotermos esta formada por dos lóbulos y en el pollo se localiza en ambos lados de la tráquea sobre la cara ventrolateral del cuello, por fuera de la cavidad del tórax (Figura 1), se puede encontrar adherida a la carótida común por encima de la unión de la arteria carótida común con la arteria subclavia; su irrigación se da por las arterias tiroideas craneal y caudal proveniente de una rama de la arteria carótida común (Wentworth y Ringer ,1986).

Figura 1.-Localización de la glándula tiroides (T), la paratiroides (P), y el timo (t),en el pollo (Esquema tomado de Wentworth y Ringer ,1986)



Embriología e Histología.-

En las aves domésticas, la glándula tiroidea tiene una estructura similar a la de los mamíferos (Astier, 1980). Su formación comienza el 2o. día de incubación, se deriva de un primordio del piso faríngeo que surge al principio como una evaginación de dicho piso cerca del primer y segundo par de bolsas faríngeas. El primordio medio viene en forma de copa bilobulada con un tallo estrecho unido a la pared de la faringe, después se da la ruptura del tallo y la migración y separación lateral de los lóbulos como estructuras de forma creciente. Su forma y posición definitiva ocurre en el 5o. día de incubación (Romanoff, 1960; Astier, 1980; Wentworth y Ringer, 1986).

La glándula se compone de folículos que tienen forma de una esfera hueca formada por una sola capa de células epiteliales que limitan un espacio repleto de líquido: el espacio interfolicular está ocupado por vasos y tejido conectivo. La cavidad del folículo contiene un material gelatinoso de color ambarino que recibe el nombre de coloide (Wentworth y Ringer, 1986; Ganong, 1994). A diferencia de los mamíferos, la glándula tiroidea de las aves carece de células parafoliculares o células secretoras de calcitonina (Astier, 1980), ver Figura 2.

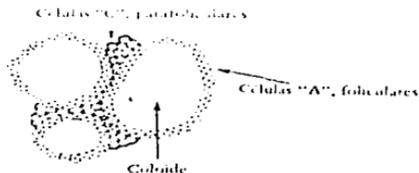


Figura 2 .-Aspecto histológico del folículo tiroideo (tomado de Flores y Cabeza de Flores, 1992)

Histológicamente la tiroides es encapsulada por tejido conectivo reticular, los folículos están compuestos por epitelio endodérmico de diferente altura dependiendo de su actividad. El epitelio varía de plano a cilíndrico que depende de su estado de secreción (Romanoff 1960 ; Wentworth y Ringer , 1986).

Además de las hormonas tiroideas las células foliculares producen una glucoproteína de alto peso molecular (PM 680 000) llamada tiroglobulina (TG), que forma la mayor parte del coloide y tiene la propiedad de yodarse debido a su orientación espacial, favoreciendo con ello la síntesis de hormonas que permanecen almacenadas dentro del folículo (Flores y Cabeza de Flores, 1992).

Ontogenia .-

La glándula del embrión de pollo de 7 días de incubación puede concentrar yodo (I₂), a pesar de que a esta edad los folículos y el coloide no son visibles. En el 9o. día, las gotas de coloide son visibles y el yodo se une a la tiroglobulina, y el embrión es capaz de formar monoyodotirosina. En el 13o., día la tiroides crece abruptamente, el yodo se acumula y se incorpora al coloide folicular (Romanof, 1960). Después de los 10-11 días de incubación, la tiroides del embrión de pollo comienza su función y secreción de tiroxina; en el decimoprimer día la tiroides es estimulada por la hormona estimulante de la tiroides (TSH), proveniente de la adenohipófisis, que regula la síntesis y liberación de las hormonas tiroideas (Wentworth y Ringer , 1986).

Fisiología .-

La tiroides sintetiza y secreta dos hormonas: la tetrayodotironina o tiroxina (T₄), y la triyodotironina (T₃); ambas hormonas se sintetizan en el coloide por yodación y condensación de las moléculas de tirosina, difiriendo entre sí por un átomo de yodo.

Biosíntesis de la Hormonas Tiroideas .-

La síntesis de las hormonas tiroideas (HT) en aves es muy similar a la que ocurre en los mamíferos. El yodo es el elemento principal en la síntesis de estas hormonas , y la principal fuente de éste son los alimentos y el agua; en el 9o. día el primer yodo inorgánico aparece en la tiroides y se sigue concentrando hasta que en el día 19 el 40% del yodo está en la tiroides del embrión, el otro 40% en otras partes del embrión y el 20% restante está en el huevo(Wentwort y Ringer, 1986). El proceso de biosíntesis ocurre de la siguiente manera:

1.-Captación del yodo:

El yodo inorgánico que ingresa por el tubo digestivo, pasa al torrente sanguíneo, y es incorporado por las células foliculares por dos mecanismos que son: difusión desde el líquido extracelular, y por un transporte activo conocido como: Bomba de yodo, que forma un gradiente electroquímico membranar e intracelular dependiente de la hormona estimulante de la tiroides (TSH); la velocidad de captación es considerada como un índice de la velocidad de síntesis y liberación hormonal.

2.-Oxidación:

Una vez dentro del folículo el yodo inorgánico es transformado a yodo orgánico, mediante un proceso enzimático en el que intervienen la tiroperoxidasa y que se conoce como oxidación. Esta reacción tiene lugar en la interfase célula-coloide e intervienen de manera estimulante TSH.

El yodo ya oxidado se incorpora a la TG, formándose así las yodotirosinas como la Monoyodotirosina (MIT) y la Diyodotirosina (DIT), la primera se forma cuando se incorpora un átomo de yodo en la posición 3 del núcleo aromático y la segunda cuando se añade otro en la posición 5 , esto ocurre dentro del coloide folicular (Figura 3).

3.-Acoplamiento:

El mecanismo en el cual produce la unión de las yodotirosinas MIT y DIT formando compuestos biológicamente activos se llama acoplamiento (figura 4), así dos moléculas de DIT se combinan para formar T_4 ; por otra parte una molécula de DIT se une a otra de MIT para formar T_3 (Figura 3 y 4). Este proceso se cree que ocurre dentro de la misma molécula de TG permitiendo la unión de moléculas a través de enlaces peptídicos.

El acoplamiento es defectuoso en estados de carencia de yodo, en ausencia o deficiencia de TSH y en tratamientos con drogas anti tiroideas (Wentworth y Ringer , 1986).

4.-Secreción:

Por medio del estímulo de TSH las hormonas tiroideas contenidas en las moléculas de TG del coloide folicular son introducidas al espacio intracelular por endocitosis, sobre estas moléculas actúan lisosomas de actividad proteolítica que las hidrolizan ,liberando T_3 , T_4 , MIT, DIT, I₂ y TG.

La T_3 y T_4 son enviadas a la circulación por exocitosis o quedan almacenadas en el foliculo. En este último caso, se combinan con la TG y si es necesario la TG es hidrolizada para liberar tiroxina, si aumentan las necesidades del organismo.

Cuando las celulas tiroideas se activan captan coloide por pinocitosis, donde los gránulos de coloide se fusionan con los lisosomas, las uniones peptídicas entre los residuos yodados y la tiroglobulina son rotas por proteasas y es entonces cuando la T_3 y la T_4 son liberadas al citoplasma.

Las tirosinas yodadas son desyodadas por una yodotiosindeshalogenasa, pero esta enzima no ataca a las tironinas yodadas como la T_3 y la T_4 , las que pasan a la circulación; el yoduro liberado por la desyodación de tirosinas es utilizado de nuevo (Ganong, 1994).

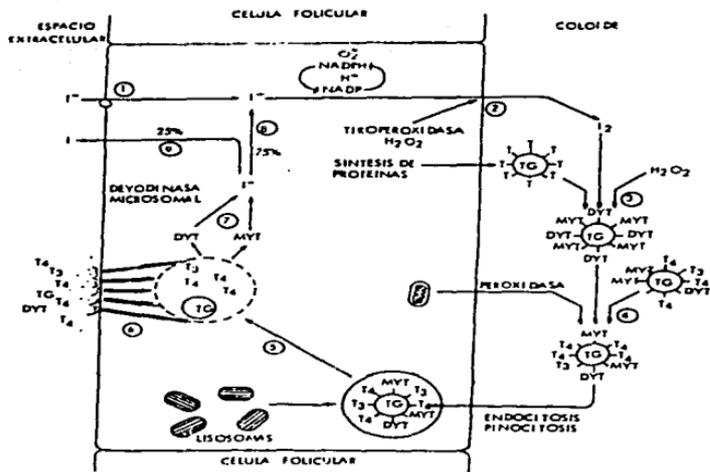


Figura 3.- Biosíntesis de las hormonas tiroideas: 1)captación del yodo, 2)oxidación, 3)formación de yodotirosinas, 4)acoplamiento y formación de yodotironinas, 5)proteólisis de la tiroglobulina, 6) secreción, 7)desyodación de las yodotirosinas, 8)yodo reutilizado, 9) yodo excretado (Esquema tomado de Flores y Cabeza de Flores, 1992)

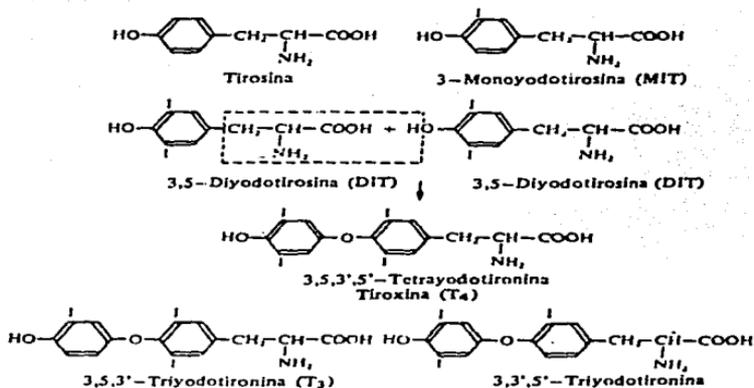


Figura 4.- Las moléculas de la Tirosina, la Monoyodotirosina, la Diyodotirosina, la Tetrayodotironina y la Triyodotironina (Barrington, 1975)

Transporte, Metabolismo y Degradación hormonal.-

En el torrente sanguíneo, las hormonas tiroideas se unen a algunas proteínas plasmáticas. de esta manera son transportadas.

