



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

"RADIOINMUNOANALISIS DE HORMONAS TIROIDEAS EN UNA
ESPECIE DE TELEOSTEO. ESTANDARIZACION DEL METODO
Y VALORES DE REFERENCIA."

T E S I S

Que para obtener el Título de
LICENCIADO EN BIOLOGIA

presenta

AUREA OROZCO RIVAS



México, D. F.

1989



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

A mis padres
Gustavo y Eva

A la memoria de mi abuelo
Jose Maria

A Javier, Papá e Hijo

Agradecimientos:

A la Universidad Autónoma de México

Al Instituto de Investigaciones Biológicas UNAM

La asesoría del Dr. Carlos M. Valverde Rodríguez

El apoyo del Vicealmirante Gilberto López Lina

A la Química Aida Ruiz Juárez

I N D I C E

I. LA GLÁNDULA Y LAS HORMONAS TIROIDICAS	...1
Yodotirosinas y Yodotironinas	...1
Antecedentes de la Función Tiroidea	...2
Las Tirosinas Yodadas en Invertebrados	...2
El Endostilo	...3
Generalidades	...4
Aspectos Morfofuncionales	...5
De Endostilo a Glándula Tiroidea	...7
Urochordata y Cephalochordata	...7
Agnatha	...8
Evolución de la Glándula y de la Función Tiroidea	...9
Evolución de la Glándula	...9
Evolución de la Función Tiroidea	...10
La Glándula Tiroidea	...12
Aspectos Morfofuncionales	...12
Desarrollo de la Glándula Tiroidea	...12
Variaciones Morfológicas	...13
Las Hormonas Tiroideas	...14
Biosíntesis y Secreción	...14
Transporte y Metabolismo	...15
Acciones y Efectos	...17

Control de la Función Tiroidea	...18
II. LAS HORMONAS TIROIDEAS EN TELEOSTEOS	...21
Proteínas Transportadoras de HT en Peces	...22
Hormonas Tiroideas en Salmonidos	...22
Esmoltificación, Migración y Reproducción	...22
Hormonas Tiroideas en <i>Salmo gairdneri</i>	...26
Ritmos Estacionales de HT	...26
Ritmo Circadiano de HT	...27
Ayuno y HT	...28
Temperatura y HT	...29
Triyodotironina Inversa	...29
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA EXPERIMENTAL	...30
Propósitos y Objetivos de la Tesis	...30
Importancia del Radioninmunoanálisis	...31
Fundamentos del Radioninmunoanálisis	...32
Requisitos del Radioninmunoanálisis	...35
IV. DISEÑO EXPERIMENTAL Y PROGRAMA DE TRABAJO	...38
Material y Métodos	...38
Material Biológico	...38
Material de Vidriería y Equipo	...39
Sales, Solventes y Reactivos	...39
Soluciones	...40
Protocolos y Resultados Preliminares	...41
Estandarización del RIA de T_4	...41
Preparación de Suero Hipotiroideo	...41
Hormona Radiactiva y Titulación del Anticuerpo	...43

Acido 8 anilino - 1 - naftalensulfonico o ANS	...44
Separación con Carbon - Dextran	...45
Separación con Segundo Anticuerpo	...45
Curva Estandar y Tiempo de Incubacion	...46
Procedimiento Final	...47
Cálculos	...48
Graficado	...49
Estandarización del RIA de T ₃	...50
Separación con Segundo Anticuerpo	...51
Curva Estandar	...51
Procedimiento Final	...52
V. RESULTADOS	...53
Validación y Control de Calidad del RIA	...53
Inmunoreactividad Cruzada	...53
Especificidad	...53
Sensibilidad	...54
Reproducibilidad y Exactitud	...54
Variación Interensayo	...54
Variación Intraensayo	...54
Valores Normales de HT en la Trucha arcoiris	...55
Perfil Ontogenico de las Tironinas en la Trucha arcoiris..	55
VI. DISCUSION	...59
VII. CONCLUSIONES	...65
VIII. BIBLIOGRAFIA	...67

I. LA GLANDULA Y LAS HORMONAS TIROIDEAS

Yodotirosinas y Yodotironinas

El yodo es el elemento más pesado que se metaboliza en materiales biológicos. Su peso probablemente determina su escasez en la tierra, ya que únicamente constituye aproximadamente el $3 \times 10^{-8}\%$ de suelos y del 1 al $7 \times 10^{-4}\%$ del agua de mar (Wolff, 1964).

Se sabe que en todos los vertebrados la glándula tiroides está constituida por células especializadas que han desarrollado un mecanismo muy eficiente y específico denominado genericamente bomba de yodo, el cual les permite concentrar activamente a este elemento y unirlo al aminoácido tirosina. Estos residuos de tirosina se encuentran formando parte de una glucoproteína específica de la glándula: la tiroglobulina (TgB) y su yodación da lugar a la síntesis de las moléculas de monoyodotirosina y diyodotirosina (MIT y DIT respectivamente). Además, la glándula posee la maquinaria enzimática necesaria para combinar estos aminoácidos yodados y sintetizar yodotironinas con actividad hormonal: las hormonas triyodotironina (T_3) y tetrayodotironina o tiroxina (T_4). Estas yodotironinas son hasta el momento, las

únicas moléculas tiroideas a las que se les reconoce actividad biológica. La glándula sintetiza también pequeñas cantidades de un isómero de la T_3 llamado triyodotironina reversa (rT_3), y para el cual hasta el momento no se le reconoce actividad biológica (De Groot, 1965; Barrington, 1975; De Groot y Taurog, 1979; Gordon, 1979).

Aunque todos los vertebrados poseen glándula tiroides, también se sabe que otros organismos son capaces de fijar yodo y unirlo a proteínas. Esta información es de gran interés, ya que a partir de ella se han realizado estudios filogenéticos encaminados a responder entre otras las siguientes preguntas: en qué organismos aparecen y se desarrollan los mecanismos específicos para atrapar yodo (bomba de yodo) ?, y en cuáles ocurre la especialización de ese tejido en un órgano con características funcionales de una glándula endócrina o de secreción interna ? (Barrington, 1975; Gorbman, 1978; Hoar, 1979).

Para hacer más claro lo anterior, a continuación se revisarán los conocimientos actuales acerca de la filogenia de la glándula tiroides.

Antecedentes de la Función Tiroidea

Las Tirosinas Yodadas en Invertebrados. La organificación o biosíntesis de moléculas yodadas no es un proceso que se limite a especies vertebradas. En un principio se pensaba que únicamente los organismos que contaban con una glándula tiroides eran

capaces de fijar el yodo y unirlo a proteínas para formar hormonas tiroideas. Sin embargo, en la década de los años cincuenta, una serie de estudios bioquímicos y fisiológicos, demostraron que el yodo se fija a tejidos y estructuras de algunos invertebrados e inclusive también de algunas plantas. Es importante hacer notar que la confiabilidad de esta información no es muy alta, ya que para su obtención se realizaron análisis cromatográficos menos desarrollados que los actuales (Clements-Merlini, 1962 a, b; Hoar, 1979; Young, 1981).

Como ya se mencionó, actualmente se sabe que el primer paso en la síntesis de yodo - tirosinas consiste en la unión del yodo al aminoácido tirosina para formar MIT y DIT. Ambas biomoléculas se encuentran presentes en algunas algas (c.ref. Roche & Yagi, 1952), corales (c.ref. Vinogradov, 1935), anélidos y moluscos (c.ref. Gorbman et al, 1954), insectos (Limpel & Casida, 1957), así como en todos los vertebrados (Young, 1981). También se ha encontrado la presencia de T_3 y T_4 en la mayoría de los organismos antes citados (Gorbman, 1954; Limpel & Casida, 1957).

Cabe mencionar que en los invertebrados, un alto porcentaje del yodo unido a proteínas se encuentra formando parte de estructuras corneas o fibrosas, y que una cantidad menor se encuentra unida a órganos blandos, generalmente epitelios (Gorbman et al, 1954; Limpel y Casida, 1957).

La función que desempeña el yodo y/o las biomoléculas yodadas

en estos organismos no se conoce, pero uno no puede dejar de preguntarse acerca de la relación que existe entre las moléculas yodadas en organismos inferiores en la escala filogenética, sin función aparente, y la gran importancia biológica que tienen estas mismas biomoléculas en los vertebrados. Esto ha llevado a la elaboración de algunas hipótesis, las cuales se discuten más adelante.

El Endostilo

Generalidades. La primera evidencia morfológica y funcional de la existencia de un órgano fijador de yodo se ha documentado en los protocordados. Estos organismos filtradores presentan en el piso de la faringe una estructura hendida que ha recibido el nombre de endostilo. Este órgano posee tractos longitudinales de células secretoras de una sustancia mucosa. El moco secretado por estas células a la luz del endostilo forma una capa que se extiende por la faringe, atrapando las partículas de alimento. La secreción mucosa junto con el alimento son conducidas hacia el esófago para después ser digeridas (Young, 1981).

Aunque el endostilo es un órgano digestivo, se sabe que algunas de sus células fijan yodo de manera selectiva, permitiendo la formación de MIT y DIT e inclusive de T_3 y T_4 . Este hallazgo aunado a otros hechos como su localización anatómica y origen embrionario, han dado lugar a que se le considere como "precursor" de la glándula tiroides (Barrington, 1959). A

continuación se revisa la morfofisiología del endostilo y su evolución en los protocordados.

Aspectos Morfofuncionales. La organización morfológica general del endostilo es bien conocida (Barrington, 1965). Como ya mencionamos, el endostilo secreta un material mucoso que recubre la faringe y le confiere a ésta, la función de un filtro o "coladera" con movimiento filtrando la corriente de agua que pasa a través de las aberturas branquiales (estigmata). Se ha encontrado, por microscopía de luz, que esta membrana se origina a partir de tres pares de cordones de células glandulares (zonas 2, 4 y 6), las cuales están separadas entre sí por tres pares de tractos de células ciliadas (zonas 1, 3 y 5), dos de las cuales presentan cilios cortos y el tracto basal o zona 1, con cilios muy largos. Además de estas seis zonas, existen otros dos tipos de células que forman los labios dorsales del zurco endostilar, una zona de epitelio no ciliado (zona 7) y la otra de células altamente ciliadas (zona 8), las cuales son responsables de dirigir la secreción endostilar hacia las paredes laterales de la faringe (figura 1).

Se sabe que las células de las zonas 2 y 4 son secretoras de proteínas y que las de la zona 6 secretan tirosina y mucopolisacáridos. Las células de la zona 7 unen y acumulan yodo y promueven la síntesis de productos yodados. Estos productos y las secreciones de las zonas 2, 4 y 6 son vertidos a la luz del endostilo formando así la sustancia mucosa que va a recubrir a la

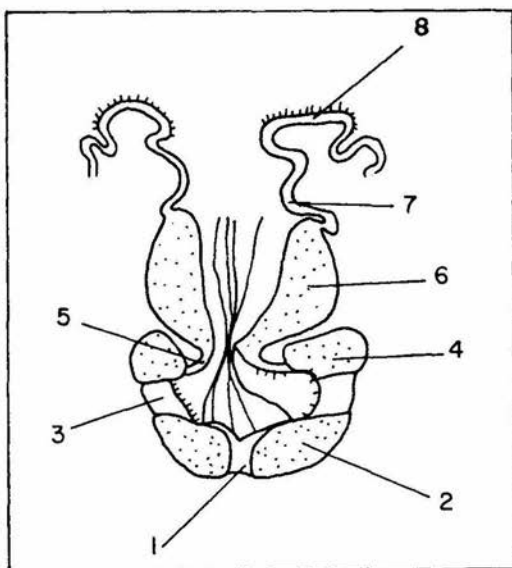


Figura 1.- Diagrama de la sección transversal del Endostilo de *Ciona intestinalis* en donde 1, 3 y 5, células ciliadas; 2, 4 y 6, Porción glandular; 7, epitelio no ciliado y 8, células ciliadas que expulsan la secreción a la faringe.

faringe en forma de membrana. Esta membrana mucosa es capaz de atrapar partículas hasta de una micra de diámetro (Barrington, 1965; Young, 1981). Se considera que las células de las zonas 7 y 8 del endostilo son las homólogas a las células tiroideas (Fujita, 1980).

En homogenados de endostilo se han encontrado MIT, DIT, T₃ y T₄, pero no hay evidencia de que las yodotironinas secretadas por el animal ejerzan algún efecto hormonal (Young, 1981).

Por otra parte, se ha encontrado que la sangre de los protocordados une yodo en proporciones significativamente mayores que en el hombre y otros vertebrados (126 vs 6.3 ug/dl respectivamente). Este yodo circulante se encuentra unido a proteínas y se ha demostrado que está organificado, ya que por cromatografía se han encontrado MIT, DIT, y T₄ y ocasionalmente T₃ (Kennedy, 1966). Estas observaciones y el hecho de que la inhibición de la captura de yodo por el endostilo mediante la administración de tiocianato de potasio (KCNS), no provoca la desaparición de las yodotirosinas yodadas, ha llevado a proponer la posible existencia de dos mecanismos fijadores de yodo en protocordados: un mecanismo especializado, que involucra al endostilo, y uno más primitivo que no requiere de órganos especializados y que posiblemente dio lugar al primero. Esta información, no es muy confiable, ya que solamente existe un estudio al respecto (Kennedy, 1966).

De Endostilo a Glándula Tiroides

En el Phylum Chordata, excepto en Hemichordata, todos los organismos presentan ya sea endostilo o glándula tiroides. Inclusive en Agnatha, ontogénicamente el endostilo de la fase larvaria da lugar a la glándula tiroides de la vida adulta. Estos hechos representan por el momento la evidencia más sólida para considerar que efectivamente el endostilo es un primordio de la glándula tiroides (Clements-Merlini, 1962; Barrington, 1975; Gorbman, 1978; Young, 1981).

Sin embargo, ya se ha mencionado que organismos de líneas evolutivas distintas a la de los cordados vgr., artrópodos, son capaces de fijar y organificar yodo. Este hecho sugeriría que el yodo puede estar participando de alguna manera en la fisiología del organismo, ya sea como tironinas, o por sí solo (Gorbman, 1955).

Aunque no exista evidencia contundente para comprobar que el endostilo efectivamente da lugar a la glándula tiroides, a continuación se revisaran los cambios que ocurren en este órgano a lo largo de la filogenia y su transformación en glándula tiroides.

Urochordata y Cephalochordata. En ambos subphylums, el endostilo cumple la misma función secretora de moco y atrapadora de yodo. También en ambos se han identificado MIT, DIT, T₃ y T₄ en la luz del endostilo. La única diferencia que se conoce, consiste en

que cefalochordata no presenta la hilera de células secretoras que corresponden a la zona 6 (Barrington, 1959).

Agnatha. La larva amoceta pertenece al primer grupo de cordados verdaderos y sufre una metamorfosis transformándose en su vida adulta en lamprea. Esta larva posee un endostilo que aparece en el desarrollo temprano como dos órganos hendidos que se extienden del primero al quinto arco branquial y están separados por un septo medio. El lumen del endostilo se encuentra abierto hacia la faringe por el ducto hipobranquial y es este ducto el que se cierra en la metamorfosis. Se han diferenciado seis tipos de células en este endostilo, y únicamente dos de estos tipos se consideran homólogos a las células epiteliales foliculares de la tiroides: las células de las zonas 7 y 8. El resto de las zonas celulares se degenera durante la metamorfosis. Por lo que respecta a la fase larvaria, se ha propuesto que el endostilo únicamente sea un órgano primitivo de alimentación con función secretora de moco. En contraste, en el animal adulto, el órgano se reconoce desde el punto de vista morfofuncional como una glándula tiroides verdadera y se considera que de ser un órgano exócrino relacionado con la alimentación, pasa a ser una glándula de secreción interna (Clements-Merlini, 1962a,b; Fujita, 1980; Hoar, 1979; Young, 1981).

En la lamprea adulta y en todos los cordados superiores, las yodoproteínas sintetizadas en las células tiroideas son vertidas al torrente sanguíneo, y se conoce que su síntesis y secreción es

controlada por señales específicas de naturaleza neuroendócrina que se describen más adelante. Es decir, a partir de la lamprea adulta existe una glándula tiroides totalmente endócrina (Hoar, 1979).

