

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**INDUCCION EXPERIMENTAL DE ANTICUERPOS
ANTITIROIDEOS EN CONEJAS Y SU RELACION
CON ANORMALIDADES CROMOSOMICAS EN LA
DESCENDENCIA**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G O
P R E S E N T A
MARIA LUISA TERESA VILLARREAL ORTEGA

MEXICO, D. F.

1971



FACULTAD DE CIENCIAS
Biblioteca



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.

Un testimonio especial de agradecimiento al
Dr. Rubén Lisker por su apoyo y dirección en
la realización de este trabajo.

Un testimonio especial de agradecimiento al
Dr. Rubén Lisker por su apoyo y dirección en
la realización de este trabajo.

Quiero expresar mi reconocimiento al Dr. Enrique Tovar por su orientación en la metodología empleada. Al Dr. Raymundo González por su cooperación en el trabajo experimental y al Dr. Fernando García Rojas por su ayuda en la interpretación de los estudios histopatológicos.

INDICE

	Pag.
Capítulo I	
INTRODUCCION.....	1
Capítulo II	
MATERIAL Y METODOS.....	5
Capítulo III	
RESULTADOS.....	18
Capítulo IV	
DISCUSION.....	24
Capítulo V	
RESUMEN.....	28
BIBLIOGRAFIA.....	30

Capitulo I
INTRODUCCION

En la especie humana la enfermedad cromosómica más frecuente en recién nacidos vivos, es el síndrome de Down o mongolismo⁽¹⁾, que se presenta cuando un individuo es trisómico para uno de los pequeños cromosomas acrocéntricos, que por convención se acepta se trata del par 21⁽²⁾. Dicha trisomía puede ser de dos tipos: a) forma habitual, en la que el sujeto tiene 47 cromosomas y el extra es un 21; y b) trisomía por translocación en donde el individuo afectado tiene 46 cromosomas, pero uno de ellos, habitualmente uno de los grandes acrocéntricos, lleva material de un cromosoma 21 además del propio. La primera situación es la más frecuente y el mecanismo que la produce es la falta de disyunción meiótica en uno de los progenitores, de tal suerte que uno de los gametos resulta desbalanceado con un cromosoma 21 adicional.

Se desconoce la etiología del síndrome de Down. El único factor bien conocido es el de la edad materna; a mayor edad de la madre, mayor frecuencia de hijos con síndrome de Down^(3,4). Existe además evidencia epidemiológica de que las radiaciones ionizantes y algunos virus puedan estar involucrados en su etiología⁽⁵⁻⁷⁾ y, recientemente se ha propuesto que los anticuerpos antitiroideos intervienen en alguna forma en este padecimiento. Debido a que en el presente estudio se explora esta última posibilidad, revisaremos a fondo todos los datos al respecto.

La relación entre enfermedad tiroidea y/o anticuerpos antitiroideos y el síndrome de Down, se conoce desde hace tiempo. En 1946, Benda informó el primer caso de tiroiditis de Hashimoto en un paciente con síndrome de Down⁽⁸⁾. Este tipo de tiroiditis se asocia a la presencia de anticuerpos antitiroideos y, ---

Mellon, Pay y Green en 1963⁽⁹⁾, encontraron una frecuencia superior de los mismos en individuos con trisomía 21 en comparación con la población general. Este hecho ha sido confirmado en varias ocasiones y por diversos autores: Saxena y --- Pyles⁽¹⁰⁾, Richards et al⁽¹¹⁾, Burgio et al^(12,13), Fialkow⁽¹⁴⁾, Fialkow y Uchida⁽¹⁵⁾ Fialkow et al⁽¹⁶⁾, Engel⁽¹⁷⁾, Engelberth et al⁽¹⁸⁾ y Vanhaelst et al⁽¹⁹⁾. Además varios investigadores han encontrado una frecuencia elevada de bocio y disfunción tiroidea en madres de pacientes con síndrome de Down (Dollinger⁽²⁰⁾, Meyers⁽²¹⁾, Benda⁽²²⁾, Ek⁽²³⁾, Coppen y Cowie⁽²⁴⁾ y Wren et al⁽²⁵⁾) así como en hermanos y parientes maternos en primer grado⁽¹⁶⁾.

Una evidencia más sugestiva de que los anticuerpos antitiroideos tuvieran relación con la etiología del síndrome de Down, fue proporcionada por Fialkow et al en 1965⁽²⁶⁾, quienes demostraron una prevalencia mayor de anticuerpos antitiroideos en madres de niños afectados con trisomía 21 en comparación con un grupo testigo adecuado, siendo las diferencias particularmente impresionantes en madres jóvenes⁽²⁷⁾. Este hallazgo ha sido confirmado en muchas poblaciones (Burgio --- et al^(12,13), Fialkow⁽²⁸⁾, Fialkow y Uchida⁽¹⁵⁾, Fialkow et al⁽¹⁶⁾, Dallaire y Flynn⁽²⁹⁾, Engelberth et al⁽¹⁸⁾, Vanhaelst et al⁽¹⁹⁾ y Kaplan y Zsako⁽³⁰⁾).

Todas las investigaciones anteriormente señaladas son retrospectivas, es decir se estudian a las madres de los enfermos con trisomía 21 después de haber nacido éstos, lo que hace que en rigor se desconozca el papel real de los autoanticuerpos tiroideos en la producción del síndrome de Down. En efecto, pudiera ser que los anticuerpos antitiroideos sean responsables de la falta de disyunción materna o bien, que por el contrario los anticuerpos resulten de la anomalía -

cromosómica, esto es, que el embarazo con el producto afectado, por mecanismos desconocidos, desencadene la aparición de anticuerpos antitiroideos. Otra posibilidad sería el considerar un factor viral que este involucrado tanto en la producción de los anticuerpos antitiroideos como en la aparición de las aberraciones cromosómicas⁽³¹⁾.