Se sabe que en los vertebrados existen por lo menos tres proteínas transportadoras: la inter- α globulina (TBG) que es la principal proteína plasmática transportadora de las hormonas tiroideas, la prealbúmina (TBPA) y la albúmina (ALB) (Robbins y Rall , 1960). Se ha visto que los pollos carecen de TBG y por consiguiente las hormonas tiroideas se encuentran unidas a la albúmina y en menor porcentaje a la TBPA (Mitchell y Steles, 1984; Tata y Shellabarger, 1959).

La concentración plasmática de las hormonas tiroideas ha sido medida en diferentes especies animales, y se ha visto que en las aves la concentración de T_4 es menor o similar que en los mamíferos, no así la concentración de T_3 que es 2 ó 3 veces mayor (Tata y Shellabarger, 1959; Astler, 1980).

El hígado y los riñones desempeñan un importante papel en el catabolismo de las HT, interviniendo en la desyodación. Parte del yodo liberado es excretado en la orina, pero la mayor parte retorna a la tiroides, donde puede ser utilizado de nuevo. No todas las secreciones hormonales siguen este camino, ya que otra parte se conjuga principalmente en el hígado con la formación de glucoronidos o sulfatos, que penetran en el intestino con la bilis. A partir de aquí, algunas tironinas vuelven a la sangre y el resto se pierden en la orina y las heces (Barrington, 1975).

La velocidad de degradación de las HT es muy rápida en las aves como consecuente de su corta vida biológica, la cual se mide en horas: en pollos la vida media de la T_4 es de: 3.3 a 8.3 hr. (Wentworth y Ringer, 1986).

Regulación de las hormonas tiroideas.-

La actividad de la glándula tiroides es regulada por la TSH que es producida por la adenohipófisis, esta regulación se da tempranamente en el desarrollo embrionario del embrión de pollo (Thommes y col., 1992).

El eje hipotálamo-hipófisis-tiroides es un sistema de control dinámico negativo, en el cual un incremento del nivel circulante de HT frena la secreción de TSH, estimulada a su vez por la hormona liberadora de tirotrópina (TRH) que proviene del hipotálamo.

La TRH, es producida por las neuronas del hipotálamo, tiene la capacidad de estimular la liberación de TSH y se forma a partir de un precursor macromolecular, probablemente sintetizado en los ribosomas y sobre el cual actúa una enzima llamada TRH-sintetasa.

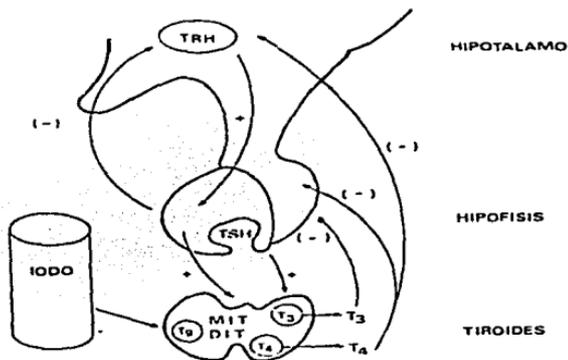
Al ser sintetizada pasa al sistema de vasos porta hipofisarios, por donde llega a las células tirotropas de la adenohipófisis, estimulando la síntesis y liberación de TSH.

La TSH es una glucoproteína con peso molecular de 28 000 daltons, que contiene 211 aminoácidos, hexosas, hexosaminas y ácido siálico; se compone de dos subunidades, alfa y beta, siendo la beta la que le da su especificidad funcional.

La TSH es capaz de estimular varias fases del metabolismo tiroideo por mediación del adenosín 3-5 monofosfato cíclico; la TSH actúa combinándose con un receptor específico en la membrana de la célula tiroidea, estimulando la producción de yodotironinas. El esquema del sistema de retroalimentación del eje Hipotálamo-Hipófisis-Tiroidea se ilustra en la Figura 5.

La acción de la TSH sobre la glándula tiroidea produce un aumento de su volumen y vascularidad, aumenta la captación de yodo por ésta, aumenta la formación de tiroglobulina y su yodación, la síntesis de hormonas tiroideas y su liberación (Flores y Cabeza de Flores, 1992).

Figura 6.- Sistema de retroalimentación del eje hipotálamo-hipófisis-tiroides (Esquema tomado de Flores y Cabeza de Flores, 1992)



Mecanismo de acción de las hormonas tiroideas.-

Las hormonas tiroideas penetran en las células y la T₃ se une a los receptores en los núcleos. T₄ se une más lentamente, ya que la mayor parte de ésta se convierte en T₃. Enseguida, el complejo hormona tiroidea-receptor se une al DNA y aumenta la expresión de genes específicos. Los RNAm resultantes favorecen la producción de varias enzimas que modifican la acción celular (Ganong, 1994).

Funciones de las hormonas tiroideas.-

La aportación de las HT es indispensable para el mantenimiento adecuado de la mayoría de los órganos; son indispensables para el desarrollo del embrión ya que su ausencia en el principio del desarrollo viene con un daño severo e irreversible del sistema nervioso y retardo en el crecimiento.

Entre las principales funciones de las hormonas tiroideas se encuentran: la regulación de la oxidación de carbohidratos y grasas, la síntesis de proteínas estructurales, la formación de componentes enzimáticos esenciales y su exportación a todas las células del organismo (Tata, 1980).

Las funciones de las HT se pueden resumir de la siguiente manera: aumentan el metabolismo basal, el consumo de calor, la absorción de la glucosa, la gluconeogénesis, glucogenólisis, el catabolismo proteico, y junto con la hormona del crecimiento promueven el crecimiento somático y la diferenciación celular (Flores y Cabeza de Flores, 1992).

LAS SUPRARRENALES.-

Las glándulas suprarrenales son dos estructuras de forma más o menos piramidal situadas encima de ambos riñones; constan de una parte superficial o corteza y una porción central o médula. Su irrigación proviene de tres ramas arteriales principales: la superior, la rama de la frénica; la media, rama de la aorta; y la inferior, rama de la arteria renal. En forma secundaria son irrigadas por la arteria ovárica, la espermática y las intercostales (Williams, 1985).

En aves, la suprarrenal es diferente a la de los mamíferos, se forma de tejido cortical y células cromafines intermezclados entre sí; las células corticales se agrupan en forma de cordones que salen del centro de la glándula, y forman el 70-80% de la misma. El tejido cromafín está formado por dos tipos de células: las que liberan epinefrina y las que liberan norepinefrina y se encuentra en un 15-25 % en el tejido adrenal (Harvey, 1986).

La suprarrenal cortical en aves se divide en dos zonas: la subcapsular y la interna. La primera produce la aldosterona y la segunda la corticosterona.

Hormonas suprarrenales.-

En los vertebrados estudiados hasta el presente los principales esteroides elaborados por la corteza suprarrenal son: glucocorticoides, mineralocorticoides y hormonas sexuales y que reciben su nombre según su acción predominante.

Todas las hormonas corticales son esteroides con la misma estructura básica: el núcleo ciclopentanoperhidrofenantreno. Sus diferentes modificaciones generan las hormonas esteroides con sus diferentes funciones.

El principal precursor de la síntesis de hormonas suprarrenales es el colesterol donde se añaden o sustraen a este núcleo radicales químicos, dando como resultado diferentes productos finales.

La vía metabólica de la biosíntesis de esteroides mejor conocida es la que implica la conversión de colesterol a pregnenolona, la que es transformada por una serie de enzimas estables en los principales corticosteroides activos biológicamente (Williams, 1985; Eisenstein, 1970) Figura 7.

Los *glucocorticoides*, son representados principalmente por el cortisol, cortisona y la corticosterona; esta última es la más importante en aves y roedores (Horrobin, 1976) y actúan sobre todo en el metabolismo proteico, lipídico y de carbohidratos, promueven el catabolismo proteico, el aumento de producción de glucógeno (gluconeogénesis) y el incremento de glucosa en la sangre, además de la movilización de lípidos de sus depósitos en tejido adiposo.

Los *mineralocorticoides*, de los cuales el más importante es la aldosterona, que actúan principalmente a nivel de los túbulos renales, la mucosa gástrica, las glándulas salivales y sudoríparas, estimulando la reabsorción de sodio y la pérdida de potasio.

Entre las *hormonas sexuales* se encuentran la androstendiona y la dehidroepiandrosterona (DHEA), esta última es la principal y la única secretada en cantidad fisiológicamente significativa. La producción de andrógenos y estrógenos es pequeña en comparación con la producción de estas hormonas por las gónadas (Williams, 1985).

La síntesis de cortisol y andrógenos está regulada por el eje hipotálamo-hipófisis-suprarrenal por acción de la hormona adenocorticotrópica (ACTH) producida por la adenohipófisis. La síntesis de mineralcorticoides, se regula por el sistema renina-angiotensina, los niveles de sodio y potasio y los cambios de volumen de mineralcorticoides circulante. (Williams, 1985; Horrobin, 1976).

Síntesis de la Dehidroepiandrosterona.-

La DHEA es una hormona esteroide sintetizada en la zona reticular de la corteza suprarrenal, se deriva del colesterol y tiene función androgénica ya que tiene un efecto masculinizante y anabolizante, aunque su potencia sea inferior al 20 % de los andrógenos testiculares.

Su síntesis empieza cuando el colesterol es convertido en pregnenolona, parte de ésta es convertida en 17α -hidroxipregnenolona, luego sufre una remoción en la cadena lateral y sustitución del grupo ceto en posición 17 para formar la DHEA (Figura 7).

La DHEA es en realidad una prohormona dado que después se convierte en un andrógeno más potente, la androstenediona, la que al sufrir una reducción en la posición 17 produce la testosterona (Ganong, 1994; Granner, 1986; Williams, 1985).

El efecto androgénico de la DHEA es similar al resto de los andrógenos, pero en potencia es cinco veces más débil, (Tal y Sulman, 1973), de manera sulfatada es inactiva, pero con la eliminación del sulfato es activa.