Evolución de la Glándula y de la Función Tiroidea

Existen dos teorías importantes que tratan de explicar la evolución de la glándula tiroides. La teoría elaborada por Gorbman (1955), propone los cambios que debieron haber ocurrido para que surgiera la glándula tiroides y la teoría propuesta por Etkin (1978), quien trata de explicar la evolución de la función tiroidea. Como se verá a continuación, ambas teorías son complementarias.

Evolución de la Glándula. Gorbman parte del hecho de que en los anélidos, moluscos y artrópodos se han encontrado yodoproteínas en o muy cerca de la boca o cavidad faríngea. Este investigador propone la siguiente secuencia evolutiva para explicar el desarrollo de la glándula tiroides:

- Las yodoproteínas de la cavidad bucal o faríngea fueron arrastradas o "lavadas" hacia el tracto digestivo.
- La T_4 liberada por hidrólisis durante la digestión intestinal pudo involucrarse en actividades metabólicas de los precordados.
- Favorecidos por la evolución, los organismos desarrollaron

una fuente de iodoproteínas mas grande y segura, este sería el caso de los protocordados y de la larva amoceta, que presentan su fuente de yodoproteínas en el endostilo. En estos organismos, la liberación de T_4 seguiría ocurriendo por hidrólisis en el tubo digestivo.

- Al cerrarse el ducto endostilar de la lamprea adulta y transformarse el endostilo en glándula tiroidea, se elimina la dependencia de enzimas digestivas para liberar a las hormonas tiroideas. Esto se debe a que las células que forman las iodoproteínas también proveen la proteasa que permite que la hormona se difunda a la sangre.

Evolución de la Función Tiroidea. Por otro lado, Etkin desarrolla una teoría que pretende explicar la diversidad de funciones que exhiben las yodotironinas en los diferentes vertebrados. El propone lo siguiente:

- La glándula tiroidea se originó a partir de alguno de los diversos tejidos de prevertebrados ancestrales que presentaban la capacidad de concentrar yodo del agua de mar y almacenarlo en una biomolécula: la T_4 .
- El yodo participaba de alguna manera en el metabolismo de dichos organismos, probablemente como micronutriente.
- Al surgir los primeros vertebrados de agua dulce, se requirió de un órgano especializado que concentrara,

almacenara y asegurara un suministro de yodo al organismo.

- La persistencia de la glándula tiroides en todos los vertebrados se puede entender en función del papel metabólico del yodo y de su molécula acarreadora, la T₄. Su persistencia la hizo accesible como "señal" cuando surgió la necesidad de un regulador químico en la evolución de los vertebrados.

Así pues, cuando surgió la homeotermia en los mamíferos, las moléculas tiroideas se coaptaron para participar en la regulación de los cambios en la producción de calor. Cuando los anfibios desarrollaron su proceso de metamorfosis, la T₄ se utilizó como señal reguladora del proceso. La misma molécula se adaptó en varias líneas de la evolución de los vertebrados para ayudar a regular otros procesos fisiológicos relacionados a migraciones estacionales y reproducción.

Estas teorías pueden orientarnos acerca de la posible evolución morfofuncional de la glándula tiroides, pero una vez más es importante destacar que los experimentos que dieron lugar a ellas datan de hace más de veinte años. Sería interesante retomarlos con metodología actualizada, y obtener información más específica que permita entender mejor la evolución de la glándula.

LA GLANDULA TIROIDES

Aspectos Morfofuncionales

Desarrollo de la Glándula Tiroides. La glándula tiroides se origina a partir de la formación de un botón ventral en el piso de la faringe embrionaria, entre el primer y segundo saco branquial. Inicialmente, la glándula se diferencia formando cordones celulares que después se separan para formar grupos de células que formaran los folículos tiroideos. Estos grupos celulares secretan un fluido protéico denominado "coloide", que se acumula extracelularmente en el centro de los folículos tiroideos. Esta actividad secretora eventualmente da lugar a un espacio lleno de coloide; el "lumen" del folículo, que queda rodeado de una capa de células epiteliales, o sea, el epitelio del folículo. La porción de la célula folicular que tiene contacto con el lumen se conoce como parte apical, este extremo de la célula presenta microvellosidades. El núcleo se encuentra generalmente en la parte "basal" de la célula, que es el extremo más alejado del lumen (Malacara y col, 1979; Flores y Cabeza, 1984). Así pues, la glándula tiroides esta formada por un gran numero de folículos encapsulados en tejido conectivo y con una red capilar muy densa que rodea al folículo (Norris, 1980).

El folículo es la unidad estructural y funcional de la glándula tiroides. Como ya se mencionó, éste último incluye una capa de epitelio simple que reviste a una cavidad que está llena de un

material espeso llamado coloide. El coloide representa la reserva de la secreción de las células epiteliales y contiene mucoproteínas, enzimas y tiroglobulina. Esta última es una glucoproteína que sirve de soporte para la síntesis y almacenamiento de las HT, lo cual será tratado más adelante (Malacara y col, 1979; Norris, 1980; Flores y Cabeza, 1984).

Variaciones Morfológicas

Se sabe que básicamente la glándula tiroides opera de la misma manera en todos los vertebrados, y que su origen, estructura y función es muy similar en todos los organismos que la poseen. Sin embargo, existen diferencias en la forma en que se agregan los folículos tiroideos. Estas diferencias morfológicas se encuentran ilustradas en la figura 2.

Además de la forma de agregación folicular, es importante hacer notar una diferencia estructural peculiar que solamente se presenta en la glándula tiroides de los mamíferos. En las regiones interfoliculares se encuentran unas células llamadas parafoliculares o células "C", que son secretoras de calcitonina, hormona que participa en la regulación del metabolismo del calcio. En el resto de los vertebrados, esta hormona se sintetiza en una glándula separada conocida con el nombre de cuerpo ultimobranquial (Barrington, 1975; Norris, 1980; Young, 1981).

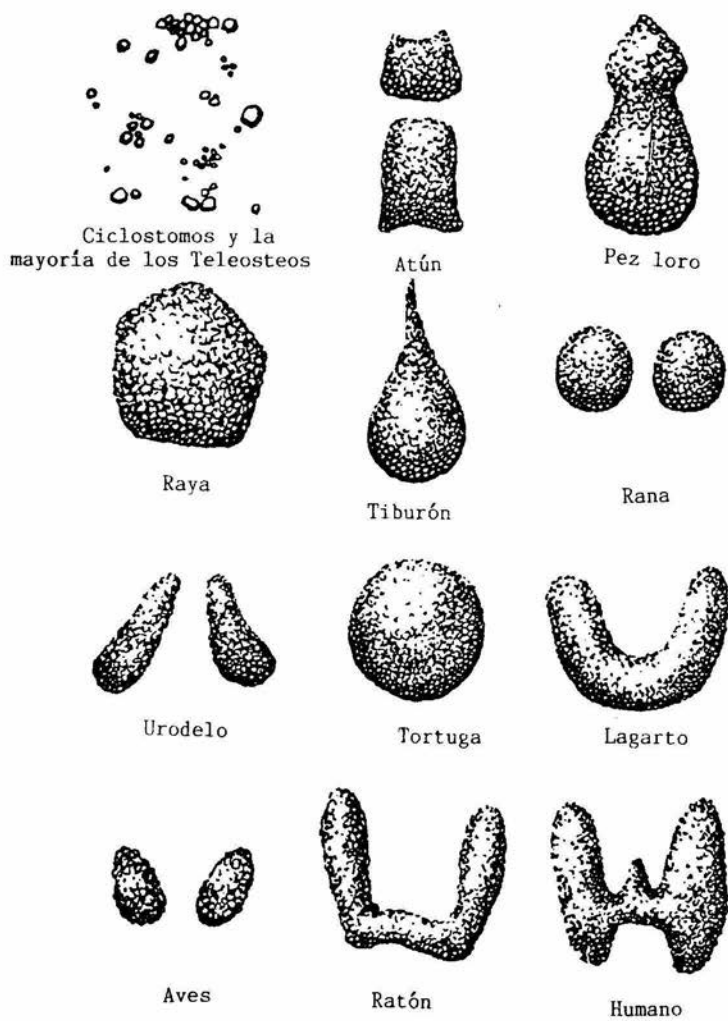


Figura 2. Morfología de la glándula tiroidea en diferentes grupos de vertebrados.

LAS HORMONAS TIROIDEAS

Biosíntesis y Secreción

Como ya se menciona, la biosíntesis de las HT depende primordialmente del aporte dietético de yodo y por lo tanto, el primer paso para su síntesis consiste en la captación o transporte de yodo al interior de la célula folicular tiroidea. Este transporte constituye un proceso activo y está mediado por un mecanismo energético denominado genéricamente bomba de yodo (De Groot y Taurog, 1979; Guyton, 1984).

Una vez en el interior de la célula tiroidea, el yoduro, que es la forma "inorgánica" del yodo, es convertido por acción de las peroxidases tiroideas en "yodino", una forma reactiva capaz de "yodar" los residuos de tirosina que están presentes en la tiroglobulina. Esta glucoproteína de peso molecular elevado (660, 000 daltons) está formada por 5,650 aminoácidos, de los cuales aproximadamente 125 corresponden a tirosina. En estos residuos se lleva a cabo la yodación para producir monoyodotirosina, precursor necesario para la diyodotirosina. A partir de estas yodotirosinas sin acción biológica aparente, se forman las yodotironinas (T_3 y T_4). La síntesis de las yodotironinas está mediada por la acción de enzimas acopladoras que unen dos diyodotirosinas para formar tiroxina, o una

diyodotirosina con una monoyodotirosina para formar triyodotironina (De Groot y Tautog, 1979; Taurog, 1979; Lehman, 1982; Valverde-R y Col, 1989).

Las HT biológicamente activas T_3 y T_4 se liberan de la tiroglobulina por proteólisis. Las vellosidades de la parte apical de la célula folicular toman, por endocitosis, porciones de coloide y lo introducen a su interior en donde se une a lisosomas que contienen enzimas proteolíticas. Estas vacuolas lisosomales transportan el coloide hacia la parte basal de la célula y los productos de la proteólisis - yodotironinas y tiroglobulina - son secretados por exocitosis hacia la circulación sanguínea (De Groot y Taurog, 1979).

Transporte y Metabolismo

Las hormonas tiroideas no circulan libres en la sangre, sino que lo hacen "unidas" a proteínas transportadoras. En los vertebrados se conoce que estas proteínas son: la globulina transportadora de HT (TBG), la prealbúmina (TBPA), la albúmina (ALB) y la postalbúmina (POSTALB). Estas proteínas enlazan a las hormonas tiroideas de manera que sólo una pequeña fracción (0.018 - 0.016 %) de la cantidad total secretada queda libre. En humanos, la proteína con mayor afinidad para T_3 y T_4 es la TBG, la cual une entre el 55 y el 60 %, mientras que la TBPA y la ALB unen entre el 25 al 30% y el 10 % respectivamente (Robbins, 1978; Robbins y Bartalena, 1986).

Las HT unidas a proteínas son metabólicamente inactivas y se considera que constituyen una fuente de almacenamiento. La vida media de la T_4 circulante en el hombre es de 6 a 7 días, mientras que la de la T_3 es más corta (2 días). Esta diferencia es secundaria a la distinta afinidad que las proteínas transportadoras tienen para una y otra tironina (Robbins y Bartalena, 1986).

El metabolismo de las HT comprende principalmente tres acciones enzimáticas específicas: a), la desaminación oxidativa de su cadena lateral; b), la conjugación con sulfato o glucoronato que tiene lugar en su mayor parte en el hígado, pasando los metabolitos a la bilis e intestino en donde unos son rehidrolizados a T_4 y T_3 y reabsorbidos, eliminándose sólo una pequeña fracción por heces fecales; c), la desyodación secuencial en ambos anillos (Chopra y col, 1978; Valverde-R y col, 1989).

En los últimos años se ha reconocido que la monodesyodación tisular de T_4 representa la principal fuente de T_3 endógena (aproximadamente 75% del total), y que esta desyodación puede dar lugar a la "formación" de una molécula de T_3 biológicamente activa, o bien, a una molécula de T_3 inerte desde el punto de vista metabólico, conocida con el nombre de triyodotironina reversa (rT_3). Este mecanismo peculiar de biotransformación periférica es órgano-específico y selectivo, según ocurra en el carbono 5' o 5 de los anillos tirosilo o fenilo respectivamente (Chopra y col, 1978; Engler y Burger, 1984).

Acciones y Efectos

Actualmente se reconoce que los numerosos y variados efectos biológicos de las HT se producen primordialmente por estimulación de la síntesis proteica. Se sabe que en el núcleo celular existen proteínas específicas no histona que enlazan selectivamente a las HT. Estas proteínas están íntimamente asociadas con el DNA nuclear, y la unión de las HT a su "receptor" nuclear es una señal para activar la DNA polimerasa e iniciar la transcripción de segmentos específicos del "templado" del DNA, a través de la síntesis y liberación del RNA mensajero específico. La traducción de éste en los ribosomas, aumenta la síntesis de diversas proteínas estructurales y funcionales que son responsables de los efectos finales observados (Baxter y Funder, 1979; De Groot, 1979; Tata, 1980; Oppenheimer y col, 1987).

En los organismos adultos, la principal acción de las HT resulta de su efecto calorigénico el cual se debe a un aumento en la tasa basal del metabolismo. Existen varias teorías sobre este efecto y su mecanismo de acción: una postula que las HT aceleran la reacción secuencial de la fosforilación oxidativa mitocondrial, permitiendo así la generación de niveles elevados de ATP. Otra hipótesis sugiere que las HT estimulan la ATPasa de la membrana celular, produciendo liberación de calor y disipando los enlaces de fosfato de alta energía. También es probable que

el efecto calorigénico de las HT sea otra expresión final de la mencionada estimulación de la síntesis proteica (Sterling y Lazarus, 1977; Oppenheimer, 1987).

Es a través de estos mecanismos de acción como las HT intervienen en prácticamente todas las funciones del organismo; vgr., la regulación del metabolismo energético, la reproducción y lactancia, la hematopoyesis, la actividad del sistema nervioso central, el metabolismo hidroeléctrico y de vitaminas, la función hipofisiaria, etc. Es decir, se sabe que para mantener normales todas las funciones orgánicas se requieren concentraciones intracelulares suficientes y adecuadas de hormonas tiroideas (Tata, 1980).

Control de la Función Tiroidea

El sistema que regula la síntesis y la secreción de las HT es complejo y comprende dos mecanismos de naturaleza diferente. Por un lado, el aporte dietético de yodo que a nivel de las células tiroideas interviene autorregulando la síntesis y secreción de yodotironinas con actividad hormonal. Por otra parte, existe un elaborado sistema de "señales" neuroendócrinas que en forma secuencial regulan y controlan la función de la glándula tiroidea. Esta cascada de señales se origina en el sistema nervioso central (SNC). En el hipotálamo existe una área tirotrópica, en donde se sintetiza un péptido denominado TRH o hormona liberadora de tirotropina, Esta neurohormona, como su

nombre lo indica, estimula a nivel hipofisiario la síntesis y liberación de la tirotrópina. La tirotrópina, hormona estimulante de la tiroides o TSH, es una glucoproteína sintetizada y secretada en la adenohipofisis por las células especializadas llamadas tirotrópos, las cuales constituyen aproximadamente el 5% de la glándula hipofisis. Esta hormona hipofisiaria estimula a las células foliculares de la glándula tiroides para que sintetizen y secreten HT (Sterling y Lazaruz, 1977; De Groot, 1979; Valverde-R, 1983).