Para aclarar este problema, se ocurren cuando menos dos alternativas: hacer estudios prospectivos en el humano y realizar estudios experimentales en animales inferiores, induciendo la formación de anticuerpos antitiroideos y observando el efecto que ello tenga sobre su descendencia. Una investigación de este último tipo constituye el motivo de esta tesis.

Capítulo II
MATERIAL Y METODOS

Como animales de experimentación, se utilizaron conejos hembras - de 2.5 kg de peso, raza Nueva Zelandia. Los motivos para emplear dicho animal fueron:

- a) Alto grado de respuesta inmunológica
- b) Período de gestación corto (de 30 a 33 días)
- c) Ovulación múltiple e inducida después del coito
- d) Fecundidad elevada
- e) Facilidad para la obtención de muestras de sangre
- f) Facilidad de manejo
- g) Bajo costo y mantenimiento sencillo
- h) Su adaptación al cautiverio

El estudio se realizó con la siguiente secuencia:

Para seleccionar un buen antígeno, se ensayaron tres diferentes extractos tiroideos obtenidos de: a) bovino, b) conejo y c) humano. Mensualmente se medía el título de anticuerpos alcanzado, con la técnica de difusión en agar y la prueba de hemaglutinación de eritrocitos sensibilizados con tiroglobulina descrita por Boyden y modificada por Statvizky⁽³⁷⁾. En vista de que sólo las conejas inyectadas con tiroides de origen humano mostraron buena respuesta, se decidió utilizar este extracto. Se trataron 15 animales experimentales de los cuales sólo 10 alcanzaron títulos elevados. Una vez conseguida la inmunización, se procedió a aparear las conejas tratadas y algunas controles; lográndose embarazar seis de las primeras y las tres del segundo grupo. Tanto en las crías de las conejas experimentales como en las de las testigos, se practicó el análisis cromosómico en sangre periférica.

El detalle de la metodología empleada se describe a continuación en el siguiente orden:

- I. Inmunización
- II. Determinación de anticuerpos
- III. Apareamiento
- IV. Análisis cromosómico

I. Inmunización:

A) Preparación del antígeno^(32,33). El antígeno se prepara a partir de glándula tiroides obtenida de individuos recién fallecidos y conservada a -20°C hasta el momento de procesarla. Para la preparación del antígeno se toma la precaución de hacer todos los pasos a 4°C , con el fin de evitar la desnaturalización de la tiroglobulina. La preparación se hace de la siguiente manera:

1. Se corta la glándula tiroides en fragmentos pequeños
2. Se homogeneiza en solución salina isotónica
3. Se centrifuga a 2,500 r.p.m. y se separa el sobrenadante
4. Se dializa contra la solución salina isotónica, durante 24 hs.
5. Se liofiliza y se conserva a -20°C hasta su uso

Este extracto contiene tiroglobulina y posiblemente un antígeno del coloide diferente de la tiroglobulina y un constituyente de los microsomas.

B) Administración del antígeno⁽³⁴⁾.

1. En cada inyección se administran 100 mg del extracto tiroideo suspendido en 1 ml de solución salina y mezclado con 1 ml de adyuvante de Freund completo.

2. El antígeno se inyecta repartido en partes iguales tanto por vía subcutánea como en los cojinetes de las patas traseras.
3. Las tres primeras inyecciones se realizan con intervalos de 15 días y posteriormente cada 8 días durante dos a cinco meses.
4. Para medir el título de anticuerpos se realizan sangrados -- quincenales mediante una incisión en la vena marginal de la oreja, colectando por goteo alrededor de 5 ml de sangre en cada ocasión.

II. Determinación de anticuerpos:

Para este objetivo se emplearon dos técnicas: difusión en placas de agar y hemaglutinación de eritrocitos sensibilizados con tiroglobulina.

A) Difusión en agar⁽³⁴⁾.

1. Preparación de placas:

- a) Se hace una suspensión al 1% de agar Noble (Difco --- Special) en tampón de barbital pH 8.6. El agar se disuelve en caliente y se filtra por lana de vidrio, agregándose una solución de azida de sodio al 1% como bactericida.
- b) Se colocan 13 ml de esta solución (caliente) en cajas de Pétri de 9 cm de diámetro.
- c) Se dejan por 15 a 30 minutos a 4°C para acelerar la solidificación.

2. Medición de anticuerpos:

- a) El primer paso consiste en realizar 7 perforaciones de 1.7 cm de diámetro en la placa de agar, una en el centro y seis alrededor de ésta, y situadas a 2 cm de la perforación central.
- b) En el orificio central se coloca el antígeno y en los periféricos diluciones progresivas del suero.
- c) Se sellan las cajas y se ponen en un incubador húmedo a 37°C, observándose diariamente por espacio de una semana.
- d) Al difundir y ponerse en contacto el antígeno y el anticuerpo del suero, si éste está presente, se forman bandas de precipitación, leyéndose el título de anticuerpos como la concentración menor que forma banda.

B) Hemaglutinación de eritrocitos sensibilizados con tiroglobulina.

Consta de los siguientes pasos:

1. Purificación de la tiroglobulina
 2. Sensibilización y curtido de eritrocitos
 3. Determinación de anticuerpos
1. Purificación de la tiroglobulina según el método de Derrien⁽³⁵⁾.
 - a) Se cortan 100 g de tiroides en pedazos pequeños
 - b) Se le colocan 300 ml de solución de cloruro de sodio frío al 0.9% y se deja reposar por 12 horas a 2°C.
 - c) Se centrifuga en frío y se elimina la fracción insoluble.