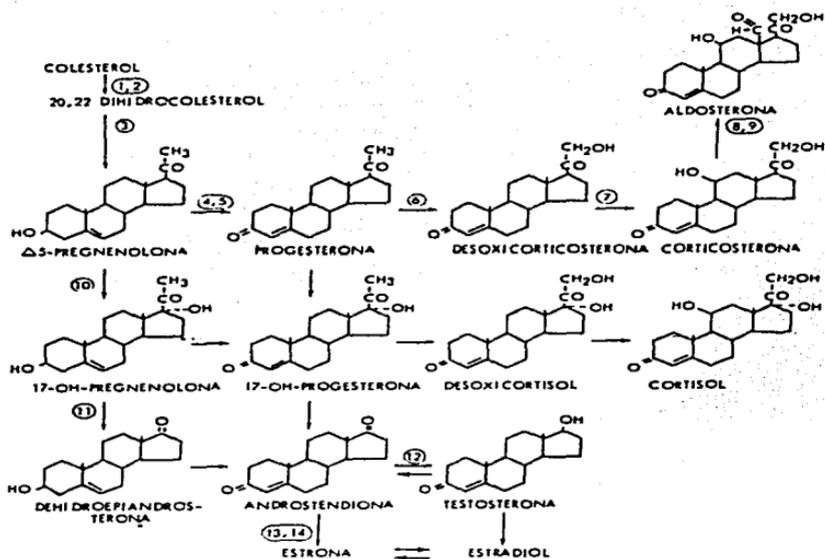


Figura 7.- Biosíntesis de esteroides en la corteza suprarrenal (tomado de Flores y Cabeza de Flores, 1992). Enzimas 1) 20-hidroxilasa, 2) 22-hidroxilasa, 3) 20,22-desmolasa; 4) 3 β -OH-deshidrogenasa; 5) 5,4-isomesasa, 6) 21-hidroxilasa; 7) 11 β -hidroxilasa; 8) 18-hidroxilasa; 9) 18-deshidrogenasa; 10) 17 α -hidroxilasa; 11) 17,20-desmolasa; 12) 17- α -hidroxilasa; 13) 19-hidroxilasa; 14) aromatasa

La síntesis y secreción de la DHEA por la suprarrenal está regulada por la ACTH producida en la hipófisis y una hipersecreción de ésta afecta los caracteres sexuales secundarios (Ganong, 1994. Granner, 1986. Williams, 1985).

Numerosos estudios han mostrado las diferentes cualidades de la DHEA aparte de su efecto androgénico. Así se ha visto que interviene en la inhibición de la síntesis del colesterol y de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (Tepperman y De la Garza, 1968).

En la actualidad la DHEA se estudia de manera experimental como antiobésico. Nestler y col. en 1988, administraron DHEA oralmente a personas obesas (1600 mg./día x 28 días) encontrando una reducción de la grasa e incremento de la masa muscular; Mac Ewen y col. en 1989, encontraron que la DHEA reduce el nivel de colesterol en la sangre.

En otros estudios en relación a la prevención del cáncer de mama y útero (Adams, 1978, Li y col. 1978). Shuartz y Whitcomb (1988), mencionan que el suministro de DHEA a mujeres pre y menopáusicas disminuye la predisposición a estos padecimientos y hacen una revisión sobre los posibles efectos terapéuticos de la DHEA. También se ha explorado su efecto como anti-diabético por la disminución de la hiperglucemia, la conservación de las células beta y el incremento en la sensibilidad de la insulina al ser administrado en la dieta (Coleman y Leiter, 1982).

Diferentes estudios han demostrado los beneficios y efectos de la administración de DHEA en la prevención de la diabetes, la obesidad, el cáncer y las deficiencias en el sistema inmunológico (Nestler, 1995).

Efecto de las hormonas suprarrenales sobre la función tiroidea.-

Desde hace tiempo se han realizado estudios tratando de encontrar si existe una relación entre las hormonas secretadas por las glándulas suprarrenales con la actividad fisiológica de la glándula tiroidea, sin embargo la información existente ha sido contradictoria ya que:

En los estudios de Perry (1951) y los de Albert y cols. (1952), reportan que la ACTH y la cortisona aumentan, la producción de las hormonas tiroideas en la rata.

Brown-Grant y cols. (1953), mencionan que un disturbio físico o emocional (stress) en el conejo disminuye la actividad de la glándula tiroidea. Como en el estado de " stress" se liberan hormonas suprarrenales, tanto de la médula como de la corteza suprarrenal, los autores determinaron que con la administración de derivados de adrenalina, cortisona o con ACTH hipofisiaria se inhibe la liberación de yodo por la tiroidea. Los mismos autores en 1954, afirman que la corteza suprarrenal tiene relación con la actividad tiroidea en el conejo, ya que al administrarle esteroides suprarrenales, como la cortisona, disminuyó la liberación de hormonas tiroideas (T₃ y T₄), se redujo la sensibilidad de la glándula tiroidea a la TSH, disminuyó la liberación de TSH por la hipófisis y aumentó el desecho de yodo por el riñón.

Federman y cols. (1958) trabajaron en humanos sobre los efectos del metiltestosterona sobre la función tiroidea, el metabolismo de la tiroxina y la unión de ésta con las proteínas séricas, encontrando que el tratamiento con andrógenos disminuía la capacidad de unión de la tiroxina con la proteína transportadora en el suero y como consecuencia se reduce la concentración de esta proteína aumentando el nivel de tiroxina libre.

Howard y cols. (1971), estudiaron el efecto biológico de esteroides activos en la tiroides humana, encontrando que los glucocorticoides en dosis farmacológicas alteran la liberación de TSH. Por otra parte, dosis de 1-0.05 mg de etinil estradiol suprimían los niveles de circulación de TSH, mientras dosis de 3 mg inhibían directamente la liberación de hormonas tiroideas. En el mismo estudio, la progesterona, la testosterona y el acetato de desoxicorticosterona en dosis de 10 a 20 mg no producen cambios en la liberación de yodo radiactivo: en cambio, en dosis farmacológicas de 50 mg, 100 mg y 150 mg respectivamente producen una inhibición parcial.

Tal y Sulman (1973), estudiaron este fenómeno en en ratas tratadas con DHEA, encontrando que este esteroide estimulaba la actividad tiroidea, aumentando la secreción de hormonas tiroideas, la altura del epitelio tiroideo, así como el aumento en la secreción de TSH adenohipofisaria. En 1975 encontraron que la DHEA estimulaba la secreción de TSH y tiroxina, describiendo un sinergismo entre la DHEA y la hormona del crecimiento ya que ambas aumentaban el peso tiroideo.

Re y col. (1976), encontraron que los glucocorticoides en el hombre disminuían la captura de yodo radioactivo en la tiroides y aumentaban los niveles de TSH, mientras que Christianson y col. (1981), encontraron que las hormonas esteroides androgénicas administradas en ratas incrementaban los niveles de TSH en el suero. Por otra parte Welle y cols. (1990), encontraron que al administrar DHEA en humanos, los niveles de T_3 , T_4 y colesterol no eran afectados, concluyendo que la DHEA no es importante en la regulación de energía en los humanos.

Como puede apreciarse los resultados son disímiles entre sí, aunque debemos considerar que las numerosas variables presentes, tales como: dosis, especie, edad, y el esquema de tratamiento pueden explicar las discrepancias observadas.

Planteamiento del problema.-

Como se sabe, durante el desarrollo embrionario la glándula suprarrenal fetal sintetiza y libera grandes cantidades de sulfato de DHEA (Norris, 1985) por lo tanto, sería muy interesante conocer si aparte de participar como prohormona en la síntesis de hormonas esteroideas, ésta interviene de alguna manera en el desarrollo y función de otras glándulas, en este caso de la glándula tiroides.

Justificación.-

Este trabajo se hizo para conocer la participación de la DHEA en el desarrollo y función de la glándula tiroides en el embrión de pollo. La mayoría de los trabajos que donde se estudió esta relación glandular, son en mamíferos y en etapas posteriores a la embrionaria.

Hipótesis.-

Si la administración de dehidroepiandrosterona postnatal afecta el desarrollo y la actividad de la glándula tiroides, entonces dicha glándula también se verá modificada cuando se administre durante el desarrollo embrionario.

Objetivos.-

General:

Determinar si la DHEA tiene una influencia sobre el desarrollo y la función de la glándula tiroides durante el desarrollo prenatal del pollo.

Particulares:

- a) Hacer un estudio morfométrico de los folículos tiroideos a través de cortes histológicos de la glándula, para evaluar los cambios ocurridos en éstos durante el tratamiento con DHEA.
- b) Cuantificar las concentraciones de hormonas tiroideas por Radioinmunoanálisis en el suero sanguíneo, de testigos y tratados con DHEA.

MATERIAL Y METODOS

MATERIAL BIOLÓGICO.-

Se trabajó con dos lotes de 100 huevos fértiles de pollo de engorda de la línea Arbor Acres obtenidos de la granja incubadora de Atongo II en Querétaro, Querétaro.

La incubación se llevó a cabo en una incubadora Chicken Master a una temperatura de 37.8°C, con una humedad relativa del 80%, y una circulación forzada de aire.

DISEÑO EXPERIMENTAL.-

A un primer lote de 100 huevos se le aplicó por aspersión en el tiempo cero de la incubación, una dosis única de solución alcohólica (30%) de DHEA (120 µg / ml). Después de los 21 días que dura la incubación, cada huevo absorbió a través del cascarón una cantidad equivalente a una concentración de 2 nM de la hormona (Rubio, 1992).

Un segundo lote de igual número fué el lote control, al cual se sometió al mismo procedimiento de aspersión, excepto que no se les administró la hormona.

A las 24 h. post-eclosión todos los pollos se sacrificaron; primero se anestesiaron, luego se desangraron de la arteria yugular. Se colectó el lóbulo izquierdo de la glándula tiroides.

Técnica histológica.-

Para el estudio morfológico la glándula, se fijó en una solución de formol (10 %) amortiguada durante 24 hrs. Posteriormente se deshidrató en alcohol a diferentes graduaciones por 30 min. (50%, 70%, 80%, 96% y 100%); en soluciones de alcohol-xilol (1: 1) y aceite de cedro-xilol (1 1) durante 30 min; en xilol durante 5min. Para terminar se sumergió en paraplast 1, paraplast 2 y el paraplast de la inclusión final.

Se hicieron cortes en un microtomo de la parte media de la tiroides de un espesor de 4 micras se procedió a la tinción de los cortes con hematoxilina.