Por otro lado, este mecanismo de control neuroendócrino se autorregula de la siguiente manera: cuando los niveles circulantes y la proporción tisular de T_3 y T_4 son elevadas, se suprime o disminuye la secreción de TSH. Esta inhibición de la producción y secreción de TSH hipofisiaria está mediada por la síntesis, a nivel de los tirotrópos, de una proteína que "bloquea" el efecto estimulante del TRH. Este mecanismo de inhibición recibe el nombre de retroalimentación negativa. Al contrario de lo anterior, cuando los niveles circulantes y la concentración intracelular de T_3 y T_4 son bajos, se estimula la secreción de TSH (retroalimentación positiva). Es evidente que en este sistema de regulación y control neurohumoral, los tirotrópos hipofisiarios están sujetos a dos estímulos antagónicos: uno positivo, que está dado por la TRH y que induce la síntesis y liberación de la TSH, y otro negativo o inhibitorio, que está dado por la concentración de HT que

bloquean la liberación de TSH (Sterling y Lazaruz, 1977; De Groot, 1979; Hoar, 1979; Valverde-R, 1983).

En esta forma, el sistema controla rigurosamente la cantidad de TSH liberada por la hipófisis. Este control está mediado primordialmente por la variable regulada por el sistema; es decir por las concentraciones de HT, ya que la cantidad de TSH secretada se ajusta a la señal o retroalimentación que le dan al propio tirotripo, las concentraciones y/o ocupación de sus receptores nucleares por las HT. Se piensa que el mecanismo negativo está dado por las HT que estimulan en el tirotripo la síntesis de una proteína que bloquea la liberación de TSH inducida por la TRH. No se sabe si las HT también regulan la secreción de TSH por un efecto sobre el hipotálamo, y si este efecto hipotalámico es inhibitorio (Sterling y Lazaruz, 1977; De Groot, 1979; Valverde-R, 1983).

II. HORMONAS TIROIDEAS EN TELEOSTEOS

Tomando en cuenta la dificultad que presenta el trabajo de laboratorio con peces, así como los diseños y las manipulaciones experimentales utilizadas por la mayoría de los investigadores en este campo, es importante señalar que la interpretación de los resultados obtenidos hasta la fecha debe hacerse con cautela, evitando particularmente establecer conclusiones generalizadas. Esta aclaración resulta aun más pertinente, si se toma en cuenta que en estos vertebrados existe, además, una gran diversidad de especies así como de habitats y condiciones medioambientales.

Este capítulo se dividirá en tres secciones principales: 1), las proteínas transportadoras de las HT en peces, enfatizando las diferencias que presenta esta familia con respecto al resto de vertebrados; 2), las acciones de las HT en salmones, especies a partir de las cuales se empezó a dar importancia al estudio de las HT en peces debido a su participación aparente en las migraciones reproductivas de estos organismos, y por último, 3), la información referente a algunas funciones de las HT en la trucha arco iris, que es la especie de salmónido en la que se llevó a cabo la presente tesis.

Proteínas Transportadoras de HT en peces

Se mencionó en el capítulo anterior que en el suero del hombre se han identificado tres proteínas transportadoras: la globulina transportadora de HT (TBG), la albúmina (ALB) y la prealbúmina (TBPA). Estos datos sólo son correctos para el hombre y algunos mamíferos, pues se encuentran diferencias en la afinidad de las proteínas y las proteínas mismas en el resto de los vertebrados que poseen glándula tiroidea (peces, anfibios, reptiles y aves) (Yuichi y col, 1969; Refetoff y col, 1970).

En el caso particular de los peces, se conoce que también existen tres proteínas transportadoras: La TBPA, la ALB y la postalbúmina (PALB). Es importante hacer notar la total ausencia de la TBG. En cuanto a la afinidad de estas proteínas a HT, se ha observado que la unión es poco estable y muy débil (Refetoff, 1970). La ALB es la proteína con mayor afinidad a T_4 , uniendo entre el 40 y el 60% de esta hormona, según la especie de pez. La TBPA une entre el 15 y el 20% de T_4 y la PALB une también alrededor del 20% (Yuichi et al, 1969).

Hormonas Tiroideas en Salmónidos

Esmoltificación, Migración y Reproducción. Los salmones son especies anadromas que efectúan dos migraciones durante su ciclo de vida. La primera ocurre durante la primavera, alrededor de los 18 meses de edad, cuando el pez nada río abajo hacia el mar para habitar ahí durante su vida adulta. El salmón sufre cambios

morfológicos, fisiológicos y conductuales que lo van a preparar para la vida marina; el conjunto de estos cambios se conocen con el nombre genérico de "esmoltoficación". El pez puede sobrevivir en el medio marino únicamente cuando ha culminado su esmoltoficación. La segunda migración tiene lugar después de los 18-24 meses de vida en el mar cuando los salmones adultos se dirigen y migran al agua dulce para reproducirse. El pez, además de culminar su maduración sexual al entrar al agua dulce, también sufre varios cambios morfológicos y fisiológicos que le van a permitir la sobrevivencia en este medio (Hoar, 1979; Sower & Schreck, 1982).

Como se resume en el cuadro 1, existe alguna información experimental que sugiere la participación de las HT en ambas migraciones, estimulando el proceso de esmoltoficación en la primera y participando en la maduración sexual durante la segunda. Se piensa que las HT son la "señal" endógena que inicia ambas migraciones (Graw et al, 1981).

Durante la esmoltoficación se ha observado que las concentraciones de T_4 circulante aumentan en forma sostenida y progresiva en el curso de cinco semanas. La magnitud de este incremento es muy variable según el estudio de que se trate, y es probable que esta dispersión en los valores informados obedezca al empleo de radioinmunoanálisis homólogos o de estuches comerciales en los diferentes estudios (ver cuadro 1). Este incremento de T_4 que antecede y acompaña al proceso de

esmoltificación se ha interpretado como indicativo de que las HT participan en el crecimiento y desarrollo del pez (Dickhoff et al, 1978; Sower et al, 1984). Se ha propuesto que dicho incremento, prepara y facilita la adaptación del organismo al cambio hidrosmótico ya que en forma simultánea ocurre un aumento en la actividad de la bomba de $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -dependiente de ATPasa a nivel de las branquias (Folmar & Dickhoff, 1979).

El hecho de que la elevación sostenida de T_4 esté asociada al ciclo lunar ha llevado a proponer que dicho ciclo representa el principal evento o señal medioambiental que sincroniza el desarrollo y sobrevivencia del individuo. Se sabe que la ausencia de este incremento de T_4 se asocia a hipodesarrollo y/o a la muerte del organismo (Dickhoff et al, 1978; Graw et al, 1981).

Durante la migración asociada a la reproducción, en ambos sexos ocurre un aumento transitorio y significativo de T_3 y de T_4 (Sower & Schreck, 1982; Biddiscombe & Idler, 1983). Posteriormente, cuando el animal entra al agua dulce, ocurre otro incremento que alcanza niveles muy elevados, y que en las hembras decrece paulatinamente conforme progresa la maduración de gametos y hasta el desove. Los machos exhiben un incremento en los niveles de la hormona antes de la espermiación. Estos hechos se han interpretado como parte de los mecanismos metabólicos y osmorregulatorios que permiten la adaptación del animal al agua dulce, y que influyen en los procesos de maduración gonadal del

salmon (Sower & Schreck, 1982). El incremento de T_4 que precede a la espermiación en los machos parece participar en la misma (Biddiscombe & Idler, 1983). No se puede descartar la posibilidad de que el decremento de T_3 y T_4 en la madurez sexual avanzada pueda ser secundaria a una disminución de la estimulación de TSH (Biddiscombe & Idler, 1983).

Se ha encontrado también la participación de otras hormonas en las migraciones de los salmones, principalmente en la reproductiva. Se sabe que la prolactina (PRL) alcanza niveles muy elevados algunas semanas antes de iniciarse la migración, y se le ha atribuido un papel en la regulación hidroosmótica del animal (Lam, 1972). También se sabe que el estradiol presenta las mismas oscilaciones que la T_4 durante esta migración, y se piensa que la hormona afecta la percepción sensorial de manera que el pez se sensibiliza a estímulos externos que influyen sobre los procesos de migración y/o esmoltificación. El estradiol también está estrechamente relacionado en la maduración de los gametos (Sower et al, 1984).

CUADRO I. NIVELES CIRCULANTES DE HT DURANTE LA ESMOLTIFICACION Y MIGRACION EN SALMONIDOS

ESPECIE	ESMOLTIFICACION	MIGRACION
	<p>▲ sostenido y progresivo de T₄, sin cronizado por la luna nueva:</p> <p>18 a 117.4 nmol/l</p> <p>10.3 a 77.4 nmol/l</p> <p>6.5 a 43.9 nmol/l</p>	<p>▲ premigratorio de T₄.</p>
Oncorhynchus kisutch		<p>▲ T₄ al entrar al agua dulce:</p> <p>2.9 a 6.5 nmol/l</p>
Oncorhynchus nerka		<p>▲ ambas hormonas al entrar al agua dulce:</p> <p>T₃, 1.4 a 10.8 nmol/l</p> <p>T₄, 7.7 a 25.8 nmol/l</p>

Datos originales tomados de: Dickhoff et al, 1978; Graw et al, 1981; Sower & Schreck, 1982; Biddiscombe & Idler, 1984 y Sower et al, 1984.

Hormonas Tiroideas en *Salmo gairdneri*

Ritmos Estacionales de HT. En esta especie no migratoria y utilizando procedimientos de cromatografía de gas (Osborn et al, 1978), se ha encontrado un incremento en las concentraciones de T₃ y T₄ durante el otoño, alcanzando su valor más elevado en noviembre, justo en el periodo de desarrollo gonadal rápido. Sin embargo este aumento no se encontró relacionado funcionalmente a la maduración gonadal. Al mismo tiempo, se observó una baja en

la relación T_4 / T_3 . Estas observaciones se han interpretado como sugestivas de una disminución en la utilización periférica o degradación hepática de T_4 . En este mismo estudio los niveles hormonales se elevaron para alcanzar un segundo valor máximo en abril (primavera), pero la relación T_4 / T_3 no presentó cambios. Esto sugiere un aumento en la tasa de secreción de la tiroides en esta época. La caída brusca de los niveles de T_3 y T_4 que se encuentra al final de la primavera y principios del verano indican otro cambio en el equilibrio entre la liberación de hormona por la glándula y su utilización periférica y degradación.

Se sugiere que en las temperaturas altas del verano se incrementa el consumo de HT, y que éste se compensa con un aumento en la actividad de la glándula (Osborn et al, 1978).

Ritmo Circadiano de HT. Se ha encontrado que durante el ayuno no se presenta ningún ritmo diario en las concentraciones plasmáticas de T_3 y T_4 (Brown et al, 1978). En contraste, durante la alimentación ad libitum se ha encontrado un ritmo diario en donde los niveles más altos ocurren entre las 09:00 y 13:00 hrs, y los más bajos entre las 05:00 y 19:00 hrs. Parece ser que esta elevación de T_3 y T_4 puede representar un ritmo endógeno circádico que únicamente se manifiesta en peces alimentados sin ser influenciado por otros factores medioambientales (Eales et al, 1981).

También se encontró que los niveles de T_3 y T_4 son más elevados durante el periodo de luz que en el de oscuridad (Eales et al, 1981).

Áyuno y HI. Se ha encontrado que el ayuno influye sobre la función tiroidea en teleosteos (Eales, 1979). Se ha observado que tanto el ayuno corto (3 días), como el largo (12 a 37 días) deprime los niveles plasmáticos de T_3 (Eales et al, 1981), y que también deprime la velocidad de depuración o recambio (MRC) y la tasa de degradación (DR) de T_3 y T_4 , así como la tasa de conversión extratiroidea de T_4 a T_3 radioactiva, lo cual se asocia a la supresión de la función de la tiroides (Eales, 1979; Higgs & Eales, 1977 y 1979).

Después de proporcionar alimento aumenta la concentración de T_4 plasmática. Se ha sugerido que este aumento tal vez sea secundario a un incremento en la liberación de T_4 por la glándula tiroides, la cual sería estimulada por propiedades físicas o químicas del alimento ingerido, o por un cambio en el comportamiento y actividad asociado a la alimentación. En otras palabras, la depresión de T_4 que ocurre durante el ayuno crónico puede ser afectada temporalmente por una sola comida, la cual por algún mecanismo aún no bien precisado promueve la liberación de T_4 a la sangre. Esto se acompaña de un incremento en la conversión de T_4 a T_3 , lo cual puede depender de la cantidad de alimento presentado (Flood & Eales, 1983).

Temperatura y HT. A juzgar por los niveles circulantes de T_4 , se ha encontrado que el sistema tiroideo no exhibe ninguna respuesta a los cambios de temperatura. Sin embargo, sí se han encontrado que la tasa de degradación de la T_4 incrementa a mayores temperaturas. Este fenómeno se explica de la siguiente manera: al aumentar la temperatura, se produce ya sea un decremento en la afinidad de las proteínas plasmáticas a T_4 y/o una alteración en la unión de los sitios receptores para T_4 en el tejido. Esto permitiría que la hormona penetrara a los tejidos con más facilidad y podría intercambiarse libremente con la poza (pool) de T_4 plasmática. Se piensa también que el sistema tiroideo participa en la aclimatación / tolerancia de la temperatura en algunos teleosteos, aunque dicha participación necesita ser bien estudiada (Eales et al, 1982).

Triyodotironina Reversa. Utilizando un RIA de estuche comercial y otro en columna de Sephadex, se ha reportado que la trucha arcoiris presenta concentraciones de rT_3 menores de 40 pg/ml. Debido a la mala reproducibilidad de su técnica, el autor comenta que probablemente la trucha presente cantidades no detectables de esta hormona. A diferencia de otros organismos superiores, en la trucha no hay evidencia de conversión de T_4 a rT_3 , pero sí se encuentra una gran conversión a T_3 . En estos organismos el reciclaje del yodo por la glándula tiroides es menor del 5% (Eales et al, 1983).

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA EXPERIMENTAL

Propósitos y Objetivos de la Tesis

Como se puede apreciar, la información referente al metabolismo y fisiología de las HT en peces es escasa y fragmentada. Llama particularmente la atención dos hechos: 1), que no exista, hasta donde sabemos, un análisis documentado de los cambios ontogénicos en los niveles de HT en trucha arcoiris y 2), la heterogeneidad en la metodología analítica que se utiliza en los diversos estudios reportados. En México no existe información o estudios en especies locales ni en especies introducidas. Por esta razón y como parte de un proyecto mas amplio encaminado a propiciar el desarrollo de la endocrinología comparada en nuestro país, esta tesis se diseñó para alcanzar los siguientes objetivos:

- Estandarizar la técnica de radioinmunoanálisis (RIA) homólogo para cuantificar los niveles circulantes de HT, principalmente T_3 y T_4 en *Salmo gairdneri*.

- Establecer en forma preliminar los valores de referencia de estas hormonas en *Salmo gairdneri* y analizar los cambios que exhiben a través de un periodo de su ontogenia.

Se piensa trabajar principalmente con este salmónido debido a que es una especie que se cultiva y consecuentemente es accesible. También es importante destacar que es una de las pocas especies que a la fecha se han estudiado en otros países, lo cual permite contar con información de referencia para la iniciación de este estudio.

Es evidente que la satisfacción de los objetivos que esta tesis se ha fijado, permitirá disponer de una técnica o "herramienta" analítica reproducible y confiable con la que se podrán realizar estudios experimentales encaminados a conocer el posible papel que estas hormonas juegan en algunos aspectos de la fisiología de estos organismos. Por esta razón, a continuación se revisarán, en forma resumida, los principios y fundamentos de la metodología que se desarrollará en la presente tesis.

Importancia del Radioinmunoanálisis

El radioinmunoanálisis (RIA) es una herramienta analítica de gran importancia para comprender la fisiología endócrina, ya que permite medir la concentración de prácticamente todas las hormonas conocidas. El RIA es una técnica muy sensible que permite detectar cantidades muy pequeñas de estas sustancias,

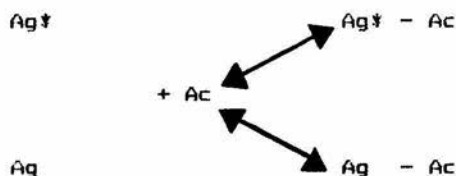
También de ser reproducible y confiable. Sus aplicaciones, que inicialmente estuvieron limitadas a la medición de solo unas cuantas hormonas polipeptídicas naturalmente antigenicas, se ha extendido a un número grande de substancias de interes biológico y médico, incluyendo hormonas, vitaminas, antibióticos y algunas otras drogas (Yallow & Berson, 1959; Ekins, 1974; Yallow, 1980).