- d) A cada 58 ml de sobrenadante se le agregan 42 ml de sulfato de amonio saturando, para lograr una solución con 42% de saturación.
 - e) El precipitado formado se separa por centrifugación.
 - f) Se coloca en incubadora a 20°C por 12 horas y se pone en suspensión en 280 ml de una solución de sulfato de amonio al 41%.
 - g) Después de 12 horas se centrifuga y se desecha el sobrenadante.
 - h) El precipitado se resuspende en sulfato de amonio al 37% y se centrifuga. Se desecha el precipitado.
 - i) Se dializa el sobrenadante contra agua destilada durante 24 horas.
 - j) Se liofiliza.
2. Sensibilización y curtido de eritrocitos^(36,37).
- a) Se obtiene sangre de carnero, con anticoagulante de Alsevers, volumen a volumen.
 - b) Se lavan los eritrocitos tres veces con solución salina isotónica.
 - c) Se hace una suspensión de eritrocitos al 4% en buffer de fosfatos pH 7.2.
 - d) Se mezclan volúmenes iguales de eritrocitos y ácido tánico 1:20,000 y se incuban 15 minutos a 37°C (el ácido tánico se disuelve en el buffer de fosfatos).

- e) Se centrifugan los eritrocitos y se lavan una vez con el buffer de fosfatos, restituyéndose en volumen con el mismo buffer.
- f) Se añade un volumen de la suspensión de eritrocitos al 2% a un volumen del antígeno diluido 1:4 en buffer salino de fosfatos pH 6.4 .
- g) Se dejan reposar a 37°C durante 10 minutos y se centri-fugan.
- h) Se lavan una vez en una solución 1:100 de suero normal de conejo y se resuspenden a su volumen original en el suero normal de conejo.
- i) Se agita la suspensión de eritrocitos y se añaden lenta-mente 5 ml de formol al 40% por cada 50 ml de suspen-sión.
- j) Después de reposar 18 horas a 4°C se añaden otros 5 ml de formol.
- k) Una vez sedimentadas las células, después de 2 ó 3 días, el sobrenadante se descarta y se resuspenden las células a su volumen original en solución salina.
- l) Se agitan las células y se dejan reposar nuevamente hasta su sedimentación.
- m) Finalmente se estandarizan a una suspensión al 1% en solu-ción salina.
- n) Se añaden 0.2 ml de formol a la solución final como pre-servador.

3. Determinación de anticuerpos antitiroglobulina.

- a) Se utiliza una placa de aglutinación para hacer la cuantificación de anticuerpos.
- b) Se añaden 0.025 ml de glóbulos rojos sensibilizados a 0.025 ml de diluciones progresivamente más altas del -- suero problema en solución salina, empezando desde 1:5.
- c) Para descartar la presencia de aglutininas anticamero, se corre un testigo en el que se añaden 0.025 ml de eritrocitos no sensibilizados.
- d) Cuando la prueba es positiva, los glóbulos rojos se depositan en el fondo de la placa de aglutinación a manera de carpetas difusas con bordes oscuros y fragmentados. Los resultados dudosos se consideran como negativos.
- e) Los resultados se expresan en términos de la dilución mayor en la que se observó claramente hemaglutinación.

III. Apareamiento:

Una vez conseguidos títulos satisfactorios de anticuerpos, se procedió a aparear las conejas, que entonces tenían de 4 a 7 meses de edad. Para ello se mantuvieron con un macho por un tiempo aproximado de 8 días en la jaula de apareamiento. Diecinueve días después de que se colocaron con este propósito, se determinó la presencia de embarazo por palpación del vientre. En el caso de que no hubiera datos de preñez, se repetía la operación cambiando de macho.

IV. Análisis cromosómico:

Debido al poco volumen sanguíneo que se puede extraer de las crías, se utilizó un micrométodo para análisis cromosómico; el cual consta de los siguientes pasos:

- A. Toma de la muestra
 - B. Cultivo
 - C. Recolección o cosecha
 - D. Preparación del frotis
- A. Toma de la muestra.
1. Se obtiene 1 ml de sangre por punción cardíaca, con una jeringa estéril que contenga 0.1 ml de heparina (1000 U/ml).
 2. Se deposita la sangre en un tubo estéril.
- B. Cultivo⁽³⁸⁾.
1. En cada determinación se utilizaron dos medios diferentes, con el propósito de obtener mayores probabilidades de éxito. Estos fueron el F₁₀ (PPL) y el de Weymouth (NABI); a ambos medios se les agrega cada 8 días desde la primera vez que se utilizan, 0.6 ml de una solución de L glutamina al 5% en agua destilada. Se les adiciona también 0.5 ml de penicilina (20,000 U/ml) y 0.5 ml de estreptomycinina (20,000 μ gr/ml), y se ajusta el pH final entre 7.2 y 7.4 con bicarbonato de sodio estéril al 7.5% o bien con bióxido de carbono gaseoso, según se requiera.
 2. Se colocan 4 ml de medio en un frasco de cultivo; se le agrega 1 ml de suero fetal de ternera PPL, 0.2 ml de fitohemaglutinina M

(Difco) y 8 gotas de sangre total.

3. Se incuba a 37 C de 65 a 72 horas.
4. Dos horas antes de cosecharse, se les agrega a cada uno de los cultivos 0,2 ml de una solución de colchicina (Lilly) a una concentración de 3 μ g/ml.