Los cortes se desparafinaron en xilol por 5 min. (2 cambios); en alcohol a distinta concentración (96%, 70%, 50%) y por agua destilada durante 3 min.

La tinción se hizo en hematoxilina de 1 a 3 min.; se lavó 5 min. con agua de la llave y posteriormente con agua destilada; después se sumergió en alcohol 3min. (50 % y 70 %), posteriormente en eosina alcohólica durante 1 min., alcohol (96%) 2 min.; alcohol absoluto 2 min.; alcohol-xilol (1:1) 2 min; xilol 5 min. (2 cambios); y se montaron en resina (Humanson, 1967; Estrada y cols. , 1982).

De cortes representativos de la glándula de 18 animales control y 18 tratados, se hizo un estudio morfométrico midiendo el área y el diámetro de la luz de los folículos tiroideos; estas mediciones se hicieron con ayuda de un microscopio y un programa de computadora analizador de imagenes (BIOCOM), midiendo cinco campos ópticos diferentes de cada glándula.

Técnica Bioquímica.-

El suero se obtuvo de la sangre de yugular colectada al momento de sacrificar a los pollos. ésta se recibió en tubos de ensayo y se dejó coagular a temperatura ambiente. luego se centrifugó durante 20 min. (1500 rpm), después se decantó el suero de cada tubo en cápsulas Ependorff, a cada muestra se le agregó una gota de azida de sodio al 0.2 % como conservador. Las muestra se guardaron a -20°C para su posterior análisis por Radioinmunoanálisis (RIA).

Para cuantificar la cantidad de hormonas tiroideas se hizo un RIA del suero sanguíneo de 83 pollos control y de 83 pollos tratados, el cual se llevó a cabo de la siguiente manera :

Se utilizó el método estandarizado para pollo de Urtz (1989), con un rango en la curva estándar de 6.25 - 500 ng/dl para T₃ y 0.0125 - 0.4 µg/dl para T₄; empleando una solución amortiguadora TRIS-HCl (ph 8.6, 0.05 M), y suero hipotiroideo de pollo. Los Anticuerpos (Ab) se utilizaron , en una dilución de 1:700 para T₄ (Sigma No. 2652, lote 78 F- 4851), y una dilución 1: 3000 para T₃ (obtenido en nuestro laboratorio). Las hormonas marcadas con I₁₂₅ fueron de New England Nuclear , T₃* (actividad específica de 1200 µCi / µg) y T₄* (1100 µCi / µg). Los detalles de la preparación de soluciones se incluyen en el anexo 1.

Para la realización del RIA para cada hormona , se preparó por duplicado los tubos de unión no específica, cero, curva estándar y los problemas (ver anexo 2); los reactivos añadidos a cada tubo para medir tanto T₃ y T₄ se ilustran en el siguiente cuadro:

T₃ T₄

Unión no específica	Buffer	150 µl	390 µl
	Sucrohipo	50 µl	10 µl
	T*	100 µl	100 µl
Cero	Buffer	250 µl	290 µl
	Sucrohipo	50 µl	10 µl
	T*	100 µl	100 µl
	Ab	100 µl	100 µl
	Buffer	150 µl	190 µl
	Sucrohipo	50 µl	10 µl
Curva std	T*	100 µl	100 µl
	Ab	100 µl	100 µl
	Estándares	100 µl	100 µl
Problemas	Buffer	250 µl	290 µl
	T*	100 µl	100 µl
	Ab	100 µl	100 µl
	Problemas	50 µl	10 µl

Después de tener todos los tubos preparados se dejaron incubar a una temperatura de 4 °C , los de T₄ por 48 hrs. y los de T₃ por 24 hrs. (Urtz 1989). Al término de la incubación se procedió a separar la fracción libre y la unida , en el caso de T₃ se utilizó el método de Carbón -Dextrán al 0.5% , agregando 1 ml de ésta solución a cada tubo . se dejó reposar 15 min. y se centrifugó por 30 min. a 2500 - 3000 rpm.

Para T₄ se utilizó un segundo anticuerpo (R-0881-AntiRabbit IGG, Sigma, desarrollado en cabra). 25 µl por tubo de una dilución 1: 20 en buffer, más 10 µl de SNC (Suero Normal de Conejo) y se dejó incubar 1 hora. Después de este tiempo se agregó 1 ml por tubo de polietilenglicol al 20 % y se centrifugó 30 min a 2500 - 3000 rpm.

En ambos casos después de centrifugar todos los tubos se decantaron y se contó tanto el precipitado como el sobrenadante en un contador de centelleo para radiaciones gama (Packard).

CALCULOS.-

Después del conteo en valores de radioactividad (cuentas por minuto, cpm) del precipitado y el sobrenadante se realizaron los cálculos y se graficó la curva estándar en papel milimétrico común .

Los cálculos se realizaron de la siguiente manera:

$$\text{Cuentas del sobrenadante} = \text{Cuentas Unidas (Fracción Unida)}$$

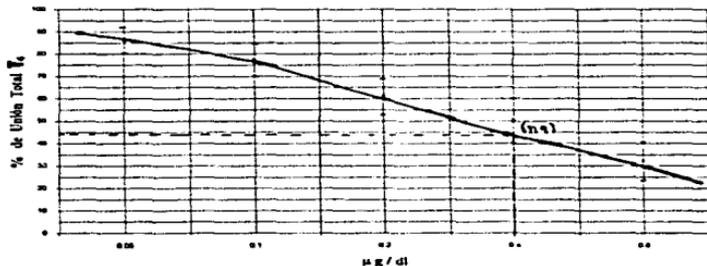
$$\text{Cuentas del precipitado} = \text{Cuentas Libres (Fracción Libre)}$$

$$\text{Unión no específica (UNE)} = \frac{\text{Cuentas unidas}}{\text{Cuentas unidas} + \text{Cuentas libres}} \times 100$$

$$\text{Porcentaje de unión total (\% UT)} = \frac{\text{Cuentas unidas} - \text{UNE}}{\text{Cuentas totales} - \text{UNE}} \times 100$$

El porcentaje de unión total se grafica en la ordenada (y) y las concentraciones de hormona (curva estándar) en la abscisa (x). El valor exacto de las muestras problemas se obtuvo por interpolación de la siguiente manera :

- 1) Localizar el valor de la respuesta a la muestra problema en el eje de las ordenadas (y).
- 2) Trazar una línea paralela al eje de las abscisas (x) hasta tocar la curva estándar.
- 3) De la curva estándar , proyectar una línea perpendicular al eje de las abscisas (x). El punto de intersección corresponde a la concentración de la muestra problema. Ejemplo:



Análisis Estadístico .-

De acuerdo al tamaño de muestra los resultados morfométricos se trataron con la prueba de " t de Student" para muestras poblacionales independientes, con una confianza del 95%. De acuerdo a la literatura esta prueba es la más confiable para encontrar una diferencia significativa entre dos medias poblacionales.

En los resultados bioquímicos se utilizó un "análisis de varianza, ANOVA" , para dos poblaciones (Murray,1982; Johnson, 1990; Dawson y col.,1993).

RESULTADOS

RESULTADOS HISTOLÓGICOS.-

En la imágenes A y C se muestra un corte de la tiroides de los animales testigo y en las imágenes B y D se muestran un corte de tiroides de los animales tratados con DHEA. En todas las imágenes se observan claramente los folículos tiroideos (F), el coloide (C), el epitelio con las células foliculares (CF), y gotas de colide (G).

En los animales testigo (fotos A y C), se observa el epitelio folicular cúbico y claro, con citoplasma, el coloide es abundante y se observan gotas de coloide. En los animales tratados (fotos B y D), se observa el epitelio folicular cúbico con los núcleos muy denso y sin citoplasma, el coloide disminuido, y menos gotas de coloide.

Las mediciones tanto del área como del diámetro se dan en los cuadros 1 y 2 con sus respectivos datos estadísticos, y la representación gráfica de los mismos se muestran en las figura 8 y 9 ; donde se observa una disminución del área y del diámetro folicular en las tiroides de los pollos tratados con DHEA. La reducción del área y diámetro folicular es aproximadamente de un 20 % respecto a los testigo .

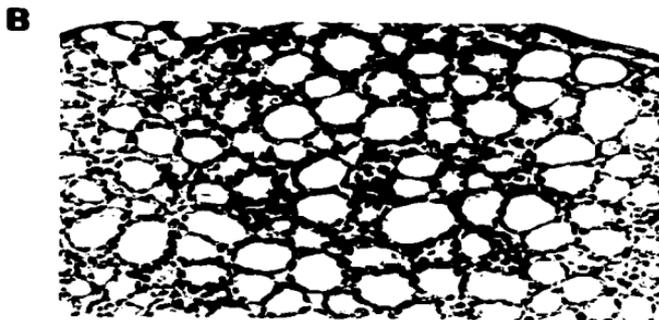
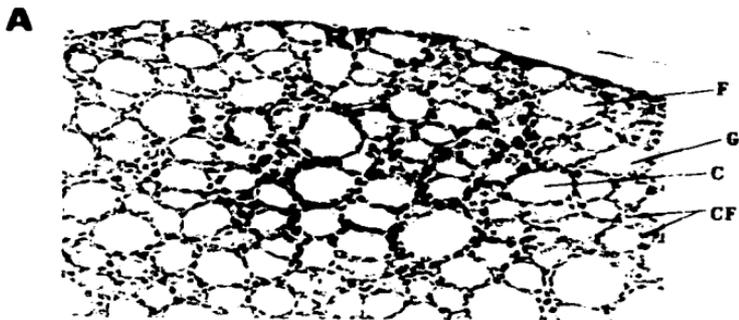


Foto A.-Corte de la tiroides (80X) de pollo testigo Folículo tiroideo (F), coloide (C), células foliculares (CF), gotas de coloide (G).