Fundamentos del Radioinmunoanálisis

El RIA es una tecnica de análisis fisicoquímico que deriva del análisis por saturación establecido por Ekins en 1960. El termino radioinmunoanálisis o radioinmunoensayo se aplica para referirse a las técnicas que utilizan anticuerpos como proteínas receptoras.

El principio fundamental del RIA está regido por la ley de acción de masas, y se basa en la reactividad entre un anticuerpo (Ac) o molécula "saturable" y un antígeno (Ag) o "ligando". La concentración del Ac que se mantiene fija en el sistema, limita el número de sitios de acoplamiento por los cuales compiten fisicoquímicamente: el antígeno radioactivo (también en concentración limitada y escasa) y el antígeno no radioactivo, que se agrega en cantidades conocidas (estandares), o bien en cantidades variables en las muestras problema. A medida que se incrementa la masa del antígeno no radioactivo en el sistema, disminuye la posibilidad de que el antígeno radioactivo se "una" al anticuerpo. Esta "competencia" por el número limitado de

El sitio de unión del Ac se manifiesta por una menor radioactividad detectada en la fracción unida al anticuerpo, la cual es inversamente proporcional a la concentración del antígeno no radioactivo. Esto se puede expresar con la reacción de competencia:



En donde Ag^* = antígeno marcado (hormona o sustancia radioactiva); Ag = antígeno no marcado (hormona usada como estándar o problema a medir); Ac = anticuerpo receptor; $\text{Ag}^* - \text{Ac}$ y $\text{Ag} - \text{Ac}$ = complejo antígeno-anticuerpo radioactivo y no radioactivo respectivamente.

En esta reacción se deben hacer notar los siguientes aspectos:

1. La cantidad del antígeno en concentraciones desconocidas puede determinarse, debido a que las moléculas del antígeno radioactivo (Ag^*), compiten con las del antígeno no marcado (Ag); es decir, con los estándares o los problemas, por los sitios limitados de unión que ofrecen los anticuerpos (Ac) en el sistema.
2. El ensayo requiere que el comportamiento entre el antígeno en concentraciones desconocidas o "problema" y el antígeno estándar sea semejante. Es decir, que ambos sean

igualmente capaces de desplazar a los Ag^* de los complejos Ag^*-Ac .

3. Los reactantes Ag^* y Ac se agregan en cantidad fija. El Ag se agrega en concentraciones conocidas y variables (estándares) y en concentraciones por determinar, como es el caso de las muestras problema. La reacción debe proceder en condiciones óptimas para que la unión sea estable. Estas generalmente son: temperatura de $4^{\circ}C$ y pH neutro. La dilución final del Ac debe unir entre el 30 a 50% del Ag^* en ausencia del Ag .
4. Después de la incubación de los tres componentes (Ag^* , Ag , Ac), es indispensable separar las fracciones $Ag-Ac$ y Ag^*-Ac del Ag y Ag^* para así medir la radioactividad de la fracción unida (U) al Ac , o bien aquella en forma libre (L), o ambas. En esta forma se elabora una curva dosis-respuesta con los resultados obtenidos a partir de los estándares. La separación de la fracción unida al Ac ($Ag^*-Ac + Ag-Ac$), de la no unida ($Ag^* + Ag$) es crítica y de fundamental importancia. Esta se logra por procedimientos específicos.
5. La proporción resultante de la radioactividad unida entre la radioactividad total (U / T), presentará dentro de cierto intervalo, una relación proporcional "dosis-respuesta" respecto a la concentración del antígeno

estándar. Esta relación equimolar permitirá construir gráficas e interpolar a estas las proporciones U / T observadas en los problemas y calcular así la concentración de antígeno o sustancia a determinar.

Requisitos del Radioinmunoanálisis

1. Para el desarrollo de un procedimiento de RIA se requiere disponer de un Ag* altamente purificado, que conserve sus propiedades inmunológicas. Las hormonas marcadas isotópicamente deberán ser tan puras como sea posible y de suficiente actividad específica (a.e. = radioactividad / masa), para que sea detectable y contenga el mínimo de masa (generalmente entre 6,000 a 20,000 cuentas por minuto y menos de 100 pg / tubo, según la eficiencia del detector).
2. Es necesario producir y disponer de un antisuero adecuado. Los anticuerpos utilizados deben ser específicos para la molécula que se pretende medir. La concentración óptima o título del anticuerpo se determina por un ensayo específico, en el que se mide la proporción de unión del antígeno radioactivo al anticuerpo en varias diluciones. La dilución donde el 30 a 50% del Ag* se une al Ac (U / L = 1) es la más apropiada.
3. Es indispensable estandarizar un método adecuado para la rápida y completa separación del Ag* unido al Ac, de aquel

que se encuentra libre, de tal forma que la radioactividad de una o ambas fases pueda ser correctamente medida.

4. La confiabilidad del RIA requiere que tanto el Ag estándar como el de los problemas se encuentren en condiciones similares en el ensayo. Como el Ag estándar se prepara generalmente a partir de una sal, y el Ag problema según el ensayo, puede encontrarse en plasma, suero, orina, extractos de tejidos o de cultivos de células, es evidente que estas muestras problema contienen una cantidad de sustancias y componentes "extra", que pueden modificar de alguna manera los resultados. Por esta razón lo más conveniente es igualar o "semejar" las condiciones del Ag estándar y Ag problema.

Todo esto exige un estricto "control de calidad" que incluye los siguientes cinco criterios para valorar la confiabilidad y validez de los procedimientos de RIA (Ruiz-Juvera, 1976).

- **Precisión.** Es la capacidad del sistema para distinguir entre dos concentraciones de antígeno en cualquier posición de la curva estándar. Se valora cuantitativamente por medio del coeficiente de variación $CV = S / X$; en donde S= a la desviación estándar y X= al promedio de las mediciones.
- **Sensibilidad.** Es la cantidad más pequeña de antígeno no marcado que puede ser detectado. La sensibilidad máxima depende de la afinidad del anticuerpo. Es mayor a medida

que la concentración del antígeno marcado es insignificante y la del antígeno no marcado se aproxima a cero.

- **Especificidad.** Se define como el grado de interferencia creado por sustancias diferentes a la que se desea medir. La especificidad del anticuerpo es influida por la heterogeneidad del antisuero, la reactividad cruzada con antígenos similares o moléculas que puedan ocupar los sitios inmunoreactivos, y la interferencia de la reacción debida al bajo peso molecular del material que altera el medio o las condiciones de la reacción.
- **Exactitud.** Es el grado en el cual la medición de una sustancia coincide con el valor de la medición estándar. Para su evaluación se comparan los resultados obtenidos en un número (estadísticamente aceptable) de ensayos semejantes.
- **Reproducibilidad.** Se basa en la variación intra - ensayo e inter - ensayo observada en un número estadísticamente válido de ensayos.

IV. DISEÑO EXPERIMENTAL Y PROGRAMA DE TRABAJO

MATERIAL Y METODOS

Material Biológico

Las truchas arcoiris (Salmo gairdneri) utilizadas en este trabajo se obtuvieron de un criadero comercial (Walter Ruprich) de engorda ubicado en Malinalco, Estado de Mexico.

El estudio abarca desde la doceava semana hasta que los animales alcanzan la talla comercial (aproximadamente cuadragésima semana). Se sangraron 34 animales en total, divididos en grupos de 4 a 8 individuos seleccionados segun su peso, el cual varió de 80 a 300 g. El sangrado se efectuó por punción caudal, utilizando jeringas desechables de 5 ml. Se extrajeron entre 1 y 5 ml de sangre de cada pez, segun su talla. Además de registrar el peso vivo de cada animal (figura 3), en todos se determinó la longitud patrón. No se sexó a ningun organismo debido a que no se nos permitió sacrificar a los animales.

La sangre de cada individuo se dejó coagular a temperatura ambiente (4 a 5 horas). Se centrifugó a 2,500 rpm por 20

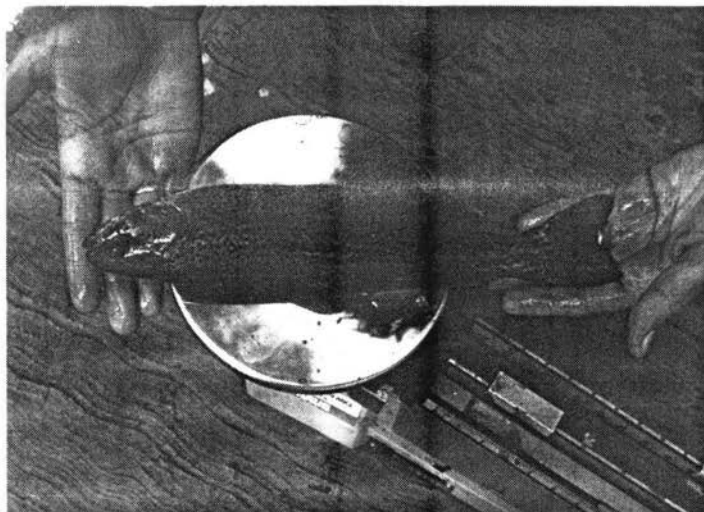


Figura 3. Se ilustra el registro del peso vivo del pez.



Figura 4. Se ilustra el método de sangrado por punción caudal.

minutos. Se recuperó el suero con pipetas Pasteur, se le agregó azida de sodio al 0.2% y se almacenó a - 70° C para realizar posteriormente las determinaciones hormonales.

Material de Vidriería y Equipo

Tubos de ensayo de 12 X 75 mm

Tubos de ensayo de 18 X 150 mm

Pipetas de 10, 5 y 1 ml

Matraces aforados de 100 ml

Probetas de 25 y 100 ml

Pipetas de micromedición (Beckton - Dickson) de 1 a 200 ul

Puntas de plástico para pipetas de micromedición

Jeringas de medición de 0.1 ml (Hamilton)

Micropipeta automática (Micromedic)

Agitador automático excéntrico (Vortex)

Agitador magnético con barra magnética

Vasos de precipitado de 100 y 250 ml

Centrífuga refrigerada

Contador de centelleo para radiaciones gamma (Packard)

Papel parafilm

Gradillas

Sales, Solventes y Reactivos

Tris (hidroximetil) aminometano (tris) R.A. Sigma

Tiroxina (sal sodica) Sigma

Triyodotironina (sal sodica) Sigma

Ácido 8 - anilino - 1 - naftalensulfónico (ANS) Sigma

Acido clorhídrico concentrado J T Baker

Carbón activado (Norit A) Sigma

Dextran, grado clinico (P.M. 83 300) Sigma

Alcohol etílico Merck

125 I - tiroxina New England Nuclear

125 I - triyodotironina New England Nuclear

Suero inmune anti - tiroxina (conejo)

Suero inmune anti - triyodotironina (conejo)

Suero de conejo

Suero de segundo anticuerpo. Radioassay Systems Laboratories Inc.

Soluciones

Solución amortiguadora Tris - HCL 0.05 M; pH 8.6 (Tris-HCL)

Solución madre de tiroxina (100 mg / 100 ml)

Solución madre de triyodotironina (10 mg / 100 ml)

Solución de 125 I - tiroxina

Solución de 125 I - triyodotironina

Solución de suero inmune de anti - tiroxina

Solución de suero inmune anti - triyodotironina

Solución de suero de segundo anticuerpo

Suspensión de carbón - dextran en Tris - HCL

PROTODCOS Y RESULTADOS PRELIMINARES

Estandarización del RIA de T₄

Al iniciar la presente tesis se pensaba trabajar con peces de agua salada (túnidos y serránidos principalmente), debido a la disponibilidad de suero de estas especies y al gran interés por estudiarlas. Al finalizar la estandarización del RIA para T₄, se inició el trabajo para T₃ y se encontró que no era satisfactorio el método habitual de separación (carbón - dextran) utilizado para T₄ en peces y otras especies animales. Por esta razón se decidió cambiar al método del segundo anticuerpo, y fue con este método de separación con el que se terminó de estandarizar el RIA de T₃. Sin embargo, para ese entonces el suero de las especies marinas se había agotado, por lo que se decidió realizar el estudio de la trucha arcoiris.

Por otra parte, se observó que las curvas separadas con segundo anticuerpo eran mas reproducibles, por lo que se decidió hacer los ajustes necesarios en el RIA para T₄ y separar este también con el sistema del segundo anticuerpo. Estos ajustes se realizaron ya con suero de trucha arcoiris.

Preparación de Suero Hipotiroideo. La elaboración del suero hipotiroideo o libre de HT es crucial en la estandarización del RIA para estas hormonas. En gran medida del empleo de este suero

depende la correcta cuantificación de las tironinas en las muestras problema. Se han mencionado dos hechos importantes en los capítulos pasados: 1) las diferencias que existen en la composición y características de las proteínas transportadoras de HT en el suero de las diversas clases animales, y 2) la necesidad de igualar las condiciones de la curva estándar a la de las muestras problema. Según lo anterior, es necesario contar con un suero homólogo a la especie que se va a estudiar, libre de HT para que sea utilizado en la curva estándar.

La preparación de suero hipotiroideo se llevo a a cabo de la siguiente manera:

1. Se sangraron 10 truchas por punción caudal (figura 4).
2. La sangre obtenida se dejo coagular a temperatura ambiente por 4 a 5 horas, al cabo de las cuales se centrifugó a 2,500 rpm por 20 minutos.
3. Se separó el suero con pipetas Pasteur y se preparó un "pool" mezclando 300 ul del suero de cada animal.
4. Al "pool" de suero se le agregó 500 mg de carbón por cada 10 ml para adsorber las hormonas y proteínas menores de 5,000 daltons (el p. m. de la T_3 y la T_4 es de 784 y 657 daltons respectivamente). La suspensión suero/carbón se dejó en agitación constante por 24 horas a 4°C.

5. Se centrifugó el suero a 19,000 rpm por 1 hora para precipitar todo el carbón.
6. Se recuperó el suero, se le agregó azida de sodio al 0.2% y se almacenó a -20°C hasta su uso.

Hormona Radioactiva y Titulación del Anticuerpo. Para determinar la cantidad óptima de hormona radioactiva se ensayaron tres diferentes concentraciones: 5, 10 y 15 pg / 100ul; todas ellas preparadas en amortiguador Tris-HCL con el agente "bloqueador" de la unión de tironinas a sus proteínas transportadoras (véase más adelante). Estas soluciones se preparan conociendo la actividad específica y la concentración del isótopo radioactivo que son proporcionadas por el proveedor comercial y suspendiendo la cantidad de T₄I en el amortiguador.