C. Cosecha⁽³⁹⁾.

1. Se pasa el contenido del frasco de cultivo a un tubo de centrifuga.
2. Se centrifuga a 800 rpm durante 5 minutos.
3. Se decanta el sobrenadante.
4. Se resuspende cuidadosamente el sedimento con solución salina isotónica con pipeta pasteur.
5. Se centrifuga a 800 rpm durante 5 minutos.
6. Con pipeta pasteur se extrae el sobrenadante dejando 0,5 ml y se resuspenden las células agregando gota a gota 2 ml de una solución hipotónica de cloruro de potasio 0,075 M.
7. Se incuba a 37°C durante 13 minutos.
8. Se centrifuga a 600 rpm durante 5 minutos.
9. Se extrae el sobrenadante con pipeta pasteur y se agregan 5 ml de fijador (alcohol metílico absoluto: ácido acético glacial 3:1) recién preparado, teniendo cuidado de no romper el botón de células.
10. Se deja reposar por 15 minutos.
11. Se rompe el botón por medio de la pipeta; se deja reposar 5 minutos y se centrifuga a 800 rpm durante 5 minutos.

12. Se repite esta operación cuantas veces sea necesario hasta que el botón quede limpio.
13. Se deja reposar a 4°C hasta el día siguiente.
14. Se hace un nuevo cambio de fijador y se centrifuga; se desecha una parte del sobrenadante y se resuspenden las células procurando formar una solución medianamente concentrada de las mismas.

D. Preparación del frotis

1. Se colocan los portaobjetos limpios y desgrasados en un vaso de agua helada.
2. Se elimina el exceso de agua de las laminillas y, aún húmedas, se agregan 3 gotas de la suspensión de células con una pipeta pasteur.
3. Se fija a la flama.
4. Se trata la preparación con ácido clorhídrico 5N durante 15 minutos.
5. Se tiñe con una solución Giemsa (Giemsa al 1% en glicerina y alcohol metílico absoluto 1:1) por 15 minutos.
6. Se lava y se deja escurrir.

Una vez teñidas las laminillas están listas para ser observadas.

E. Observación al microscopio

1. Cuenta de cromosomas
2. Elaboración de cariotipo

1. Cuenta de cromosomas: La confiabilidad de la cuenta es importante y para ello debe contarse con:

- a) Un buen microscopio con iluminación adecuada.
- b) Laminillas óptimas, lo que se determinará por observación microscópica a menor aumento.
- c) Selección adecuada de las células para su conteo. Se escogen células intactas, que tengan el menor número posible de cromosomas sobrepuestos y cuya morfología sea buena.

De acuerdo con estas condiciones se procura contar un número mínimo de 20 células en cada estudio, el cual se aumentará cuando se presenten varias líneas celulares. En el presente trabajo se decidió evaluar también la proporción de células hiperploides (66 ó más cromosomas). Para ello se hizo una relación de número de mitosis examinadas, independientemente de la calidad de su morfología. Únicamente se estudiaron así, aquellos animales en que durante el curso de la búsqueda de las 20 mitosis iniciales con buena morfología, se encontró alguna célula hiperploide.

2. Elaboración del cariotipo: Una vez terminado el recuento celular, se seleccionan las células con mejor morfología para su fotografía. Esta se realiza con un fotomicroscopio, o bien con una cámara adaptada a un microscopio y usando rollo de alto contraste. Se revela el rollo, se imprimen las fotografías

y se procede a hacer el cariotipo.

El conejo Oryctolagus cuniculus tiene un número diploide de 44 -- cromosomas, los cuales pueden ser divididos en cuatro grupos de acuerdo con la localización de sus centrómeras⁽⁴⁰⁻⁴³⁾:

Grupo A. Seis pares de cromosomas metacéntricos.

(Índice de brazo cercano a 1)

Grupo B. Seis pares de cromosomas submetacéntricos.

(Índice de brazo 1.7 - 3.0)

Grupo C. Seis pares de cromosomas marcadamente submetacéntricos.

(Índice de brazo 3.0 - 7.0)

Grupo D. Cuatro pares de cromosomas acrocéntricos.

(Índice de brazo 7.0)

En el grupo "B" se localizan los cromosomas X e Y. El cromosoma Y es el más pequeño de todo el cariotipo y generalmente se distingue por ser heterocromático. El cromosoma X es difícil de distinguir de los demás autosomas del -- grupo "B".

Capítulo III

RESULTADOS

En la tabla 1 aparecen los títulos de anticuerpos antitiroideos registrados en las 21 conejas inmunizadas con extractos tiroideos de bovino, de conejo y de humano. En la tabla 2 se observan los resultados del análisis cromosómico de las 39 crías de conejas inmunizadas (18 hembras y 20 machos). En la tabla 3 los resultados encontrados en las 21 crías del grupo control (10 hembras y 7 machos). En uno de los descendientes del primer grupo y en cuatro del segundo, falló la técnica de cultivo. En la tabla 4 se presentan los resultados de las pruebas de funcionamiento tiroideo (yodo protéico y captación de triyodotironina) y la interpretación de los estudios histológicos en las conejas inmunizadas que quedaron embarazadas así como en las que no se presentó embarazo.

En las figuras 1 y 2 se presentan los cariotipos de conejos hembra y macho respectivamente.

TABLA 1 TITULOS DE ANTICUERPOS ALCANZADOS POR LAS 21 CONEJAS INMUNIZADAS CON EXTRACTOS TIROIDEOS PROVENIENTES DE TRES ESPECIES DIFERENTES.

CONEJA	ORIGEN DEL EXTRACTO TIROIDEO	PERIODO DE INMUNIZACION (meses)	TITULOS MAYORES DE ANTICUERPOS	
			Difusión en Agar	Hemaglutinación de eritrocitos sensibilizados con tiroglobulina
1	Bovino	5	1:4	-
2	Bovino	5	1:4	-
3	Conejo	5	Neg	Neg
4	Conejo	5	Neg	Neg
5	Conejo	5	Neg	Neg
6	Conejo	5	1:4	Neg
7	Humano	3,5	1:16	1:10 000 000
8	Humano	3,5	-	1:10 000 000
9	Humano	2	Neg	-
10	Humano	2	1:32	1:5 000 000
11	Humano	2	-	1:5 000 000
12	Humano	2	1:16	1:5 000 000
13	Humano	2,5	Neg	Neg
14	Humano	3	-	1:5 000 000
15	Humano	3,5	1:4	Neg
16	Humano	2	-	1:5 000 000
17	Humano	2	1:32	1:20 000
18	Humano	2	-	1:10 000 000
19	Humano	2,5	1:16	-
20	Humano	3	-	Neg
21	Humano	3	-	1:5 000 000

Todas las conejas con títulos de anticuerpos de 1:20 000 ó superiores en la prueba de hemaglutinación de eritrocitos con tiroglobulina, se aparearon. De ellas, únicamente seis (Nos. 7, 10, 14, 16, 18 y 21) se embarazaron y la No. 18 presentó un aborto múltiple.