Foto B.-Corte de la tiroides (80 X) de pollo tratado con dehidroepiandrosterona

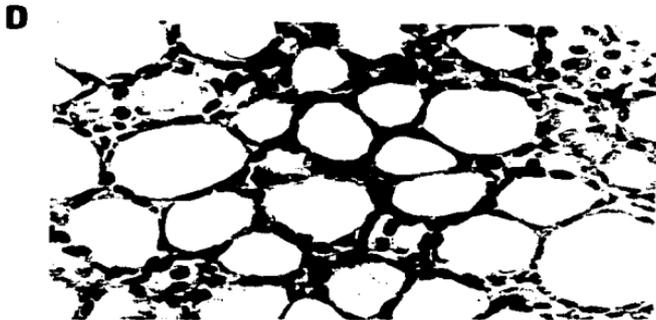
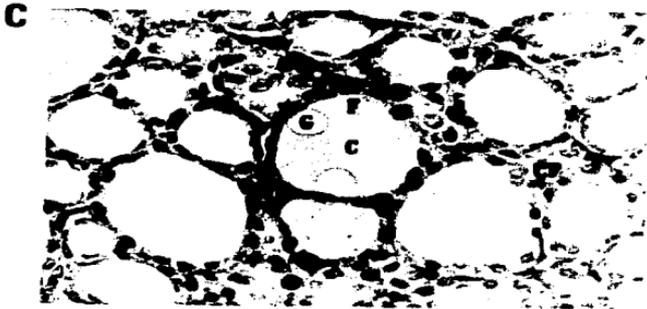


Foto C.-Corte de la tiroides (355X) de pollo testigo, folículos tiroideos (F), coloide (C), células foliculares y gotas de coloide (G).

Foto D.-Corte de la tiroides (355X) de un pollo tratado con dehidroepiandrosterona.

CUADRO 1 : Área Folicular Tiroidea.- Las mediciones se dan en micras y se realizaron en cinco campos ópticos diferentes en cortes representativos de cada glándula tiroidea, de los pollos testigo y los tratados con dehidroepiandrosterona (DHEA).

n	media de la media de las cinco mediciones en las áreas foliculares testigo (μ^2)	media de la media de las cinco mediciones en las áreas foliculares tratadas con DHEA (μ^2)
1	468.15	417.95
2	624.06	366.34
3	448.61	381.07
4	607.27	223.60
5	320.22	251.93
6	290.12	218.10
7	356.65	416.24
8	583.24	664.40
9	473.54	379.59
10	539.10	192.85
11	317.27	348.65
12	544.76	377.46
13	482.22	404.86
14	482.22	227.03
15	242.61	280.10
16	299.69	457.20
17	520.55	458.92
18	510.27	323.93
\bar{x}	452.32	355.01
d.e.	118.44	115.04
$\bar{x} \pm d.e.$	452.32 \pm 27.91	355 \pm 27.11

P < 0.025 vs. testigo (prueba "t" de student)

CUADRO 2: Diámetro Folicular Tiroideo .-Las mediciones se dan en micras y se realizaron en cinco campos ópticos diferentes en cortes representativos de cada gándula tiroidea, de los pollo testigo y los tratados con dehidroepiandrosterona (DHEA).

n	Medio de la media de las cinco mediciones en los diámetros foliculares testigo (micras)	Medio de la media de las cinco mediciones en los diámetros foliculares tratados con DHEA (micras)
1	22.51	21.52
2	26.27	20.37
3	22.53	20.20
4	25.89	15.85
5	19.09	16.90
6	18.76	15.66
7	19.90	21.49
8	25.32	27.06
9	22.56	20.70
10	24.86	14.41
11	18.83	19.61
12	24.97	20.76
13	24.18	21.36
14	23.24	15.85
15	16.47	17.85
16	18.40	22.57
17	24.02	22.50
18	23.71	18.83
\bar{x}	22.30	19.64
d.e.	2.97	3.14
St.e.e.	22.30±0.70	19.64±0.74

P < 0.025 vs. testigo (prueba "t" de student)

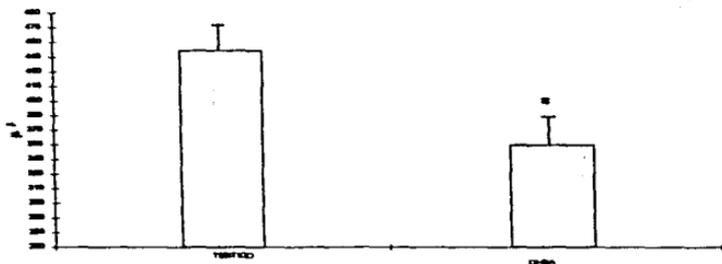


Figura 8: Se muestran las medias \pm e.e. en micras del área folicular de los pollos testigo y los tratados con dehidroepiandrosterona (DHEA).
*P < 0.025 vs. testigo (prueba "t" de student)

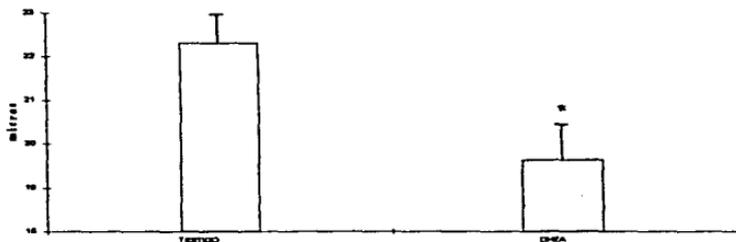


Figura 9: Se muestran las medias \pm e.e. en micras del diámetro folicular de los pollos testigo y los tratados con dehidroepiandrosterona (DHEA).
*P < 0.025 vs. testigo (prueba "t" de student).

RESULTADOS BIOQUÍMICOS .-

En las figuras 10 y 11 se muestran las curvas estándar obtenidas en el RIA para cuantificar las concentraciones de T_3 y T_4 en el suero sanguíneo de los pollos festigo y tratados con DHEA, en éstas se interpolaron los valores obtenidos en el RIA .

La curva estándar para T_3 mostró detección de hormona a partir del primer estándar ($6.25 \mu\text{g/dl}$) y el rango de mayor sensibilidad fué desde los 12.5 a los 200 $\mu\text{g/dl}$, con una precisión del 85%.

La curva estándar para T_4 mostró detección de hormona también a partir del primer estándar ($0.05\mu\text{g/dl}$) , y el rango de mayor sensibilidad fué desde 0.1 a los 0.4 ng/dl , con una precisión del 90 %.

La reproducibilidad se da con la variación inter e intra ensayo y en ambos casos se midieron muestras entre un ensayo y otro ($n=7$) y dentro de un mismo ensayo, resultando un coeficiente de variación menor al 10%, obteniéndose una reproducibilidad entre un 90% y 95%.

Los resultados de la cuantificación de la Triyodotironina (T_3), se muestran en el cuadro 3 con sus datos estadísticos y su representación gráfica se muestra en la figura 12 donde se observa una disminución del 25% en la cantidad de T_3 cuantificada en el suero de los pollos tratados con DHEA.

La cuantificación de la Tiroxina (T_4), se muestran en el cuadro 4 con sus datos estadísticos y su representación gráfica se muestra en el figura 6, donde al igual que la anterior muestra una reducción del 13% en la cantidad de T_4 en los pollos tratados .

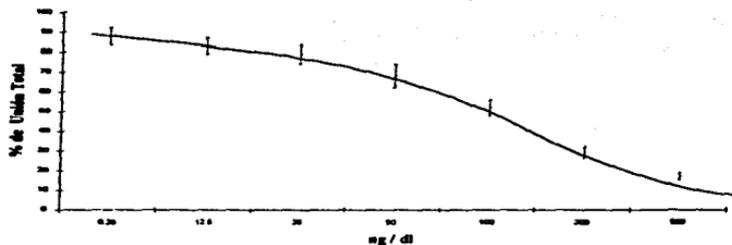


Figura 10: Curva estándar de las medias \pm e.e. obtenidas en el RIA de Triyodotironina (T_3) donde se interpolaron los resultados de las muestras problema de los pollos testigo y los tratados con dehidropiandrosterona (DHEA).

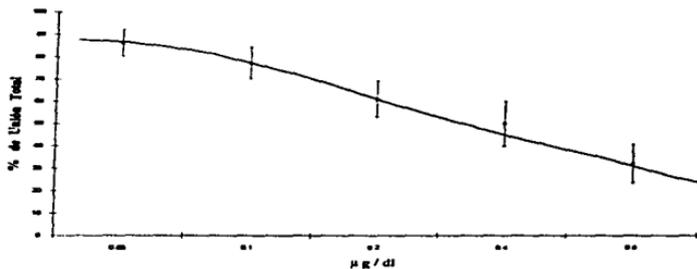


Figura 11: Curva estándar de las medias \pm e.e. de los resultados obtenidos en el RIA de Tiroxina (T_4), donde se interpolaron los resultados obtenidos en las muestras problema de los pollos testigo y tratados con dehidropiandrosterona (DHEA).

CUADRO 3:Resultados individuales obtenidos en el Radioinmunoanálisis de Triyodotironina (T₃) dadas en ng/dl tanto de pollos testigos y tratados con dehidroepiandrosterona (DHEA)

n	testigo	DHEA	n	testigo	DHEA	n	testigo	DHEA
1	116.2	102.0	31	13.6	69.8	61	14.4	1.23
2	50.6	61.0	32	7.04	3.2	62	0.26	47.8
3	170.6	44.6	33	42.8	40.8	63	22.8	4.16
4	153.8	29.8	34	201.6	53.2	64	3.6	40.4
5	37.2	6.2	35	104.0	113.2	65	35.2	24.5
6	18.2	26.4	36	95.4	151.2	66	137.4	9.62
7	4.0	14.6	37	133.4	49.6	67	28.6	23.4
8	142.4	27.4	38	70.2	83.6	68	50.0	69.6
9	111.0	67.0	39	159.2	97.0	69	143.6	4.4
10	171.8	47.4	40	223.0	42.6	70	123.0	46.8
11	112.4	164.0	41	25.8	15.2	71	65.4	42.4
12	230.0	99.2	42	3.24	36.4	72	70.8	51.8
13	45.0	51.6	43	144.8	155.6	73	101.0	54.4
14	47.6	27.4	44	76.4	90.8	74	149.6	189.6
15	34.4	31.6	45	139.0	95.8	75	172.4	84.8
16	122.0	175.2	46	38.0	90.2	76	194.0	52.0
17	89.4	212.0	47	11.4	41.0	77	118.0	41.6
18	0.34	1.22	48	175.6	101.2	78	261.0	65.0
19	5.2	10.2	49	108.0	78.6	79	190.8	9.6
20	26.0	107.2	50	125.6	82.2	80	54.8	9.8
21	17.8	161.8	51	77.0	7.4	81	34.6	3.4
22	78.8	43.2	52	38.0	95.6	82	7.4	2.6
23	0.56	8.4	53	10.0	163.2	83	11.8	5.0
24	5.0	2.12	54	5.2	5.6			
25	13.0	12.8	55	80.6	7.8			
26	74.4	0.68	56	20.2	61.4			
27	4.4	10.2	57	164.8	218.6			
28	38.0	32.4	58	34.8	175.8			
29	7.28	7.8	59	150.4	52.0			
30	31.0	8.56	60	35.0	8.0			