Inicialmente, cada una de las tres concentraciones del antígeno radioactivo se ensayó con tres diferentes diluciones del primer anticuerpo: 1:150, 1:300 y 1:450. El antisuero empleado correspondió al conejo C - 1 - INN (obtenido en el Departamento de Neuropsicoendocrinología del INNSZ). Se pesaron 80 mg del suero liofilizado y se reconstituyeron en 1 ml de agua destilada. A partir de esta solución se prepararon las diluciones antes señaladas. Los resultados de estos ensayos se muestran en la figura 5. Se puede apreciar que aunque todas las diluciones son útiles, es decir, que unen entre el 30 al 50% del antígeno radioactivo, la dilución de 1:300 con 10 pg de antígeno

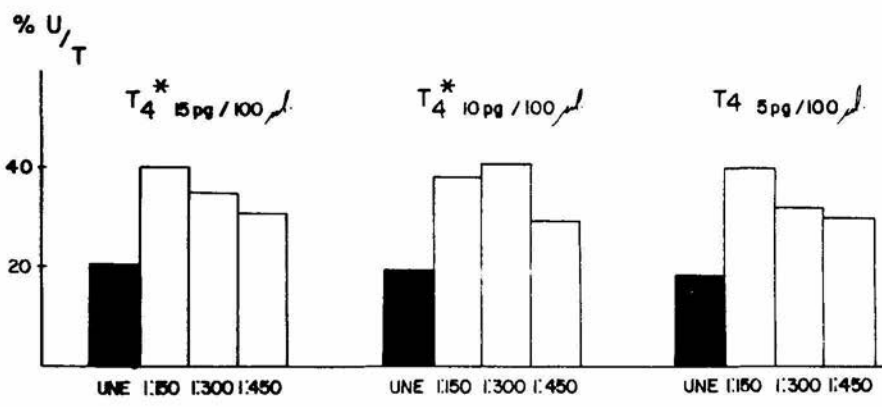


Figura 5.- Titulación del anticuerpo anti-T₄ con diferentes concentraciones del antígeno radioactivo (T₄^{*})

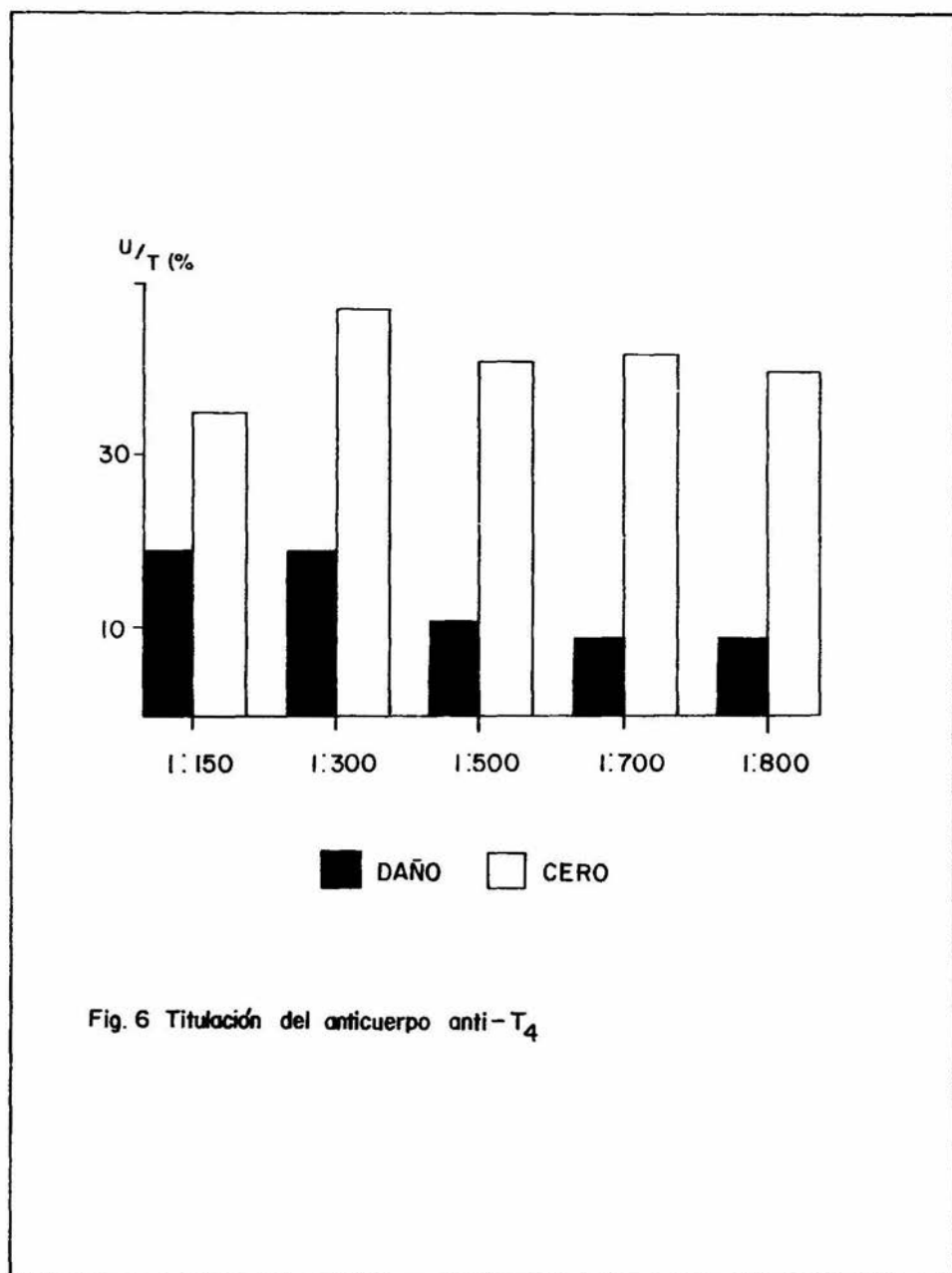


Fig. 6 Titulación del anticuerpo anti-T₄

radioactivo resulto ser la de mayor unión (44%). Esta fue la dilución que se utilizó durante el resto de los protocolos de estandarización.

Posteriormente, con la concentración de antígeno radioactivo ya establecida (10 pg/100 ul), se probaron las siguientes diluciones del primer anticuerpo: 1:500, 1:600, 1:700 y 1:800. Los resultados se muestran en la figura 6, observándose que todas estas diluciones son útiles, ya que el anticuerpo une entre el 30 y el 50% de antígeno radioactivo.

Acido 8 anilino - 1 - naftalensulfónico o ANS. Se trata de un agente bloqueador que separa a la HT (T₄) de su proteína transportadora (principalmente TBG), dejando a la hormona libre en el sistema con lo que se asegura su reactividad y posibilidad de cuantificación (Beltran y col, 1974).

Para determinar la concentración de ANS más adecuada para este sistema, se probaron las siguientes concentraciones: 0, 5, 10 y 20 mg de ANS en 10 ml de solución radioactiva. Esta solución se debe preparar justo antes de utilizarse. Los resultados se ilustran en la figura 7. Aunque la unión de las HT de pez a sus proteínas transportadoras es muy débil, carecen de TBG, los resultados muestran que el empleo del ANS es indispensable. Las uniones no específicas (UNE) en los ensayos realizados sin ANS o con 5 mg de este agente, son más elevadas que en el resto. Por esta razón se decidió utilizar la concentración de 10 mg/10 ml.

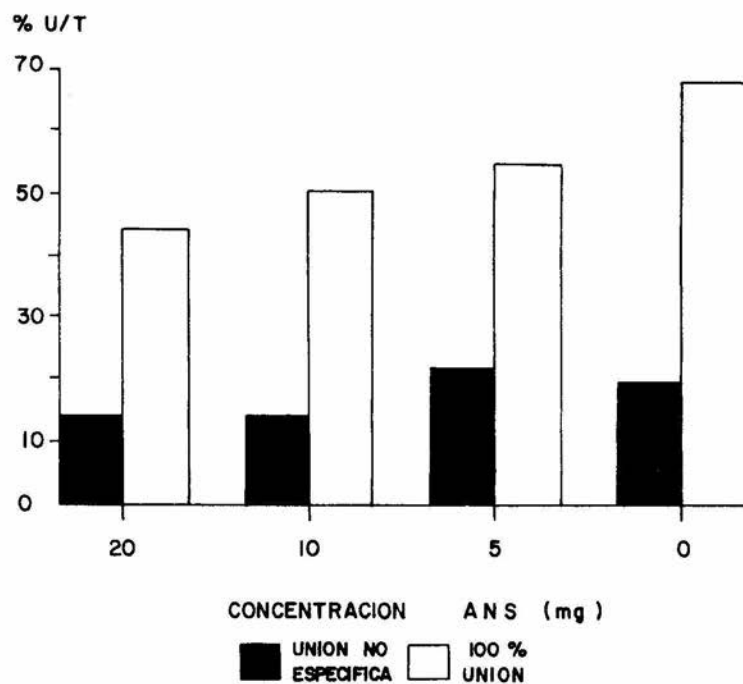


Figura 7.- Estandarización del RIA: para T_4 : Diferentes concentraciones del ANS

Separación con Carbón - Dextran. Para la separación de las fracciones unida (U) y libre (L), se utilizó el método de adsorción de carbón - dextran. En el laboratorio y para el RIA en otras especies (Beltran y col, 1974; Dutrem y col, 1978; Aceves y Legarreta, 1982; Romero y col, 1986; Uriz, 1989), se tiene la experiencia de emplear uno y otro agente en una suspensión al 0.5%. Para analizar este aspecto en el caso del RIA en peces, se mantuvo fija la cantidad de carbón y se realizaron ensayos en ausencia o bien en concentraciones del 0.25 y 0.5 % de dextran. Los resultados se muestran en la figura 8, y se observa que la separación sólo es satisfactoria cuando además del carbón se emplea dextran, y que es indistinto utilizarlo al 0.5 o al 0.25%. Se decidió usar la concentración de 0.25% por cuestiones de economía.

Separación con Segundo Anticuerpo. Las bases de este método de separación son distintas a las del sistema carbón - dextran. En el sistema del 2º anticuerpo se utiliza una anti-gamaglobulina de conejo generada habitualmente en borrego. Este 2º anticuerpo va a reaccionar con el anticuerpo ya presente en el sistema y que en este caso está dirigido contra la T₄ (primer anticuerpo). Esta reacción da como resultado un complejo 2º-1º anticuerpo que precipita durante la centrifugación. Obsérvese que con este método de separación, la fracción unida se encuentra en el precipitado y la libre en el sobrenadante.

Al utilizar segundo anticuerpo como método de separación, es

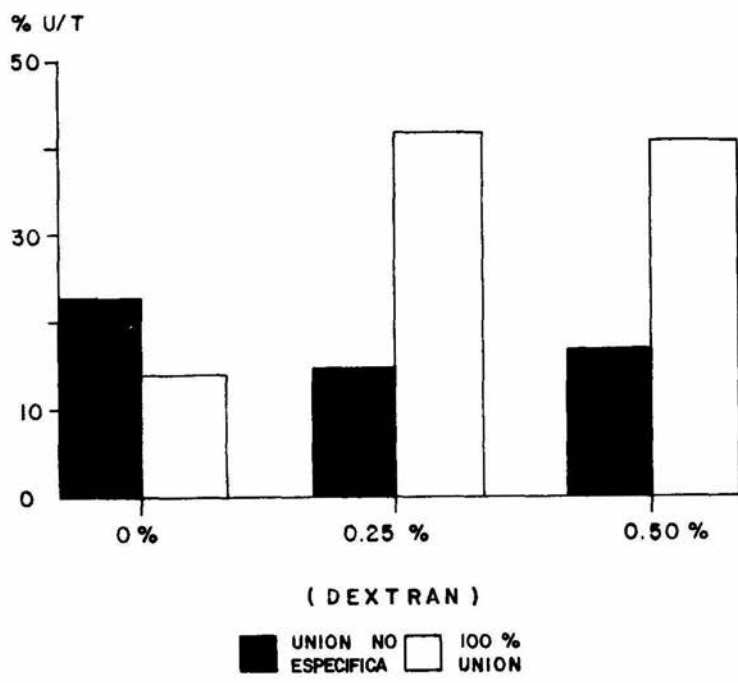


Figura 8 - Estandarización del RIA para T₄ : Diferentes concentraciones de DEXTRAN con concentración fija de CARBON (0.5%)

importante agregar al sistema suero de conejo, ya que este facilita la formación de una malla proteínica que favorece la precipitación de las moléculas del complejo 2^{do}-1^{er} anticuerpo.

Curva Estándar y Tiempo de Incubación. Al revisar la literatura específica de HT en peces, se encontró que ésta es en la mayoría de los casos contradictoria debido principalmente al uso de diferentes metodologías y de estuches comerciales estandarizados para cuantificar HT en humanos. Por esta razón, los valores reportados para T₄ en peces fluctúan entre los 5 y los 40 ng / ml. Tomando esto en cuenta se prepararon los siguientes estándares: 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 y 8.0 ng / ml, para así poder medir, según el factor de dilución dado por el volumen de suero utilizado y el volumen final de la reacción, entre 2.5 y 80 ng / ml. Los estándares se prepararon a partir de la solución madre que tiene una concentración de 100 mg / 100 ml, suspendiéndose en amortiguador Tris - HCL.

Con estos estándares y las diferentes diluciones de anticuerpos ya probadas (1:300 a 1:800), se ensayaron las curvas estándar que se muestran en la figura 9. Se puede observar que la curva con mejor desplazamiento se obtiene con la dilución 1:800.

Para la estandarización de este RIA también fue necesario fijar el tiempo de incubación para la reacción Ag(†) - Ac. La experiencia del laboratorio indicaba que el mejor tiempo era el

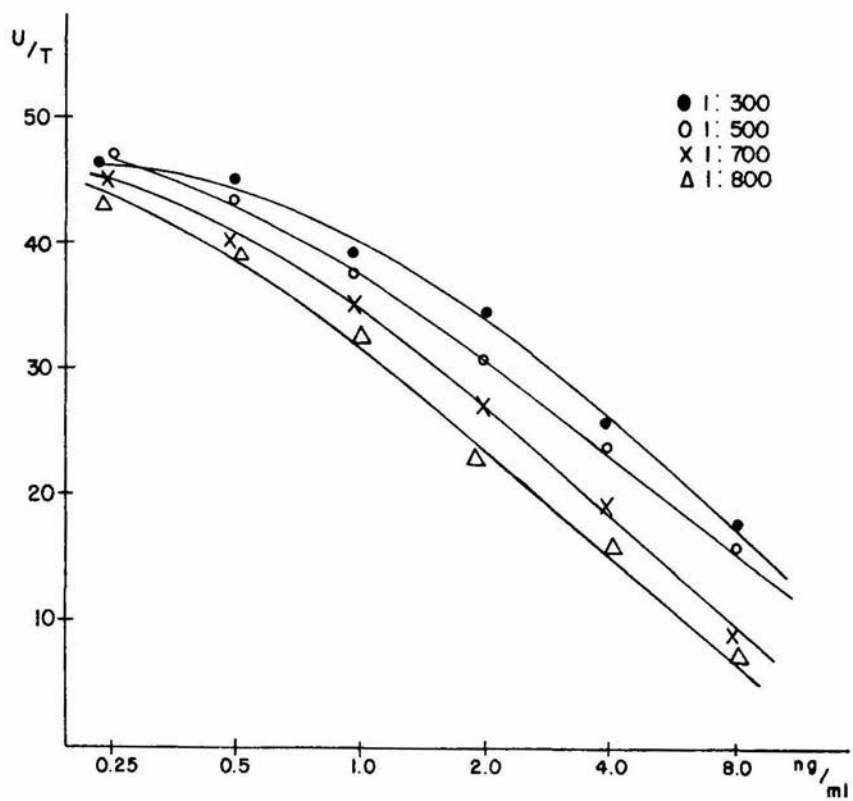


Figura 9.- Estandarización del RIA para T_4 : Se ilustran curvas estandar utilizando distintas diluciones del anticuerpo Anti - T_4

de 24 horas, pero la experiencia específica en peces mostró que el mejor tiempo de incubación era de 48 horas.

Procedimiento Final. A partir de los resultados anteriores, se establecieron las siguientes condiciones específicas del RIA de T_4 para peces:

- Antígeno Radioactivo ^{125}I T_4 : 10 pg / 100 ul
- Dilución Inicial del 1^{er} Anticuerpo: 1:800
- Concentración de AMS: 10 mg / 10 ml
- Concentración de Estándares: de 0.25 a 8 ng / ml
- Tiempo de Incubación: 48 horas
- Separación: carbón 0.5% - dextran 0.25%; o con segundo anticuerpo (100 ul) + suero de conejo (50 ul)

El procedimiento para la realización del RIA sigue los siguientes pasos:

1. Utilizando una hoja de protocolo como la que se anexa, se anota la información requerida y las características de cada uno de los tubos del ensayo. Todo el ensayo se realiza por duplicado.
2. De acuerdo a este protocolo, se numeran con plumón negro

RIA DE _____

FECHA: _____ ELABORADO POR: _____

TITULO Ab _____ ANTIGENO I25₁ _____ y T INCUBACION _____

Separación _____

	MUESTRA	MUESTRA	MUESTRA	MUESTRA
1	25	49	73	
2	26	50	74	
3	27	51	75	
4	28	52	76	
5	29	53	77	
6	30	54	78	
7	31	55	79	
8	32	56	80	
9	33	57	81	
10	34	58	82	
11	35	59	83	
12	36	60	84	
13	37	61	85	
14	38	62	86	
15	39	63	87	
16	40	64	88	
17	41	65	89	
18	42	66	90	
19	43	67	91	
20	44	68	92	
21	45	69	93	
22	46	70	94	
23	47	71	95	
24	48	72	96	

Observaciones _____

Contará el día _____

los tubos del dano, cero, curva estándar y problemas, y se colocan en una gradilla.