TABLA 2 RESULTADO DEL ANALISIS CROMOSOMICO DE LAS CRIAS DEL GRUPO EXPERIMENTAL.

CONEJAS No.	CRIAS	SEXO	No. MITOSIS	CELULAS No.	TETRAPLOIDES %
7	1	♀	100	7	7.0
	2	♀	100	1	1.0
	3	♀	30	0	0.0
	4	♀	21	0	0.0
	5	♀	21	0	0.0
	6	♀	16	0	0.0
	7	♀	50	3	6.0
	8	♀	21	0	0.0
	9	♀	21	0	0.0
	10	-	-	-	-
	TOTAL		380	11	2.9
10	1	♀	100	3	3.0
	2	♀	30*	0	0.0
	3	♀	21	0	0.0
	4	♀	21	0	0.0
	5	♀	9	0	0.0
	6	♀	100	2	2.0
	7	♀	100*	3	3.0
	8	♀	30	0	0.0
	9	♀	25	0	0.0
	10	♀	21	0	0.0
	TOTAL		457	8	1.7
14	1	♀	50**	0	0.0
	2	♀	100	3	6.0
	3	♀	21	0	0.0
	4	♀	21	0	0.0
	5	♀	21	0	0.0
	6	♀	21	0	0.0
	TOTAL		234	3	1.2
16	1	♀	30***	0	0.0
	2	♀	25	0	0.0
	3	♀	50	0	0.0
	4	♀	50	0	0.0
	TOTAL		155	0	0.0
21	1	♀	24	0	0.0
	2	♀	18	0	0.0
	3	♀	17	0	0.0
	4	♀	13	0	0.0
	5	♀	23	0	0.0
	6	♀	21	0	0.0
	7	♀	21	0	0.0
	8	♀	19	0	0.0
	9	♀	10	0	0.0
	TOTAL		166	0	0.0

* 10% de las células mostraron rompimientos cromosómicos
 ** 4% de las células mostraron rompimientos cromosómicos
 *** 10% de las células mostraron endorreduplicación parcial

TABLA 3 RESULTADO DEL ANALISIS CROMOSOMICO DE LAS CRIAS DEGL GRUPO TESTIGO.

CONEJA	CRIAS	SEXO	No. MITOSIS	CELULAS No.	TETRAPLOIDES %
1	1	♀	48	1	2.0
	2	♀	21	0	0.0
	3	♀	18	0	0.0
	4	♀	16	0	0.0
	5	♂	21	0	0.0
	TOTAL			124	1
2	1	♀	92	1	1.0
	2	♀	28	0	0.0
	3	♀	27*	0	0.0
	4	♀	21	0	0.0
	5	♂	100	1	1.0
	6	♂	55	0	0.0
	7	♂	28	0	0.0
TOTAL			261	2	0.8
3	1	♀	16	0	0.0
	2	♀	14	0	0.0
	3	♀	52**	1	2.0
	4	♂	9	0	0.0
	5	♂	8	0	0.0
	6	-	-	-	-
	7	-	-	-	-
	8	-	-	-	-
	9	-	-	-	-
TOTAL			99	1	1.0

* 3% de las células mostraron rompimientos cromosómicos

** 2% de las células mostraron rompimientos cromosómicos

TABLA 4 PRUEBAS DE FUNCIONAMIENTO TIROIDEO E HISTOPATOLOGIA DE LAS CONEJAS INMUNIZADAS.

CONEJA No.	YODO PROTEICO μgr/100 ml	CAPT. DE TRIYODO TIRONINA. (U)	DATOS HISTOLOGICOS
7	-	-	-
*8	4.0	2.18	Tiroiditis crónica discreta e incipiente.
10	2.4	0.77	Hiperplasia folicular zonal.
*11	-	-	Tiroiditis crónica y fibrosa incipiente.
*12	7.0	0.81	Hiperplasia Multifocal. Tiroiditis crónica mínima.
14	8.6	1.119	Cambios atróficos multifocales de folículos tiroideos con infiltración linfocitaria mínima. - Adenoma fetal.
16	7.5	1.27	Cambios atróficos difusos del tejido glandular con dos focos de infiltración linfocitaria.
*17	6.6	1.61	Cambios atróficos difusos del tejido glandular con dos focos de infiltración linfocitaria. - Placa de microfoliculos de aspecto fetal.
18	-	-	Tiroides de aspecto normal con un foco mínimo de tiroiditis crónica.
21	7.8	1.60	-

* Conejas en las que no se logró embarazo.