P < 0.05 vs. testigo (prueba "ANOVA")

\bar{x} (testigo) = 76.7098

d e (testigo) = 65.5324

\bar{x} r e e = 76.70719

\bar{x} (dhea) = 57.8359

d e (dhea) = 54.6134

\bar{x} r e e = 57.83599

CUADRO 4: Resultados individuales obtenidos en el Radioinmunoanálisis de Tiroxina (T₄) dadas en µg/dl, tanto de los pollos testigo y tratados con dehidroepiandrosterona (DHEA)

n	testigo	DHEA	n	testigo	DHEA	n	testigo	DHEA
1	0.56	0.080	31	0.27	0.42	61	0.54	0.18
2	0.25	0.24	32	0.25	0.30	62	0.58	0.23
3	0.30	0.08	33	0.82	0.46	63	0.48	0.44
4	0.26	0.40	34	0.68	0.56	64	0.38	0.25
5	0.54	0.40	35	0.46	0.22	65	0.35	0.38
6	0.54	0.32	36	0.34	0.24	66	0.60	0.42
7	0.88	0.24	37	0.10	0.56	67	0.48	0.34
8	0.36	0.56	38	0.58	0.80	68	0.48	0.58
9	0.44	0.40	39	0.52	0.36	69	0.46	0.42
10	0.32	0.26	40	0.40	0.25	70	0.36	0.42
11	0.32	0.24	41	0.48	0.32	71	0.36	0.36
12	0.32	0.24	42	0.26	0.28	72	0.52	0.08
13	0.28	0.22	43	0.64	0.44	73	0.52	0.24
14	0.40	0.30	44	0.40	0.60	74	0.84	0.16
15	0.34	0.22	45	0.30	0.46	75	0.56	0.68
16	0.08	0.24	46	0.22	0.30	76	0.56	0.16
17	0.24	0.96	47	0.62	0.20	77	0.52	0.40
18	0.26	0.06	48	0.42	0.28	78	0.26	0.40
19	0.64	0.06	49	0.32	0.44	79	0.32	0.22
20	0.96	1.20	50	0.24	0.36	80	0.40	0.36
21	0.36	1.00	51	0.38	0.27	81	0.22	0.22
22	0.48	0.54	52	0.68	0.40	82	0.34	0.24
23	1.10	0.66	53	0.32	1.12	83	0.28	0.24
24	0.64	0.24	54	0.12	0.10			
25	0.80	0.58	55	0.10	0.12			
26	0.72	0.30	56	0.60	0.14			
27	0.56	0.42	57	0.40	0.22			
28	0.76	0.53	58	0.10	0.12			
29	0.42	0.38	59	0.42	0.40			
30	0.14	0.20	60	0.62	0.56			

no significativa

$$\begin{aligned}\bar{x}(\text{testigo}) &= 0.451 \\ d e(\text{testigo}) &= 0.200 \\ \bar{x} \pm e &= 0.451 \pm 0.201\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\bar{x}(\text{DHEA}) &= 0.393 \\ d e(\text{DHEA}) &= 0.231 \\ \bar{x} \pm e &= 0.393 \pm 0.205\end{aligned}$$

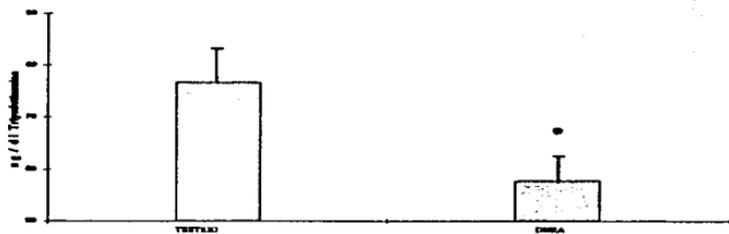


Figura 12: Se muestran las medias \pm e.e. de la concentración de Triiodotironina (T3) en ng/dl para los pollos testigo y tratados con dehidroepiandrosterona (DHEA).
* $P < 0.05$ vs.testigo

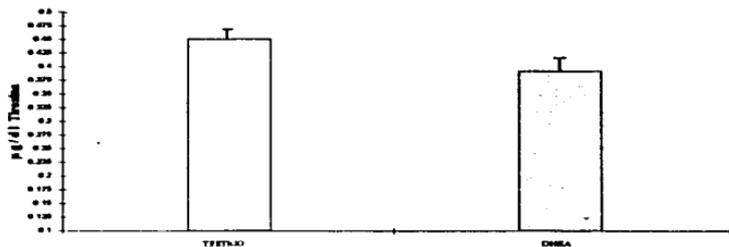


Figura 13: Se muestran las medias \pm e.e. de Tiroxina (T4) en μ g/dl para los pollos testigo y los tratados con dehidroepiandrosterona (DHEA). La diferencia no es significativa.

DISCUSION

Los resultados observados en la histología de los cortes de la tiroidea muestran que la tiroidea de los pollos testigo tiene actividad, ya que las gotas de coloide son visibles y en buen número, lo que nos dice que hay producción de coloide y almacenamiento del mismo en la cavidad folicular.

En los cortes de los pollos tratados con DHEA, también se nota la actividad tiroidea por la presencia de gotas de coloide, pero las mismas, se encuentran en menor cantidad, sugiriendo una disminución en la producción de coloide.

El epitelio folicular también muestra cambios, ya que en los cortes de los pollos tratados, las células foliculares son más densas, con menos citoplasma comparados con los testigos, lo que refuerza la idea de una menor actividad en la tiroidea de los pollos tratados con DHEA.

Los resultados de la morfometría nos dicen que la disminución en el área folicular de los pollos tratados es estadísticamente significativa; sin embargo, las mediciones de ambos grupos caen dentro de los rangos normales reportados para pollo sin tratamiento de 24 hrs.; Venzke (1949) reporta un diámetro de 21 μm ; Wentworth y Ringer (1986) de 12 a 15 μm y Astier (1980) de 40 a 50 μm en la primera semana.

Es de hacer notar la extrema variabilidad en las mediciones y que pueden depender de las distintas razas de aves y de las condiciones de procesamiento. Debemos resaltar que en este caso tanto los testigos como los tratados fueron procesados en forma idéntica y simultánea.

Como se sabe la diferenciación y la formación de los folículos tiroideos, así como la formación de coloide están estimulados por la TSH adenohipofisaria (Wentworth y Ringer, 1986; Junqueira, 1990; Dumont y cols., 1992). por tanto, esta disminución en los folículos y la producción de coloide puede atribuirse a una disminución en la secreción de TSH. Esto se propone porque la disminución de TSH provocada por la administración de hormonas esteroideas ya se había observado con anterioridad por diferentes autores en otras especies, incluso en el hombre (Brown-Grant, 1953-1954; Howard y col., 1971; Inaudi y col., 1991).

En cuanto a los resultados bioquímicos con la cuantificación de las hormonas tiroideas (T₃ y T₄) presenta una gran variabilidad, sin embargo no se pueden atribuir a la técnica o al manejo de las muestras, ya que el control de calidad de la técnica nos dice que fueron altamente confiables. Esta variabilidad se puede atribuir a la variación intrínseca del material biológico, como las diferencias genéticas, al diferente horario del nacimiento, a las reacciones individuales de cada pollo a la temperatura ambiente.

Los valores en la concentración de hormonas tiroideas encontradas en esta tesis, tanto de testigos como tratados, se encuentran por debajo de lo reportado por los diferentes autores (ver el siguiente cuadro), sólo en el caso de McNabb (1987) los valores se asemejan mucho.

Autor	T ₃	T ₄
Newcomer (1976)	270 ng / dl	1.6 µg/dl
Davison* (1976)	-	0.2-0.1 µg/dl
Thommes* (1978)	499 ng/dl	1.0 µg/dl
Cristensen* (1980)	482 ng/dl	5.7 µg/dl
McNabb (1987)	80 ng/dl	0.4 µg/dl
Darras y col. (1992)	148 ng/dl	1.5 µg/dl

* citados por Wentworth y Ringer, 1986

Las hormonas tiroideas tienen un incremento exponencial antes y durante la eclosión y la concentración de las ambas hormonas baja drásticamente después del nacimiento, por lo cual se explicaría el que ambas hormonas sufren variaciones tan notables en aves normales (McNabb, 1987; Wentworth y Ringer, 1986; Scanes y col., 1987; y Darras y col., 1992).

Las diferencias encontradas en esta tesis en la concentración de las hormonas tiroideas circulantes muestran una reducción de T_3 del 30% en el suero de aves tratadas con DHEA ; no existiendo diferencias para T_4 .

Aunque los niveles de T_3 se vieron disminuídos en los tratados, no se puede hablar de un hipotiroidismo, ya que los resultados obtenidos caen dentro de los rangos normales del pollo recién nacido.

Se puede considerar que los cambios observados se deben a una disminución de TSH, afectando el estímulo de ésta sobre la tiroides, lo que se asociaría a una baja captación de yodo, una reducida síntesis de hormonas tiroideas y una menor conversión de T_4 a T_3 . Coincidiendo esto con datos de la literatura que demuestran una disminución en la secreción de TSH como consecuencia de un tratamiento con andrógenos (Brow-Grant y cols., 1954 ; Howard y cols., 1958; Re y cols., 1976).

En éste caso DHEA estaría actuando como un andrógeno que inhibiría la secreción de TSH. Sería interesante comparar en nuestro modelo el efecto producido por otros andrógenos más potentes como testosterona ó dehidrotestosterona, lo que nos permitiría confirmar la hipótesis del efecto andrógeno de DHEA.

Los receptores a hormonas tiroideas y los receptores a hormonas esteroides pertenecen a una misma familia (para una revisión vease Evans, 1988). Una posibilidad a considerar es que la DHEA como hormona esteroide interactua con los receptores a hormonas tiroideas de tal manera que se podrian producir cambios en la función tiroidea por un fenómeno a nivel de receptores hipotalámicos ó hipofisarios.