3. Segun el cuadro 2 que se presenta a continuación, se pipetea en cada pareja de tubos los reactivos indicados. Los volúmenes estan dados en ul y el volumen final de cada tubo debe de ser de 500 ul.
4. Los tubos se agitan y la gradilla se cubre con papel aluminio. El ensayo se incuba por 48 horas a 4°C.
5. En todos los tubos se pipetea 100 ul del segundo anticuerpo (1:300) y 50 ul de suero de conejo normal. El ensayo nuevamente se incuba a 4°C por 24 horas.
6. Para separar las fracciones U y L el ensayo se centrifuga a 2,500 rpm/ 30 min a 4°C, y posteriormente se decanta.
7. La radioactividad de ambas fracciones se cuantifica (cuentas por minuto o cpm) en un espectómetro de radiaciones gamma.

Cálculos. Con las cpm de los tubos del dano se calcula el porcentaje de unión inespecífica o UNE, que se restará al del resto de los tubos del ensayo. Para calcular estos porcentajes se utilizan las siguientes ecuaciones:

$$\frac{\text{cpm en U}}{\text{cpm en U + cpm en L}} \times 100 = \% \text{ Dano}$$

$$\frac{\text{cpm en U} - \% \text{ Dano}}{(\text{cpm en U} + \text{cpm en L}) - \% \text{ Dano}} \times 100 = \% \text{ U} / \text{T}$$

CUADRO 2. DISTRIBUCION Y VOLUMEN DE LOS REACTIVOS
UTILIZADOS EN EL RIA DE T₄ DE PECES

	Tris-HCL	Est	Prob	Hipo	Ac	T4†
Dano	390	---	---	10	---	100
Cero	290	---	---	10	100	100
Est	190	100	---	10	100	100
Prob	290	---	10	---	100	100

Dano: unión no específica; Cero: porcentaje de unión del antígeno radioactivo al anticuerpo o 100% de unión; Est: curva estándar; Prob: muestras a medir; Hipo: suero hipotiroideo y Ac: anticuerpo.

Graficado. Una vez obtenidos los porcentajes de unión para la curva estándar y los problemas, se procede a graficar la curva estándar en papel semi - log., colocando en el eje de las ordenadas el porcentaje de unión y en las abscisas la concentración de los estándares.

La lectura de los problemas se realiza interpolando sus porcentajes de unión partiendo de las ordenadas, localizando el punto de intersección con la curva estándar y leyendo la correspondencia en el eje de las abscisas.

Estandarización del RIA de T_3

En la mayoría de los vertebrados la concentración de T_3 en el suero es menor que la concentración de T_4 , por esta razón y por la experiencia en el laboratorio es necesario utilizar un volumen de muestra de 50 ul en lugar de los 10 ul que se utilizan para el RIA de T_4 . Por otra parte y debido a la dificultad para obtener y contar con cantidades suficientes de suero hipotiroideo, se realizaron ensayos preliminares probando sólo algunos puntos de la curva estándar. A lo largo de todos los experimentos, se utilizó el 1^{er} anticuerpo C - II - INNSZ - T_3 , preparado en el Departamento de Neuropsicoendocrinología del INN. Las diluciones del primer anticuerpo que se probaron fueron 1:500, 1:1000 y 1:1500.

Estos ensayos preliminares mostraron dos hechos: primero, que no ocurría el desplazamiento de las curvas estándar, siendo además los danos muy altos y los ceros muy bajos; segundo, que el suero de los peces tenía aparentemente grandes cantidades de T_3 , lo que de primera instancia permitió bajar el volumen de la muestra problema a 10ul.

Para tratar de conocer y corregir las causas de estos problemas se modificaron en forma sistematizada las diferentes variables del ensayo; vrg, dilución del anticuerpo, concentraciones de carbón - dextran, diferentes amortiguadores, diferentes concentraciones de ANS. Todos estos cambios resultaron

infructuosos. También se consideró que el suero hipotiroideo no estuviera totalmente libre de hormonas o que tuviera restos de carbón. Para probar lo anterior se realizaron una serie de experimentos utilizando no sólo sueros de peces, sino también de algunas otras especies como vacas, pollos y humanos. Al comprobarse que efectivamente los sueros sí estaban hipotiroideos y que tampoco era ese el problema, se decidió cambiar el método de separación, utilizando segundo anticuerpo en lugar de carbón - dextran. Esta modificación finalmente resolvió el problema.

Separación con Segundo Anticuerpo. El segundo anticuerpo fue obtenido de una fuente comercial y se empleó a una dilución de 1:100. Además, se utilizaron 50 ul de suero de conejo normal para favorecer la precipitación de los anticuerpos. Los resultados se ilustran en la figura 10, y de acuerdo a éstos, se eligió trabajar con el primer anticuerpo diluido 1:1000.

Al mismo tiempo que lo anterior, el mismo segundo anticuerpo se tituló en el RIA de T_4 para poder utilizar un solo método de separación en la medición de las dos hormonas. La dilución óptima resultó ser 1:300.

Curva Estándar. Tomando en cuenta los ensayos preliminares, se prepararon estándares para T_3 a partir de la solución madre que se encuentra a una concentración de 10 mg / 10 ml y suspendiéndose en amortiguador Tris - HCL. Los estándares que se utilizaron fueron de 25, 50, 100, 200, 500 y 1000 pg / 100 ul.

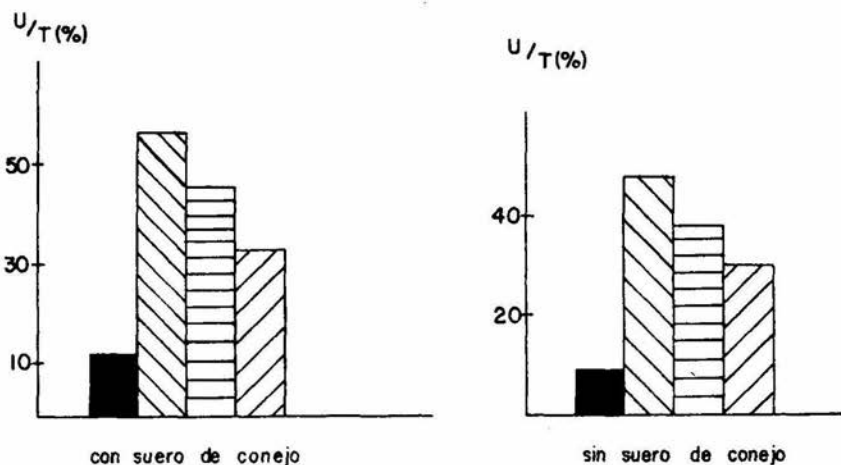


Figura 10.— Estandarización del RIA para T_3 . Separación con segundo anticuerpo, utilizando distintas diluciones del anticuerpo anti T_3 en presencia ó ausencia de suero de conejo.

En donde: ■ UNE ; ▨ 1:500 ; ▤ 1:1000 ; ▩ 1:1500.

La curva se ilustra en la figura 11.

Procedimiento Final. El RIA de T_3 para peces quedó establecido de la siguiente manera:

- Antígeno Radioactivo ^{125}I T_3 : 10 pg / 100 ul
- Dilución del Primer Anticuerpo: 1:1000
- Concentración de ANS: 10 mg en 10 ml de solución radioactiva
- Concentración de Estándares: 25, 50, 100, 200, 500 y 1000 pg/100ul
- Separación: Segundo anticuerpo 1:100 y 50 ul de suero de conejo

El procedimiento final es prácticamente igual al descrito previamente para el RIA de T_4 .

Por último, al interpolar los valores de las muestras problema se obtienen valores en ng/ml para T_4 y en pg/100ul para T_3 . Para unificar los valores, se utilizó la conversión a nmol/l propuesta por Hennemann (1986), multiplicando el valor de T_4 en ng/100ml por 0.0129, y el valor de T_3 en la misma unidad por 0.0154

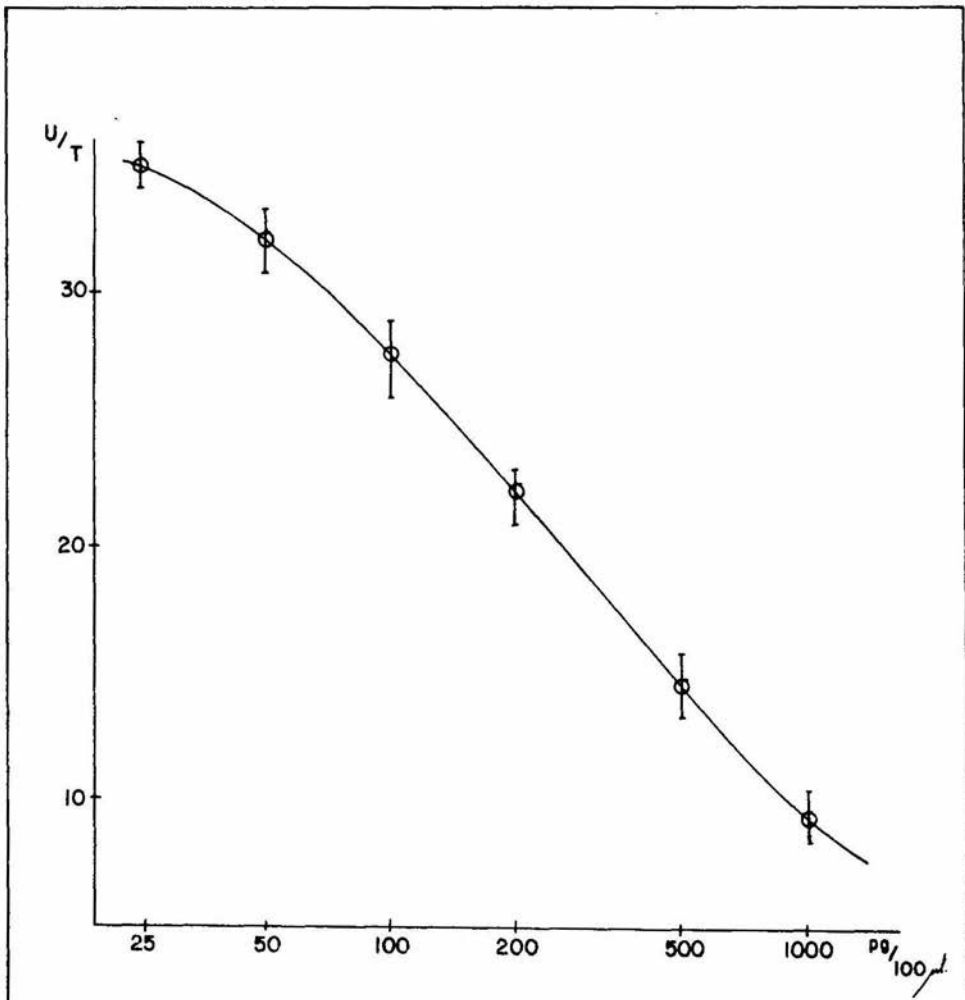


Fig. 11 : Estandarización del RIA para T_3 : Curva Estandar \pm desviación estandar (n = 8)

V. RESULTADOS

VALIDACION Y CONTROL DE CALIDAD DEL RIA

Inmunoreactividad Cruzada

En la figura 12 se muestra la reactividad cruzada que exhibe el anticuerpo contra T_4 para la hormona triyodotironina. Se puede observar que ésta última provoca sólo a concentraciones mayores de 3 ng un desplazamiento semejante al inducido por 0.05 ng de T_4 .

Especificidad

Se tomó un suero humano que contenía una concentración conocida de T_4 y T_3 y se diluyó con suero hipotiroideo de pez, así como con suero hipotiroideo humano y bovino. Estas diluciones se compararon con una curva estándar preparada con diferentes concentraciones de T_4 y T_3 comercial. Como se muestra en las figuras 13 y 14, el desplazamiento que exhiben las diluciones preparadas en los sueros de las diferentes especies es paralelo al que exhibe la curva estandar.

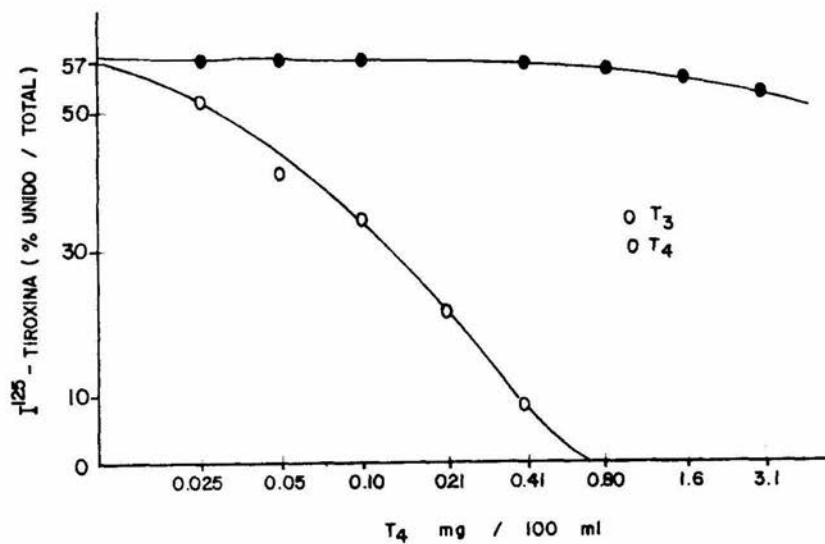


Figura 12.- Control de calidad del radioinmunoanálisis de tiroxina.
 Reactividad cruzada del anticuerpo anti-tiroxina con la hormona
 triyodotironina (T₃)

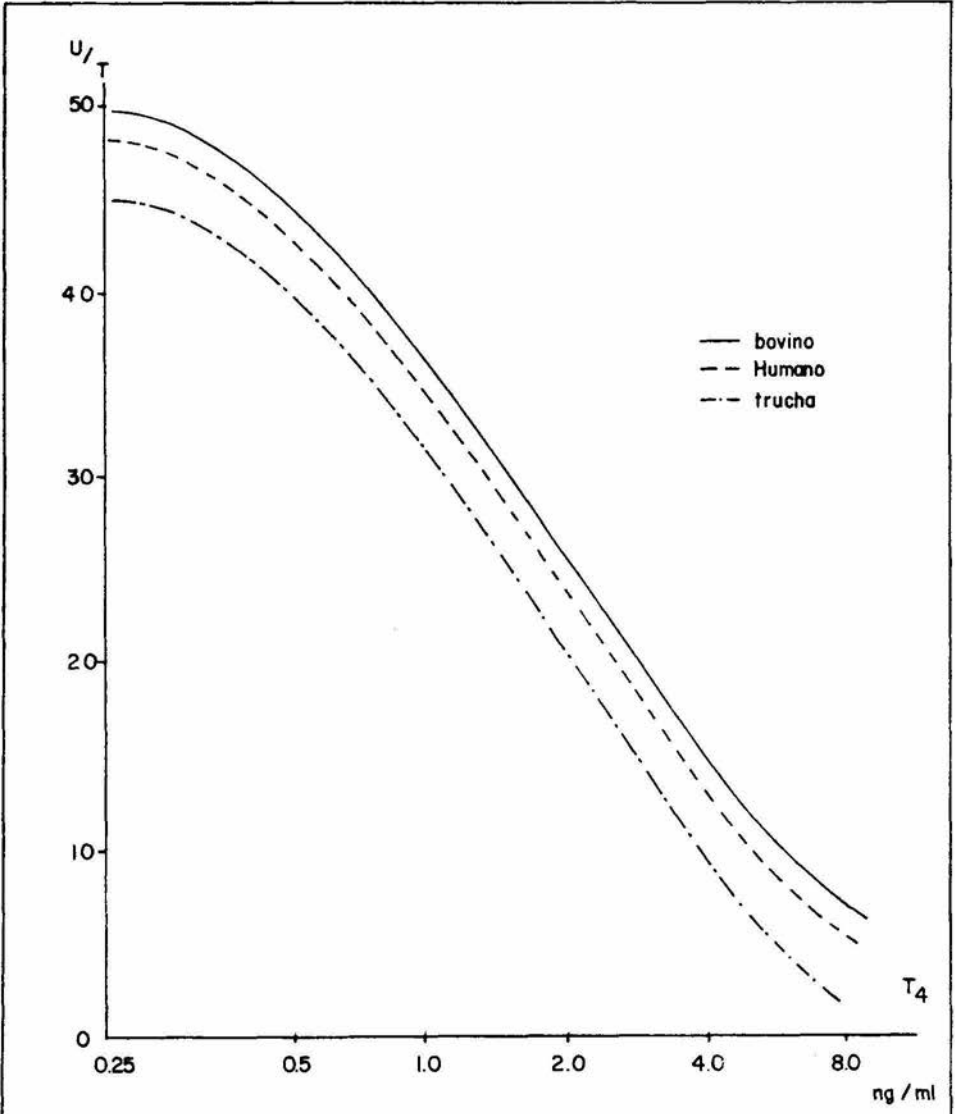


Figura 13 - Control de calidad del RIA para T₄ : Ensayo de Especificidad utilizando Suero de diferentes Vertebrados.