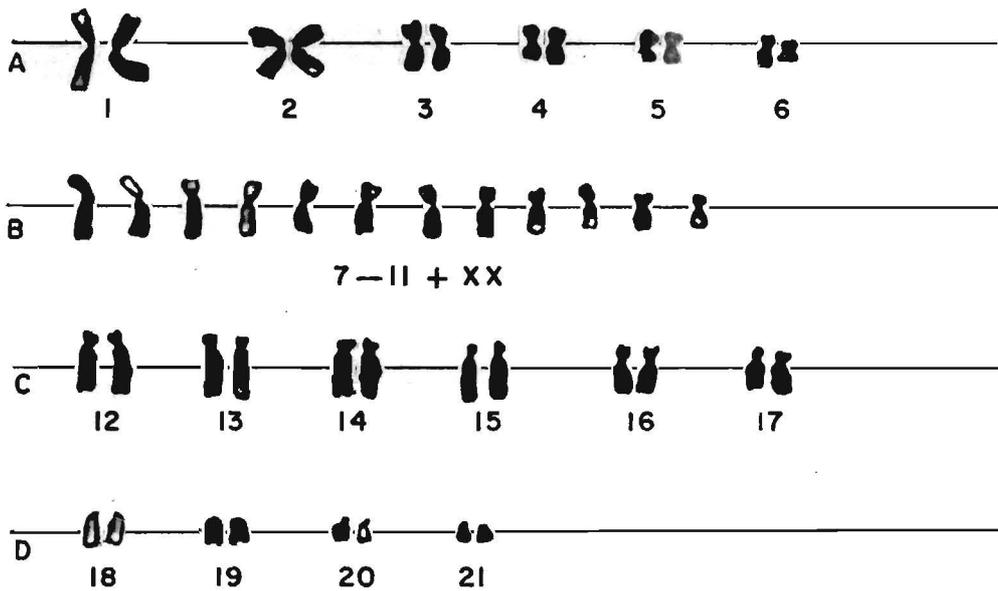


FIG. 1

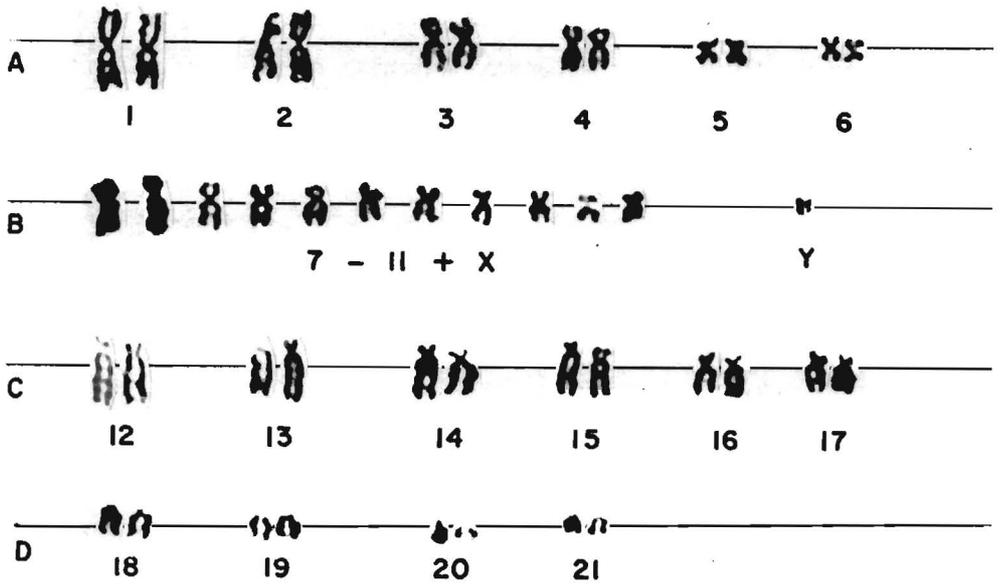


FIG. 2

Capitulo IV

DISCUSION

Como se puede observar en la tabla 1, el antígeno más eficaz fue el de origen humano. En efecto, diez de las quince conejas inmunizadas en esta forma, produjeron títulos elevados de anticuerpos antitiroideos. Como los ensayos con los antígenos de bovino y de conejo fueron insuficientes no se hicieron consideraciones acerca de su eficacia, puesto que el objeto de este trabajo era la inmunización de los animales con el antígeno más práctico y no la investigación de las diferencias en la capacidad antigénica de los distintos extractos tiroideos. La razón para usar como guía los resultados de la técnica de hemaglutinación sobre la de difusión en agar, fue que la primera es más sensible y mide específicamente anticuerpos contra la tiroglobulina, que son los fundamentalmente implicados en la etiología del síndrome de Down.

De las diez conejas que se aparearon, únicamente se lograron embarazar seis de ellas. Inicialmente se pensó que esto era debido a que la presencia de anticuerpos antitiroideos produjo hipotiroidismo en algunas de las conejas; lo que les impidió que se embarazaran (conejas 8, 11, 12 y 17); sin embargo, tal como se puede observar en la tabla 4, no hubo diferencias en el funcionamiento tiroideo con el grupo de animales que se logró embarazar (conejas 7, 10, 14, 16, 18 y 21). Tampoco se observaron diferencias claras en el estudio histológico de las glándulas tiroideas de ambos grupos. Es posible que las jaulas de apareamiento empleadas hayan sido inadecuadas para el propósito que se buscaba y que ello explique el fenómeno.

De las seis conejas embarazadas, la No. 18 tuvo un aborto múltiple, que por desgracia no fue posible analizar citogenéticamente ya que no se detectó a tiempo para poder lograr su análisis. El resto tuvo un total de 39 crías y, como

se puede observar en la tabla 2, ninguna mostró aneuploidía. La proporción de rompimientos cromosómicos y de células tetraploides, no fue significativamente diferente de la observada en el grupo de comparación ($\chi^2 = 1.51$; $p > 0.20$). Algunas conejas fueron claramente diferentes de las demás en relación al porcentaje de células tetraploides, y el 50% de las mismas se observaron en crías de una sola coneja, la No. 7. Los rompimientos cromosómicos por otro lado, estuvieron repartidos en forma más uniforme. Vale la pena señalar que Fialkow⁽⁴⁴⁻⁴⁶⁾ encontró in vitro, que los extractos linfocitarios alogénicos producen incremento significativo de rompimientos cromosómicos e hiperploidías en cultivo de fibroblastos normales. Podría ser que lo encontrado en la coneja No. 7, fuera explicado por este hecho, pero resulta imposible asegurarlo.