Lo que podemos concluir es que el tratamiento crónico con DHEA durante el desarrollo del embrión de pollo si modifica la función de la tiroides, resultando en una hipofunción de la misma, corroborada por el aspecto morfológico y la concentración sérica de T₃. El significado biológico de estos cambios y el mecanismo de regulación involucrado requerirá de otros estudios.

CONCLUSIONES

La administración de DHEA, influye en el desarrollo y la función de la tiroides durante la etapa prenatal del pollo.

Se encontraron cambios en la histología de la tiroides, como una disminución del área y del diámetro folicular en respuesta a la administración de DHEA.

La administración de DHEA durante la incubación influye en la cantidad de hormonas tiroideas circulantes en el pollo, principalmente en la Triyodotironina (T₃).

Los cambios encontrados en la histología y las hormonas circulantes, se atribuyen a una probable disminución en la secreción de TSH por la hipófisis.

BIBLIOGRAFIA

- Adams A., 1978, Adrenal DHEA an human mamary cancer, *Can. Res.* 38 :4036-4040.
- Albert A. Tenney A. y Ford E., 1952, The effect of cortisone and corticotropin on the biologic decay of thyroidal radioiodine" *Endocrinol.* 50: 324-330.
- Astier H., 1980, "Thyroid gland in birds. Structure and function" En *Avian Endocrinology*. A. Eppele M.A. Stelson Editorial Academic Press, N. Y., p.p. 167-187.
- Barrington E.J.W., 1975, Introduccón a la Endocrinología General y Comparada , Ediciones H. Blume, España p.p.177-232.
- Brown-Grant K., Von Euler C., Harris G.W. y Reichlin S., 1953, The adrenal gland and thyroid activity, *J. Endocrinol* 9: xliii-xliv.
- Brown-Grant K., Harris G.H., Reichlin S., 1954, The influence of the adrenal cortex on thyroid activity in the rabbit, *J. Physiol.* 126: 41-51.
- Coleman D. Ly Leiter E.H., 1982, Therapeutic effects of DHEA in diabetic mice, *Diabetes* 31: 830-833.
- Christianson D., Roti E., Vagenakis A. y Braverman L., 1981, The sex-related difference in serum thyrotropin concentration is androgen mediated, *Endocrinology* 108: 529-535.
- Darras V.M., Visser, T.J., Berghmans L.R. y Kühn, 1992, Ontogeny of type I and Type III deiodinase activities in embryonic and posthatch chicks: relationship with changes in plasma triiodothyronine and growth hormone levels, *Comp. Biochem. Physiol.* 103:131-136.
- Dawson S. B., Trapp R.G. , 1993, *Bioestadística Médica*, Ed. El Manual Moderno, México, p.p. 118-150.
- Dumont J.E., Lamy P.F. and Maenhaut C., 1992, Physiological and pathological regulation of thyroid cell proliferation and differentiation by tyrotropin and other factors , *Physiol. Rev.* 72 : 667-697.
- Eisenstein A.B., 1970, *La Corteza Suprarrenal*, Editorial Torray S.A., Barcelona, España p.p. 63-96.

- Estrada F.E., Peralta Z.L., Rivas M.P., 1982, Manual de Técnicas Histológicas, A.G.T. Editor S.A. México p.p. 137.
- Evans Ronald M., 1988, The steroid and Thyroid hormone receptor superfamily, Science 240: 889-895.
- Federman D.D., Robbins J. y Rall J.E., 1958, Effects of methyl testosterone on thyroid function, thyroxine metabolism, and thyroxine binding, J. Clin. Invest. 37:1024-1030.
- Flores L.F. y Cabeza de Flores A., 1992, Endocrinología, 3a. edición, Méndez Editores S.A. México p.p. 195-326.
- Granner D., Murray R.K., Mayes A.P. Rodwell V.W., 1986, Bioquímica de Harper, 10a. ed., Editorial El Manual Moderno, México p.p. 301-326
- Ganong W.F., 1994, Fisiología Médica, 14a. edición, El Manual Moderno, México p.p. 340-394
- Harvey S., Scanes C.G. y Brown K.I., 1986, Adrenals, en Avian Physiology, P.D. Sturkie, 4a. Edición p.p. 479-493.
- Horrobin D.F., 1976, Fisiología y Bioquímica médicas, Salvat Editores. p.p. 253-265.
- Howard A., Gross H.A., Appleman M.D. y Nicoloff J.T., 1971, Effect of biologically active steroids on thyroid function in man, J. Clin. Endocrinol. 33: 242-248.
- Humason G.L., 1967, Animal Tissue Techniques, W.H. Freeman and Company p.p. 136-147.
- Inaudi P., Massafra C., Bernabei A., Antoni G., 1991, Gonadotropin, prolactin and thyrotropin pituitary secretion after exogenous dehydroepiandrosterone-sulfate administration in normal women, Horm.Res. 35:35-40.
- Johnson R., 1990, Estadística Elemental, Grupo Editorial Iberoamericana, México p.p. 348-450.
- Junqueira L.C., 1990, Histología Básica, 3a. edición, Salvat Editores p.p. 431-442
- Li K., Foo T y Adams J.B., 1977, Products of DHEA metabolism by human mammary tumors and their influence of estradiol receptor binding, Steroids 31:113-127.

- Mc Ewen E.G. Kurzman I.D. Haffa A.L.M., 1989**, Antiobesity and hypocholesterolemic activity of dehidroepiandrosterone in the dog . In Lardy H, Strayman F, eds. Hormones, thermogenesis and obesity. New York: Elsevier 399-404.
- McNabb A.F.M., 1987**, Comparative Thyroid development in Precocial Japanese and Atrial ring doves, J. Exp. Zool. Supplement, 1: 281- 290.
- Mitchell M. A. y Steles M.S., 1984**, Some new observations on the binding of thyroxine and triiodothyronine to plasma proteins and lipoproteins in the domestic fowl, Gen. Comp. Endocrinol. 57: 309-319
- Murray R., Spiegel P. D., 1982**, Estadística , Serie de compendios Schaum, Ed.. Mc Graw Hill.
- Nestler J.E., Barlaschini C.O., Blackard W.G., 1988**, Dehidroepiandrosterone reduces serum low density lipoprotein levels and body fat but does no affect insulin sensitivity in normal men, J.Clin.Endoc.Metab. 66: 57-61.
- Nestler J.E., 1995**, DHEA,Regultion and insulin, Ann. N.Y. Acad. Sc. 774:73-80
- Newcomer W.S. ,1976**, Thyroxine and triiodothyronine in Blood after ingestion of iodinate casein by chicks" . Poultry Sc. 55: 60-90.
- Norris D.O., 1985**, Vertebrate Endocrinology, Lea y Febiger, 2a.edición, Philadelphia, USA p.p. 217-243.
- Perry W.F., 1951**, The action of cortisone and ACTH on thyroid function, Endocrinology 49 :284-289.
- Re R.N. , Kourides I.A., Ridgway E.C., 1976**, The effect of glucocorticoid administration on human pituitary secretion on thyrotropin and prolactin, J.Clin.Endoc.Metab. 43: 338-346.
- Robbins J. y Rall J.E., 1960**, Proteins asociated with the thyroid hormones, Physiol. Rev. 40: 415-489.
- Romanoff A.L. ,1960**, The avian embryo, structural and fuctional development, The McMillan Company N.Y. p.p. 866-868.
- Rubio Ledesma M.E., 1992**, Absorción de la Dehidroepiandrosterona a través del cascarrón de huevo de gallina durante la incubación, Tesis para obtener el titulo de Médico Veterinario Zootecnista, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, U.N.A.M., México D.F. p.p. 50

-Ruiz Juvera Ma.de los Angeles, 1987, Manual de curso Teórico -práctico de radiolnmuoanálisis de hormonas tiroideas, Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubirán" México p.p. 62

-Scanes C.G., Hart L.E., Decuypere y Kuhn E.R., 1987, Endocrinology of the avian embryo, J. Exp. Zool. 1: 252-264

-Schwartz A.G. y Whitcomb J.M., 1988, Dehydroepiandrosterone and structural analogs : a new call of cancer chemopreventive agents, Adv. Can.Resch. 51: 3901-424.

-Tal E.y Sulman F.G., 1973, Dehydroepiandrosterone induced thyrotrophin release in immature rats, J. Endocrinol. 57: 183-184

-Tal E. y Sulman F.G., 1975, Dehydroepiandrosterone induced thyrotrophin release during heat stress in rats, J. Endocrinol. 67: 99-103.

-Tata J.R. y Shellabarger C.J., 1959, An explanation for the difference between the responses of mammals and birds to thyroxine and tri-iodothyronine, Biochemistry, 72: 608-617.

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

-Tepperman H. y De la Garza S., 1968, Effects of dehydroepiandrosterone end diet protein on liver enzymes and lipogenesis, Am. J. Phys. 214:1126-1132.

-Thommes R.C., Fitzsimons E.J., Davis M. y Woods J.E. ,1992, Immunocytochemical Demonstration of T4 content and TSH-binding by cells of the Thyroid of the developing Chick Embryo, Gen. Comp. End. 85: 79-85

-Uriz Garces M.P., 1989, Perfil Temporal de Hormonas Tiroideas (T3 y T4) durante el crecimiento y engorda en pollos de la línea Arbor Acres, Tesis para obtener el título de Biólogo, E.N.E.P. Iztacala U.N.A.M. México D.F. p.p. 76

-Venzke W. G. 1949, Morphogenesis of the thyroid gland of chicken embryos Am. J. Vet. Res. 10:272-218.

-Welle S., Jozafowicz R. y Statt M., 1990, Failure of dehydroepiandrosterone to influence energy and protein metabolism in humans', J.Clin. Endoc. Metab. 71:1259-1264.

-**Wentworth B.C. y Ringer R.K. , 1986** , Thyroids, en *Avian Physiology* , Ediciones P.D.Sturkle, 4a. Edición p.p . 452-465.

-**Williams R.H.,1985**, Tratado de Endocrinología, 6a. Edición, Ed. Interamericana p.p. 260-279.

-**Yalow R.S. y Berson S.A. ,1959**, Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods, *Nature* 184: 1948-1949.