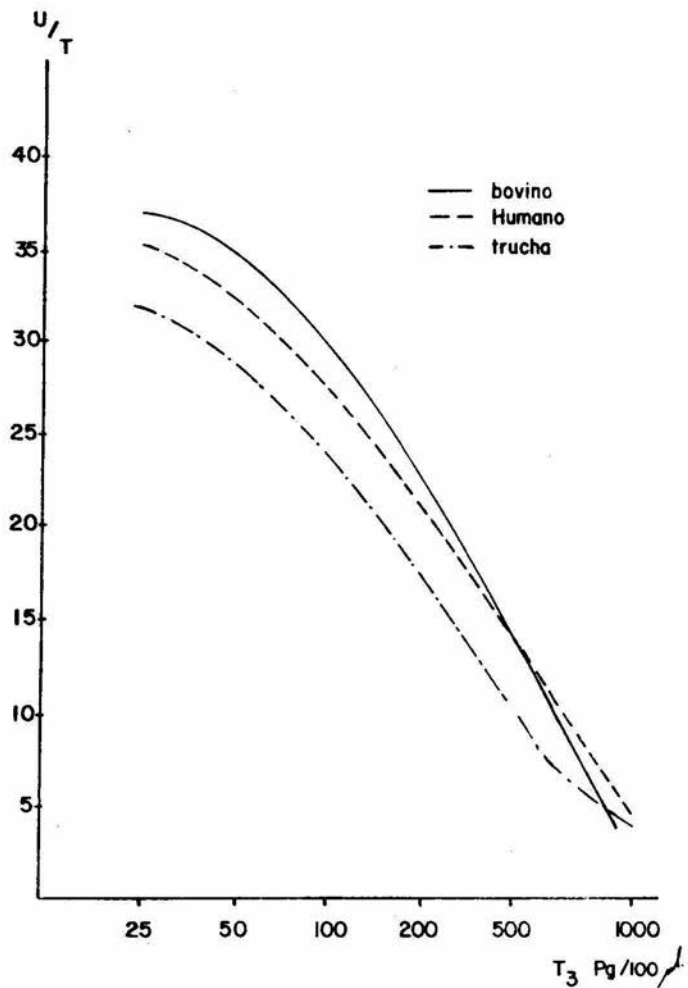


Figura 14- Control de calidad del RIA para T_3 : Especificidad

Sensibilidad

Como ya se indicó, las diluciones de los anticuerpos que se utilizaron en este estudio fueron de 1:300 para T₄ y 1:1000 para T₃. Con estas diluciones, la sensibilidad del procedimiento permite detectar concentraciones de una y otra hormona en el intervalo de 2.5 a 80 ng/ml y de 250 a 10 000 pg/100ul, respectivamente.

Reproducibilidad y Exactitud

En la realización de cualquier RIA se requiere preparar una curva estándar para cada análisis y no es posible contar con una curva patrón. Las características de reproducibilidad y exactitud se analizaron teniendo como parámetros la variación inter e intraensayo para uno y otro RIA.

- Variación Interensayo. Se analizaron los resultados de ocho ensayos diferentes tanto para T₃ como para T₄, los cuales se realizaron en el lapso de un mes. En el cuadro 3 se resumen los coeficientes de variación promedio y se puede observar que para ambas hormonas los valores son menores al 10%.
- Variación Intraensayo. Para cada hormona, se tomaron cinco muestras al azar y se analizaron cinco veces (por duplicado) en el mismo ensayo. En el mismo cuadro 3 se resumen los coeficientes de variación promedio, y se puede observar que

la exactitud y reproducibilidad del método fluctúa entre el 80 y 90%

CUADRO 3. REPRODUCIBILIDAD DE LOS RIA_s PARA T₃ Y T₄ EN SUERO DE TRUCHA ARCOIRIS

RIA	VARIACION INTRAENSAYO	VARIACION INTERENSAYO
T ₃	8.9%	9.5%
T ₄	8.3%	6.6%

Valores Normales de Hormonas Tiroideas en la Trucha Arcoiris

Las concentraciones circulantes de T₃ en el suero de los 30 peces variaron de 23.1 a 58.5 nmol/l. El valor promedio fue de 36.2 ± 10.7 nmol/l. Los valores de T₄ variaron de 9.2 a 28.4 nmol/L. El valor promedio fue de 15.5 ± 4.2 nmol/l.

Perfil Ontogénico de las Tironinas en la Trucha arcoiris

En el cuadro 4 se resumen los resultados globales del estudio. Los datos se han ordenado de acuerdo al peso corporal de los animales tomando intervalos de 50 g, división con la cual se integraron cinco grupos: Grupo I (50 a 99 g), Grupo II (100 a 149 g), Grupo III (150 a 199 g), Grupo IV (200 a 249 g) y Grupo V (250 a 300 g). Esta agrupación refleja en cierta medida la

ontogenia de esta especie, ya que el peso del último grupo es el que el reproductor utiliza como criterio para comercializar al animal.

En el cuadro 5 se ilustran los valores promedio de las variables medidas para cada uno de los grupos de animales. Se puede observar (ver también figura 15) que mientras que los valores del peso corporal se triplican del grupo I al V, la talla presenta un incremento lineal y poco significativo.

Con respecto a los niveles circulantes de las dos tironinas analizadas, se observa que los valores de la T_3 aumentan conforme incrementa el peso corporal de los animales. Así, las concentraciones circulantes se duplican del primero al último grupo, presentando valores ascendentes de grupo a grupo. El análisis de varianza (ANOVA) mostró que las concentraciones de la hormona en los animales de los grupos I y II son significativamente diferentes ($p < 0.005$) de las del resto de los animales. Estas diferencias también se observan entre los animales de los grupos III y IV con respecto a los del V, y entre éstos últimos y el resto de grupos.

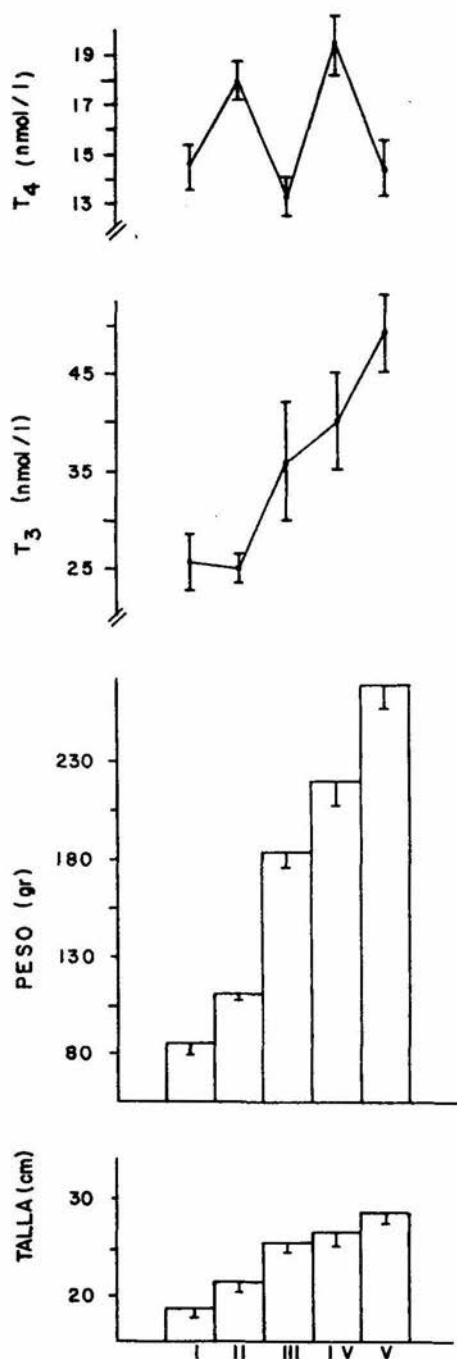


Figura 15.- Valores promedio \pm desviación estandar de las variables medidas para cada uno de los grupos de animales

CUADRO 4. PESO, TALLA Y TIRONINAS CIRCULANTES DURANTE LA ONTOGENIA DE LA TRUCHA ARCO IRIS

PESO g	TALLA cm	T ₃ nmol/l	T ₄ nmol/l	T ₄ /T ₃ nmol/l
80	17	24.6	12.6	0.51
80	17	24.6	13.5	0.54
80	19	30.8	16.1	0.52
90	19	23.1	15.5	0.67
90	19	23.1	14.2	0.61
105	21	23.9	14.2	0.59
110	21	23.9	14.2	0.59
130	22	26.2	22.0	0.83
140	23	26.2	23.2	0.88
170	26	29.3	20.0	0.68
180	24	43.1	14.2	0.32
180	25	24.6	12.6	0.51
180	25	32.3	10.1	0.31
190	25	41.6	12.6	0.30
190	25	33.9	12.6	0.37
190	25	49.3	13.5	0.27
190	27	32.3	9.2	0.28
205	25	32.3	12.6	0.39
210	25	47.7	12.6	0.26
210	26	33.9	18.7	0.55
210	26	30.8	25.2	0.81
230	26	42.4	16.1	0.38
235	26	42.4	23.2	0.54
235	27	49.3	28.4	0.57
250	28	56.6	11.6	0.20
260	28	44.7	11.9	0.80
270	29	40.0	14.2	0.35
280	28	52.4	16.8	0.32
280	28	58.5	14.8	0.25
290	29	43.1	18.0	0.41

A diferencia de lo anterior, para la T₄ se observan dos incrementos o "picos", uno en el grupo II y otro en el IV. El ANOVA mostró que sólo el segundo incremento (grupo IV) es

estadísticamente significativo ($p < 0.05$) y que es diferente sólo a los grupos III y V. En los grupos restantes los valores son semejantes entre sí.

CUADRO 5. VALORES PROMEDIO DE PESO, TALLA Y TIRONINAS CIRCULANTES EN LOS GRUPOS DE TRUCHA ARCOIRIS

GRUPO	PESO g	TALLA cm	T ₃ nmol/l	T ₄ nmol/l
I	84.0 + 5.5	18.2 + 1	25.3 + 3.1	14.4 + 1.4
II	121.2 + 16	21.7 + 0.9	25.0 + 1.3	18.3 + 4.8
III	183.8 + 7.4	25.3 + 0.8	35.8 + 8.1	13.1 + 3.2
IV	219.3 + 13.4	26.4 + 1.3	39.8 + 7.5	19.6 + 6.2
V	271.6 + 14	28.4 + 0.5	49.2 + 7.6	14.5 + 2.5

En la figura 16 se muestran los valores individuales de todas las variables analizadas en el estudio, referidos al peso como variable independiente. Esta figura ilustra la correlación directa que exhiben los niveles de T₃ y el peso corporal de los animales.

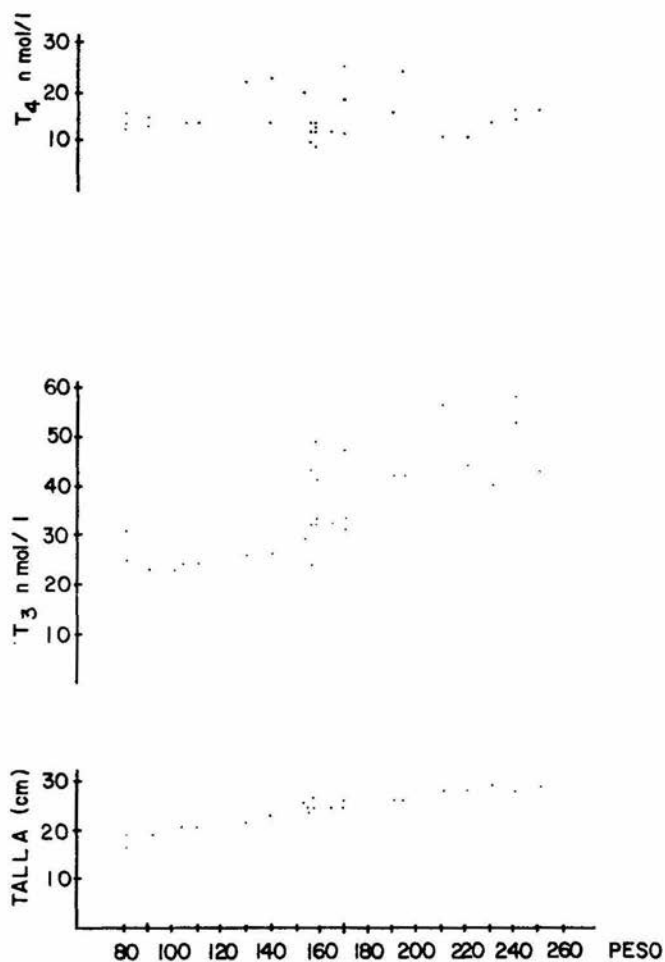


Figura 16.- Valores por individuo de talla (cm), T_3 y T_4 (n mol/l) referidos al peso (gr.)

VI. DISCUSION

Los resultados de la presente tesis muestran el desarrollo y estandarización de dos técnicas de RIA que empleando suero hipotiroideo homólogo en la curva estándar, permiten cuantificar los niveles circulantes de T_4 y T_3 en el suero de la trucha arcoiris. Las técnicas son relativamente sencillas y su control de calidad, que satisface los requisitos exigidos para esta metodología (Chopra, 1972), muestra que la cuantificación de una u otra tironina tiene un índice de confianza del 91.1 % y 91.7 % para T_3 y T_4 respectivamente.

Hasta donde sabemos el trabajo de esta tesis representa el primer estudio en la trucha arcoiris, en el cual la determinación de las tironinas se lleva a cabo mediante técnicas de RIA que utilizan suero homólogo en la curva estándar. Efectivamente, como se muestra en el cuadro 6, en este pez, los estudios al respecto se han hecho empleado estuches comerciales (Osborn y col, 1978; Omeljaniuk y col, 1984); o bien, cromatografía en columnas (Brown & Eales, 1977; Eales y col, 1981; Eales & Shostak, 1985), o en gel (Omeljaniuk y col, 1985). Este aspecto metodológico es de la mayor importancia ya que tanto la experiencia de nuestro laboratorio (Aceves y col, 1982), como la

de otros autores (May, 1978), ha mostrado que la ausencia de suero homólogo en la curva estándar lleva a obtener resultados espurios. Otro aspecto importante es el referente al sistema de separación de las fracciones unida y libre, ya que su confiabilidad está en gran parte determinada por la composición proteínica del suero de la especie que se desea estudiar. Así, en el caso de los peces que se sabe carecen de TBG (Yuichi y col, 1969; Refetoff, 1970; Robbins & Bartalena, 1986), es erróneo el empleo de estuches comerciales diseñados para especies cuyo suero sí contiene esa proteína.