Los resultados negativos obtenidos en este estudio no invalidan la hipótesis que se pretendió probar ya que no pueden considerarse como concluyentes debido a cuando menos los siguientes hechos:

a) No existe información sobre la frecuencia espontánea de anomalías cromosómicas en conejos vivos recién nacidos; si suponemos, sin que haya ninguna evidencia para ello, que es similar a la del hombre, de 0.56%⁽⁴⁷⁾, la probabilidad de encontrar un sujeto con aneuploidía es de únicamente de 17.64%. Esta cifra se obtuvo usando la regla 3 para combinar probabilidades descritas por Crow⁽⁴⁸⁾ que dice: si la probabilidad de un evento A es p y la de la ocurrencia del evento alternativo B (no ocurrencia de A) es q, la probabilidad de que en n veces el evento A ocurra s ocasiones y el evento B, t veces es:

$$\frac{n!}{s! t!} p^s q^t$$

En nuestro caso A fue la presencia de alteración cromosómica, B la ausencia de la misma, n tuvo valor de 39, s de 1 (probabilidad de que el evento A ocurra una vez en 39), t de 38 (probabilidad de que el evento B ocurra 38 veces en 39), p de 0.56% y q de 99.44%.

b) Se sabe que en el humano muchas de las anomalías cromosómicas - producen abortos espontáneos tempranos en el embarazo, desconocemos si en el conejo los productos cromosómicamente anormales son viables y es cuando menos teóricamente posible que no lo fueran. En tal caso es indispensable estudiar a los abortos para tener información completa. En este estudio ya se explicó porque no fue posible hacerlo.

c) En esta investigación se produjeron heteroanticuerpos; los datos positivos en el humano se refieren siempre a autoanticuerpos.

A pesar de todas estas desventajas, la forma de abordar el problema es un buen modelo experimental para probar esta y otras hipótesis relativas a agentes que supuestamente causan anomalías cromosómicas, por otro lado si los resultados del estudio hubieran sido positivos, probablemente ninguno de los inconvenientes a los que nos referimos tendrían mucho peso.

Capitulo V

RESUMEN

Con el propósito de investigar el posible papel etiológico que puedan desempeñar los anticuerpos antitiroideos en la producción del síndrome de Down, se inmunizaron 21 conejas de laboratorio utilizando extractos tiroideos de tres especies diferentes. Se lograron mejores resultados con el antígeno de origen humano, alcanzándose títulos de anticuerpos antitiroideos de 1:20,000 ó superiores. A las conejas así inmunizadas se les intentó aparear y se logró embarazo en sólo el 60% de las mismas. Tanto a la descendencia de conejas inmunizadas como a la de un grupo testigo, se les practicó análisis cromosómico en la sangre periférica. No se registraron aneuploidías, pero hubo aumento en la proporción de células tetraploides en las crías de tres conejas del grupo experimental, y se observó que el 50% de las mismas se concentraron en la descendencia de una sola coneja.

La frecuencia de células tetraploides en el total de mitosis analizadas en el grupo experimental no fue estadísticamente diferente de la encontrada en el grupo testigo. La frecuencia de rompimientos cromosómicos fue del mismo orden en ambos grupos.

La ausencia de aneuploidía en el presente estudio no descarta la hipótesis planteada y, en el trabajo, se discuten los posibles motivos para explicar los resultados y las razones por las que éste se debe tomar como preliminar.

BIBLIOGRAFIA

1. ARMENDARES, S.: Citogenética humana normal y patológica. Interamericana. México, 1968.
2. LEJEUNE, J., Gautier, M. y Turpin, R.: Le mongolisme, maladie chromosomique (trisomie). Bull. Acad. Nat. Med., 143: 256, 1959.
3. JENKINS, R.L.: Etiology of mongolism. Amer. J. Dis. Child., 45: 506, 1933.
4. PENROSE, L.S.: The relative effects of paternal and maternal age in mongolism. J. Genet., 27: 219, 1933.
5. UCHIDA, I.A. y Curtis, E.J.: A possible association between maternal radiation and mongolism. Lancet, 2: 848, 1961.
6. SIGLER, A.T., Lilienfeld, A.M., Cohen, B.H. y Westlake, J.E.: Radiation exposure in parents of children mongolism. (Down's syndrome). Bull. Johns Hopkins Hosp., 117: 374, 1966.
7. STOLLEN, A. y Collman, R.P.: Incidence of infective hepatitis followed by Down's syndrome nine months later. Lancet, 2: 1221, 1965.
8. BENDA, C.E.: Mongolism and cretinism. Grune y Stratton. New York, 1946.
9. MELLON, J.P., Pay, B.Y. y Greene, D.M.: Mongolism and thyroid autoantibodies. J. Ment. Defic. Res., 7: 31, 1963.
10. SAXENA, K.M. y Pyles, C.V.: Thyroid function in mongolism. J. Pediat., 67: 363, 1965.
11. RICHARDS, B.W., Stewart, A., Sylvester, P.E. y Jasiewicz, U.: Cytogenetics survey of 225 patients diagnosed clinically as mongols. J. Ment. Defic. Res., 9: 245, 1965.
12. BURGIO, G.R., Severi, F., Rossoni, R. y Vaccaro, R.: Mongolism and thyroid autoimmunity. Lancet, 1: 166, 1965.
13. BURGIO, G.R., Severi, F., Rossoni, R. y Vaccaro, R.: Autoantibodies in Down's syndrome. Lancet, 1: 497, 1965.
14. FIALKOW, P.J.: Autoimmunity and chromosomal aberrations. Amer. J. Hum. Gen., 18: 93, 1966.