ANEXO 1

Preparación de soluciones

1.- Buffer TRIS-HCl , pH 8.6 , 0.05 M:

a) 24.2 g de Tris aforado a 1L de agua desionizada.

b) 4.15 ml H Cl aforado a 250 ml

Se toman 6 ml de la solución a) y se afora a 1L

Se mezclan las soluciones a y b y se agrega 2 L de agua desionizada.

NOTA.-Al momento de hacer el ensayo todo se diluye con amortiguador de Tris-HCl.

2.- Suero Hipotiroideo de pollo:

A un grupo de sueros de pollo se le agregó carbón activado en proporción de 500 mg en 10 ml de suero, para adsorber todas las hormonas y proteínas menores a 5 000 daltones. Se agitó continuamente por 24 h, a 4°C, después se centrifugó a 19 000 rpm por 1 h, para precipitar el carbón. Se recuperó el suero con pipeta Pasteur y se le agregó azida de sodio al 0.2 % para evitar putrefacción. Este suero se fraccionó en alícuotas y se almacenó a -20°C.

3.- Anti T4 :

El Ab para T4 fué de Sigma No.2652, lote 78 F - 4851.

Su presentación fué de 1 ml en Buffer, 0.01 M de fosfatos, pH 7.4, 0.15 M NaCl.

A este ml se le agregaron 9 ml de agua desionizada para tener una dilución 1 : 10, y se etiquetó como : Ab- T4 sigma stock 1:10, se distribuyó en alícuotas en tubos de ensayo con 1 ml cada uno.

La dilución final de trabajo del anticuerpo fué de 1: 700.

4.-Anti T3:

Se ocupó el anticuerpo para T3 obtenido en nuestro laboratorio en una dilución final de 1 : 3000.

5.-Estándares u Hormona Fria :

Fueron hormonas de Sigma y se disolvieron en agua desionizada y se les agregó Na OH 0.01N y se almacenaron protegidas de la luz.

Tiroxina T4 : sol. stock 45.8 mg / 10 ml

Triyodotironina T3 : sol. stock 5 µg / 10 ml

De éstas se hicieron las diluciones correspondientes para obtener las concentraciones para la curva estándar las cuales se ilustran en el siguiente cuadro:

T ₄		T ₃	
0.4	µg / dl	500	ng / dl
0.2	µg / dl	200	ng / dl
0.1	µg / dl	100	ng / dl
0.05	µg / dl	50	ng / dl
0.025	µg / dl	25	ng / dl
0.0125	µg / dl	12.5	ng / dl
		6.25	ng / dl

6.-Hormonas marcadas T³ y T⁴ (I 125) :

En ambos casos se utilizó una concentración de 0.010 ng / 100 µl diluidas en buffer.

El cálculo se hizo de acuerdo a su actividad específica y a la actividad total de cada hormona.

NOTA: Las hormonas marcadas se prepararon en el momento de usarse.

Por cada 10 ml de solución de T⁴ se agregó 5 mg de ANS (ácido- 8 - anilino - 1 - naftanensulfónico , Sigma) éste se utilizó para separar a las hormonas tiroideas de sus proteínas transportadoras. Por cada 10 ml de solución de T³ se agregó 15 mg de ANS.

ANEXO 2

RADIOINMUNOANÁLISIS (RIA)

El Radioinmunoanálisis (RIA) es una técnica de análisis que está regida por la ley de acción de masas y está basada en la reacción básica de la inmunología:



Desde 1959, Yalow y Berson desarrollaron una técnica al inyectar 125 I-insulina a pacientes diabéticos, los cuales tenían una proteína a la que se unía esta insulina marcada. Así después de varios análisis encontraron que esta proteína era una inmunoglobulina (IgG) específica para la insulina (Yalow y Berson, 1959).

La técnica del RIA es muy específica y sensible ya que utiliza anticuerpos y material isotópico radioactivo. Se puede utilizar para la cuantificación de hormonas, vitaminas, drogas y fármacos que no hayan podido ser medidos con exactitud, ya que sus concentraciones en fluidos biológicos son del orden de nanogramos 1×10^{-9} g o picogramos 1×10^{-12} g (Ruiz, 1987).

FUNDAMENTO.-

En el RIA se lleva a cabo una reacción de competencia por los sitios activos de un anticuerpo (Ac) :



Al agregar concentraciones crecientes de antígeno no marcado en concentraciones conocidas o estándar, hay una mayor posibilidad de que se formen complejos Ag- Ac no marcado. Para que se lleve a cabo la reacción se deben cubrir los siguientes requisitos:

a) El Ac debe estar en una concentración fija y limitada.

b) El antígeno marcado Ag^* tendrá una concentración fija, por ser nuestro parámetro de medición.

c) El antígeno no marcado o estándar (Ag) tendrá una concentración mayor al Ag^* para que lo pueda desplazar; además debe ser fisicoquímicamente igual al Ag) que se quiere medir. Por este motivo, y de acuerdo a la ley de acción de masas, la dilución final del Ac debe ser tal que permita unir entre un 30% y un 50% de Ag^* en ausencia del Ag, así la adición de pequeñas concentraciones del Ag no marcado en la curva estándar, desplazará el equilibrio de la reacción hacia la formación de un mayor número de complejos Ag - Ac.

d) La reacción de equilibrio se alcanza por medio de una incubación, que aunque se puede realizar a temperatura ambiente, es mejor hacerla a 4° C. durante 24 hrs. Después de esto, se deberá tener un método de separación para contar la fracción libre o unida de nuestra reacción.

De este modo se puede cuantificar la radioactividad de la fracción unida al Ac, la forma libre o ambas; con estas mediciones se puede elaborar una curva de dosis-respuesta con los resultados obtenidos a partir de los estándares (Ruiz, 1987).

En la gráfica de dosis-respuesta resultante se puede interpolar las proporciones de U/T (proporción resultante de la radioactividad unida entre la radioactividad total) observados en los problemas y calcular así la concentración del antígeno Ag o sustancia a determinar presente en ellas.

Términos Utilizados.-

Para evitar confusiones, se definen los siguientes términos que son usados en la siguiente sección:

Unión no específica.- Se refiere a la cantidad de trazador radioactivo que en ausencia del anticuerpo específico " Interacciona " inespecíficamente con alguno de los componentes del sistema, y que al separar las fracciones libre y unida permanece en la primera. Para su determinación se preparan tubos que contengan sólo el suero hipotiroideo homólogo y la marca radioactiva.

Cero.- Corresponde al 50% de la reacción antígeno-anticuerpo. Se determina cuantificando la proporción del antígeno o ligando marcado que se une al anticuerpo específico en ausencia del ligando endógeno o de estándares.

Curva estándar.- Es el intervalo de concentraciones conocidas de antígeno o ligando no marcado, con las cuales se establece la competencia por los sitios de unión (anticuerpo), o el desplazamiento del ligando radioactivo.

Problemas.- Conjunto de muestras con concentraciones desconocidas que se desean medir. Los tubos problemas se elaboran con anticuerpo, marca radioactiva y el suero o muestra problema.

ESTANDARIZACIÓN Y CONTROL DE CALIDAD DEL RIA .-

La estandarización y control de calidad del RIA es muy importante para la cuantificación de cualquier sustancia en fluidos biológicos que no pueden obtenerse en forma pura. Aun cuando se tienen estándares puros, la validez de la especificidad y exactitud del ensayo en varias muestras, puede ser difícil.

Existen cinco criterios principales que se utilizan para valorar la seguridad de los procedimientos del RIA y éstos son : precisión, sensibilidad, especificidad, exactitud y reproductibilidad del ensayo.

La Precisión.- se define como la capacidad del sistema de ensayo para distinguir entre dos concentraciones de antígeno en cualquier posición de la curva de inhibición. La precisión del ensayo se valora cuantitativamente por medio del coeficiente de variación, $CV = s/\bar{x}$ donde s es la desviación estándar y \bar{x} es el promedio de las mediciones.

La Sensibilidad.- se define como 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 *Ag es insignificante en el ensayo o dilución del Ag se aproxima a cero.

Una de las ventajas del RIA sobre otros procedimientos cuantitativos, es la alta sensibilidad que resulta de la naturaleza de la interacción Ag-Ac, la cual permite medir concentraciones de antígeno tan pequeñas como micro, nano y picogramos.

La Especificidad.- se define como el grado de interferencia dado por otras sustancias diferentes a la que se quiere medir. La especificidad del Ac para el Ag está influenciado por: la heterogeneidad del Ac utilizado, la reactividad cruzada con los antígenos similares o con moléculas que pueden ocupar los sitios inmunoreactivos, y la interferencia de la reacción debida al bajo peso molecular del material que altera el medio o a las condiciones de la reacción.

La heterogeneidad se refiere a que el antígeno inducirá la formación diferentes tipos de anticuerpos. Esto también se refiere al número y localización de sitios de unión en un anticuerpo particular. Un antígeno se combina con los anticuerpos múltiples de acuerdo con su respectiva constante de equilibrio.

La reactividad cruzada es cuando hormonas u otros ligandos comparten algunos antígenos. Por eso, se recomienda purificar las muestras de plasma, suero y orina o bien adsorber los anticuerpos que cruzan para evitar la reactividad cruzada.

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

La Exactitud.- se refiere al grado en el cual la medición de una sustancia coincide con el valor de la medición estándar. Para evaluar éste parámetro se comparan los resultados obtenidos en un número suficiente de ensayos semejantes.

La Reproductividad.- Es la variación intraensayo e interensayo. El valor óptimo de éste parámetro, se logra minimizando las variables usadas en los ensayos, también se debe minimizar las diferencias de las variaciones técnicas de cada persona que pueda realizar un RIA (Ruiz, 1987).

Para lograr un control de calidad aceptable se debe tomar en cuenta:

- a) El porcentaje de unión inespecífica, es decir el porcentaje total de Ag unido en ausencia de Ag y de un antisuero específico.
- b) La pendiente de la curva estándar a una concentración cero del Ag y el 50% del punto de inhibición.
- c) La dosis de estándar en el 50% del punto de inhibición.
- d) La variación intraensayo, que es la variación observada en determinaciones múltiples de muestras "corridas" en el mismo ensayo.
- e) La variación interensayo, que es la variación de determinaciones múltiples de la misma muestra en diferentes ensayos.

(Ruiz, 1987)