15. FIALKOW, P.J. y Uchida, I.A.: Autoantibodies in Down's syndrome and gonadal dysgenesis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 155: 759, 1968.
16. FIALKOW, P.J., Thuline, H.C., Hecht, F. y Bryant, J.: Familial predisposition to thyroid disease in Down's syndrome controlled immunoclinical studies. *Amer. J. Hum. Genet.*, 23: 67, 1971.
17. ENGEL, E.: Autoantibodies and chromosomal aberrations. *Lancet*, 1: 1271, 1967.
18. ENGELBERH, O., Jezková, Z., Belikovova, H. y Kucera, J.: Autoantibodies in Down's disease. *Sborn. Léč.*, 69: 232, 1967.
19. VANHAELST, L., Hayes, F., Bonnyns, M. y Bastenie, P.A.: Thyroid auto-immune disease and thyroid function in families of subjects with Down's syndrome. *J. Clin. Endocr.*, 30: 792, 1970.
20. DOLLINGER, A.: Zur aetiologie des mongolismus. *Zeitschrift Kinderheilkund.*, 27: 332, 1921.
21. MEYERS, C.R.: An application of the control group method to the etiology of mongolism. *Proc. Amer. Assoc. Ment. Defic.*, 62: 142, 1938.
22. BENDA, E.E.: Prenatal maternal factors in mongolism. *J. Amer. Med. Assoc.*, 139: 949, 1949.
23. EK, J.I.: Thyroid function in mothers of mongoloid infants. *Acta Paediat.*, 48: 33, 1959.
24. COPPEN, A. y Cowie, V.: Maternal health and mongolism. *Brit. Med. J.*, 11: 1843, 1960.
25. WREN, P.J., Evans, D.A., Veters, J.M. y Chew, A.: Autoimmune antibodies in mongol families. *Lancet*, 2: 186, 1967.
26. FIALKOW, P.J., Uchida, I.A., Hecht, F. y Motulsky, A.G.: Increased frequency of thyroid autoantibodies in mothers of children with Down's syndrome. *Lancet*, 2: 868, 1965.
27. FIALKOW, P.J.: Thyroid antibodies, Down's syndrome and maternal age. *Nature*, 214: 1253, 1967.
28. FIALKOW, P.J.: Autoantibodies and chromosomal aberrations. *Lancet*, 1: 1106, 1967.

29. DALLAIRE, L. y Kingsmill-Flynn, D.: Frequency of antibodies to thyroglobulin in relation to gravidity and to Down's syndrome. *Cand. Med. Assoc. J.*, 97: 209, 1967.
30. KAPLAN, R.A. y Zsako, S.: Biological variables associated with mothers of children affected with the G1-trisomy syndrome (Down's syndrome). *Am. J. Ment. Defic.*, 74: 745, 1970.
31. FIALKOW, P.J.: Autoimmunity A predisposing factor to chromosomal aberrations?. *Lancet*, 1: 474, 1964.
32. ROSE, N.R. y Witebsky, E.: Studies in organ specificity. V.: Changes in thyroid glands of rabbits following active immunization with rabbit thyroid extracts. *J. Immunol.*, 76: 417, 1956.
33. LERMAN, J.: Endocrine action of thyroglobulin antibodies. *Endocrinology*, 31: 558, 1942.
34. CAMPBELL, D.H., Garvey, S.J., Cremer, E.N. y Susdorf, H.D.: *Methods in immunology*. Benjamin, New York, 1964.
35. DERRIEN, Y., Michel, R. y Roche, J.: Recherches sur la préparation et les propriétés de la thyroglobuline pure I. *Biochem. et Biophys. Acta*, 2: 454, 1948.
36. BOYDEN, S.V.: Adsorption of proteins on erythrocytes treated with tannic acid and subsequent hemagglutination by antiprotein sera. *J. Exper. Med.*, 93: 107, 1951.
37. STATVITZKY, A.B. Citado en Hall, R.: Immunological aspects of thyroid function. *New Engl. J. of Med.*; 266: 1204, 1962.
38. MORA, G.: Prevalencia del síndrome XYY entre prisioneros. Tesis. U.N.A.M. México, 1968.
39. COBO, A.: Cariotipo en médula ósea. Estudio de algunos pacientes con enfermedades hematológicas. Tesis. U.N.A.M. México, 1968.
40. MELANDER, Y.: The chromosome complement of the rabbit. *Hereditas*, 42: 432, 1956.
41. NICHOLS, W.W., Levan, A., Hansen-Melander, E. y Melander, Y.: The idiogram of the rabbit. *Hereditas*, 53: 63, 1956.

42. RAY, M. y Williams, T.W.: Kariotype of rabbit chromosomes from leucocyte cultures. *Canad. J. Genet. Cytol.*, 8: 393, 1966.
43. HSU, T.C. y Bernirshke, K.: *An Atlas of Mammalian Chromosomes*. 1. Folio 8, 1969.
44. FIALKOW, P.J. y Gartler, S.M.: Hyperploidy effect of lymphocyte extract on fibroblasts in vitro. *Nature*, 211: 713, 1966.
45. FIALKOW, P.J.: The induction of chromosomal aberrations in vitro by allogeneic lymphocyte extract. *Transplantation*, 5: 989, 1967.
46. FIALKOW, P.J.: Chromosomal breakage induced by extracts of human allogeneic lymphocytes. *Science*, 155: 1676, 1967.
47. RATCLIFFE, S., Stewart, A., Melville, P., Jacobs, P. y Keny, A.J.: Chromosome studies on 3500 newborn male infants. *Lancet*, 1: 121, 1970.
48. CROW, J.F.: *Genetic notes* (5th edit.) Burgess, Minnesota, 1963.