Es importante enfatizar las discrepancias en los valores de las tironinas reportados en el plasma de la trucha arcoiris por los diferentes autores (cuadro 6). Se observa claramente cómo la metodología utilizada en cada estudio influye sensiblemente en los valores absolutos de las dos hormonas, e incluso se pueden observar diferencias notorias entre los valores obtenidos mediante la misma técnica (Fok y Eales, 1984; Eales y Shostak, 1985). También puede apreciarse que cuando se emplean estuches comerciales (Osborn y col, 1978), las cifras son significativamente mayores. Estas diferencias podrían obedecer en parte a los aspectos metodológicos antes señalados; o bien al hecho de que en todos se emplea plasma, así como a las características biológicas de los organismos en estudio (peso, talla, edad y madurez sexual). Sobre este último aspecto, los estudios de Omeljaniuk (1984 y 1985) y de Fok y Eales (1984) no

brindan información, mientras que en los restantes ésta es incompleta y contradictoria. Así, por ejemplo, existe una notable discrepancia entre las edades y los pesos reportados (Eales, 1981 y 1985).

Aún cuando Eales es el investigador más activo en el campo, su metodología es quizá la más falaz desde el punto de vista cuantitativo. Este autor emplea una técnica de RIA utilizando columnas de Sephadex (Brown y Eales, 1977). Este sistema presenta entre otros los siguientes inconvenientes:

- No utiliza suero hipotiroideo, ya sea homólogo o heterólogo en la curva estándar. Ya se ha señalado la importancia de igualar las condiciones de la curva estándar y los sueros problema.
- La reacción antígeno - anticuerpo la efectúan dentro de la columna de Sephadex, permitiendo únicamente 90 minutos para el "equilibrio" de la misma. Los resultados de esta tesis muestran que se requiere un lapso de 48 horas para optimizar resultados.
- Los porcentajes de recuperación que obtienen varían del 88.5 al 116 % para T_3 y del 90 al 120 % para T_4 , lo que indica un error de alrededor del 20 %, mientras que en este estudio se está reportando un error menor al 10%.

Por todo lo anterior es evidente que no es posible comparar los valores obtenidos en la presente tesis con los informados en la literatura específica de trucha arcoiris. Sin embargo, y como también se resume en el cuadro 5, es importante destacar que las concentraciones de T_3 y T_4 encontradas en este trabajo, son comparables a las informadas en otros salmónidos migratorios con técnicas de RIA que, aunque utilizan plasma y sistemas de separación diferentes, sí emplean suero homólogo en la curva estándar (Biddiscombe & Idler, 1984; Pedding y col, 1984).

Aunque los datos de nuestro estudio no permiten constatarlo, consideramos que además de los aspectos metodológicos ya señalados, la semejanza entre nuestros resultados y los reportados por Pedding y col (1984) y Redivic y col (1984), podría explicarse sobre las bases del proceso de maduración gonadal que parece ser característico de los cordados (ver cuadro 1; Sower y Schreck, 1982; Biddiscombe & Idler, 1983; Lintlop y Youson, 1983; Parra y col, 1980). En apoyo a esta interpretación está la clara correlación que exhiben a lo largo del estudio, los niveles de T_3 y el peso corporal de los animales; así como el incremento significativo y transitorio de la T_4 en los animales del grupo IV (cuadro 5 y figuras 15 y 16).

CUADRO 6. VALORES DE TIRONINAS CIRCULANTES EN ALGUNOS SALMONIDOS

ESPECIE	T ₃ nmol/l	T ₄ nmol/l	METODO	REFERENCIA
<u>S. gairdneri</u>	0.5 - 4.7	0.7 - 4.5	RIA	Eales & Shostak, 1985
<u>S. gairdneri</u>	2.2	1.5	RIA	Eales y col, 1981
<u>S. gairdneri</u>	1.1 - 4.5	0.6 - 3.9	RIA	Flood & Eales, 1983
<u>S. gairdneri</u>	7.7 -18.5	2.8 -33.5	RIA†	Osborne y col, 1978
<u>S. gairdneri</u>	0.4 - 1.9	1.2 - 3.0	RIA	Eales y col, 1984
<u>S. gairdneri</u>	0.2 - 4.5	---	CG	Omejalniuk y col, 1985
<u>S. gairdneri</u>	0.6 ± 0.1	1.9 ± 0.4	RIA	Fok & Eales, 1984
<u>S. gairdneri</u>	6.5	5.8	RIA#	Omeljanuik y col, 1984
<u>O. nerka</u>	1.4 -10.8	7.7 -25.8	RIA	Biddiscombe y col, 1984
<u>O. kisutch</u>	2.3 -12.4	5.6 -19.4	RIA	Redding y col, 1984
<u>O. kisutch</u>	---	10.3 -77.4	RIA	Grau y col, 1981
<u>O. kisutch</u>	---	18.0-117.4	RIA	Dickhoff y col, 1978
<u>S. salar</u>	2.4 - 3.4	8-1 -14.2	RIA†	Redivic y col, 1984

S, Salmo; O, Oncorhynchus; †, comercial; CG, cromatografía en gel; #, fase sólida

Con todo lo anterior se hace clara la importancia de contar con un RIA homólogo para la especie que se requiera estudiar, y así obtener los valores absolutos más confiables posibles. En el laboratorio se han cuantificado los niveles circulantes de T₃ y T₄ en humanos y en diversos animales utilizando RIAs homólogos

para cada uno de ellos. En el cuadro 7 se ilustran los valores que se han reportado para cada una de estas especies.

CUADRO 7. VALORES DE TRIYODOTIRONINA EN DIFERENTES ANIMALES

ESPECIE	T ₃ nmol/l	T ₄ nmol/l	REFERENCIA
Trucha arcoiris	23.1 - 58.5	9.2 - 28.4	Presente tesis
Pollos	2.9 - 5.9	4.8 - 19.7	Uriz, 1989
Ovejas	1.3 - 2.0	5.6 - 10.3	Romero y col, 1986
Bovinos y caprinos	0.9 - 1.8	2.6 - 7.7	Aceves y Legarreta, 1982
Humanos	0.6 - 2.4	5.6 - 15.5	Beltran y col, 1973; Dutrem y col, 1978

Estos valores absolutos son comparables entre sí ya que además de utilizar la misma metodología homóloga para cada uno de ellos, se emplearon primeros anticuerpos semejantes. Es notorio que los valores de T₃ en pollos y trucha arcoiris son los más elevados. El conocimiento de que todos los vertebrados inferiores carecen de TBG (Yuichi y col, 1969; Astier, 1980), permite especular que las altas concentraciones de T₃ sean propiciadas en parte por la ausencia de esta proteína transportadora que favorecería un rápido recambio tisular de T₄ hacia T₃.

VII. CONCLUSIONES

1. Se estandarizó la metodología de radioinmunoanálisis, empleando suero homólogo en la curva estándar, para determinar las concentraciones séricas circulantes de T_3 y T_4 en el salmónido Salmo gairdneri.
2. Esta metodología permite cuantificar precisa y específicamente, concentraciones de las dos hormonas en el orden de 10^{-9} g/dl.
3. Existe una gran divergencia en los valores de las dos hormonas de la trucha arcoiris reportados en la literatura. Esta discordancia probablemente obedece a uno o más de los siguientes factores:
 - No utilizan suero homólogo en la curva estándar.
 - Utilizan ya sea estuches comerciales o metodología no homóloga y poco específica.
 - La información fragmentada y escasa de algunos aspectos biológicos de los animales en estudio.

4. Aunque los valores encontrados en la presente tesis difieren de los obtenidos en la trucha arcoiris, ellos son comparables con los reportados en otros salmónidos migratorios en cuyos estudios sí se emplea suero homólogo en la curva estándar.

5. Las concentraciones circulantes de las tironinas encontradas en este estudio, apoyan la noción de que la T_3 es la hormona con mayor actividad fisiológica, y se encuentra relacionada al proceso de maduración gonadal, mostrando una estrecha correlación con el peso corporal.

BIBLIOGRAFIA

Aceves C. y G. Legarreta (1982). Determinación radioinmunométrica de valores normales de triyodotironina y tiroxina en dos grupos de vertebrados de consumo humano: bovinos y Caprinos. Facultad de Ciencias. UNAM.

Aceves C., F.G. Legarreta y Valverde-R.C. (1982). Importancia del Radioinmunoanálisis Homólogo de Tiroxina en el suero de bovinos y caprinos. Veterinaria Mex. 13: 207 - 212.

Astier H. (1980). Thyroid gland in birds. Structure and Function. In: Avian Endocrinology. A. Eppler & M.A. Stutson, (Eds). Academic Press. N. York.

Barrington E.J.W. (1959). Some endocrinological aspects of the Protochordata. In: Comparative Endocrinology. (A. Gorbman, Ed) Wiley, New York.

Barrington E.J.W., & A. Thorpe. (1965). An autoradiographic study of the binding of iodine¹²⁵ in the endostyle and pharynx of the ascidian, Ciona intestinalis L. Gen. Comp. Endocrinol 5: 375-385.

Barrington E.J.W. (1975). Introducción a la Endocrinología General y Comparada. Editorial Blume. Madrid, España.

Beltran M., Nieto L., Cuevas L., Ruiz-J. A., Valverde-R. C. (1974). Cuantificación directa de tiroxina sérica total por radioinmunoanálisis. Rev. Invest. Clin. Mex. 26: 125-131.

Baxter J. & Funder J. (1979). Hormone receptors. N. Engl. J. Med. 301: 1149-1156.

Biddiscombe S. & Idler D.R. (1983). Plasma levels of thyroid hormones in Sockeye salmon (Oncorhynchus nerka). Decrease before spawning. Gen. Comp. Endocrinol. 52: 467-470

Brown S.B., Fedoruk K., & Eales J.G. (1978). Physical injury due to injection or blood removal causes transitory elevations of plasma thyroxine in rainbow trout, Salmo gairdneri. Canad. J. Zool. 56: 1998-2003.

Chopra I.J. (1972). A radioimmunoassay for measurement of thyroxine in unextracted serum. J. Clin. Endocr. Metab 34: 938-947.

Chopra I.J., Solomon D.H., Chopra V., Yung M.S., Fisher D.A. & Nakamura Y. (1978). Pathways of metabolism of thyroid hormones. Rec. Progr. Horm. Res 34: 521-532.

Clements-Merlini M. (1962a). Altered metabolism of I^{131} by the endostyle & notochord of ammocoetes larvae I. Effects of treatment with thyrotropic stimulating hormone. Gen. Comp. Endocrinol 2: 354-360.

Clements-Merlini M. (1962b). Altered metabolism of I^{131} by the endostyle & notochord of ammocoetes larvae II. Effects with treatment with thyrorea of potassium thiocyanate. Gen. Comp. Endocrinol 2: 361-368.

DeGroot L. (1965). Current views on formation of thyroid hormones. New Engl. J. Med 272: 243-362.

DeGroot L. (1979). Thyroid hormone action and thyroid physiology: endocrine and neural relationships. In: DeGroot et al, Endocrinology Vol., 2. pp. 357-364. Grune Stratton.

DeGroot L. & Taurog A. (1979). Secretion of thyroid hormone. In: Endocrinology. DeGroot et al. (Eds.) Grune Stratton. Vol 2: pp 343-346.

Dickhoff W.W., Folmar L.C. & Gorbman A. (1978). Changes in plasma thyroxine during smoltification of coho salmon, Oncorhynchus kisutch. Gen. Comp. Endocrinol 36: 229-232.

Dutrem M.T., Bolanos F., Maisterrena T., Valverde-R C. (1978). Utilidad de las determinaciones radioinmunométricas de las hormonas tiroideas en el manejo del hipotiroidismo. Rev. Invest. Clin. Mex 30: 231-240.

Eales J.G. (1979). Comparison of L-thyroxine and 3,5,3'-triiodo-L-thyronine kinetics in fed and starved rainbow trout Salmo gairdneri. Comp. Biochem. Physiol. 62A: 295-300.

Eales J.G., Hughes M., & Uin L. (1981). Effect of food intake on diel variations in plasma thyroid hormone levels in rainbow trout, Salmo gairdneri. Gen. Comp. Endocrinol 45: 167-174.

Eales J.G., Chang J.P., Van der Kraak G., Omeljanuik R.J. & Uin L. (1982). Effects of temperature on plasma thyroxine and iodine kinetics in rainbow trout Salmo gairdneri. Gen. Comp. Endocrinol 47: 295-307.

Eales J.G., Omeljanuik R.J. & Shostak S. (1983). Reverse T3 in rainbow trout Salmo gairdneri. Gen. Comp. Endocrinol 50: 395-406.

Eales J.G., S. Shostak & C.G. Flood (1984). Influence of thiol substances on (in vitro) and (in vivo) L-thyroxine deiodination in rainbow trout, Salmo gairdneri. Can. J. Zool 62: 1495-1501.

Eales J.G. & S. Shostak (1985). Free T₄ and T₃ in relation to total hormone, free hormone indices, and protein in plasma of rainbow trout and arctic charr. Gen. Comp. Endocrinol 58: 291-302.

Etkin W. (1978). The thyroid gland - A gland in search of a function. Perspectives in Biology And Medicine.

Ekins R.P. (1974). Basic principles and theory. Brit. Med. Bull 30: 3-11.

Engler, D. & Burger, A.G. (1984). The deiodination of the iodothyronines and their derivatives in man. Endocr. Rev 5: 151-184.

Flood C.G., & Eales J.G. (1983). Effects of starvation and refeeding on plasma T₄ and T₃ levels and T₃ deiodination in rainbow trout, Salmo gairdneri. Can. J. Zool. 61:1949-1953.

Flores L.F. y Cabeza F.A. (1984). Endocrinología Editorial Francisco Mendez Cervantes. pp. 409-479. Mexico.

Folmar L.C. & Dickhoff W.W. (1979). Plasma thyroxine and gill Na⁺ - K⁺ - ATPase changes during seawater acclimation of coho salmon Oncorhynchus kisutch. Comp. Biochem. Physiol. 63 A: 392.

Fok P. & J.G. Eales. (1984). Regulation of plasma t₃ levels in T₄ challenged rainbow trout, Salmo gairdneri. Gen. Comp. Endocrinol 53: 197-202.

Gorbman A., M. Clements & P. O'Brien. (1954). Utilization of radiiodine by invertebrates, with special study of several Annelida and Mollusca. J. Exp. Zool 127: 75-92.

Gorbman A. (1955). Some aspects of the comparative biochemistry of iodine utilization and the evolution of thyroid function. Physiol. Rev 35: 336-344.

Gorbman A. (1978). Evolution of thyroid function. In: C. H. Li (ed.) Hormonal Proteins and Peptides Vol., VI. pp.273-369. Acad. Press.

Gordon M.S. (1979). Fisiología Animal. Editorial C E C S A. Mexico. Cap 12.

Graw G.E., Dickhoff W.W., Bern H.A. & Folmar L.C. (1981). Lunar phasing of the thyroxine surge preparatory to the seaward migration of salmonid fish. Science 211: 607-609.

Guyton C.A. (1984). Tratado de Fisiología Médica. Editorial Interamericana, México. pp 1083-1146.

Hennemann G. (1986). (Edited by). Thyroid Hormone Metabolism. Marcel Dekker, Inc. New York and Basel.

Higgs, D.A., & Eales, J.G. (1977). Influence of food deprivation on radioiodothyronine and radioiodine kinetics in yearling brook trout, Salvelinus fontinalis (Mitchill) with a consideration of the extent of L-thyroxine conversion to 3,5,3'-triiodo-L-thyronine. Gen Comp Endocrinol 32: 29-40.

Higgs D.A., & Eales, J.G. (1979). The influence of diet composition of radiothyroxine kinetics in brook trout, Salvelinus fontinalis (Mitchill). Canad. J. Zool. 57: 396-402.

Hoar, W.S. (1979). Fisiología Animal Comparada. Segunda edición. Ed. Omega. Barcelona.

Kennedy G.R. (1966). The distribution and nature of iodine compounds in ascideans. Gen Comp Endocrinol 7: 500-511.

Lam T.J. (1972). Prolactin and hydromineral regulation in fish. Gen Comp Endocrinol Supplement 3: 328-338.

Lehman P.A. (1982). Las hormonas tiroideas. Ciencia 33: 145-153.

Limpel L.E. & J.E. Casida (1957). Iodine metabolism in insects. J. Exp. Zool 135: 19-25.

Lintlop S.P., & J.H. Youson (1983). Concentration of triiodothyronine in the sera of sea lamprey, Petromyzon marinus and the brook lamprey Lamprita lamottenii, at various phases of the life cycle. Gen Comp Endocrinol 49: 187-194.

Malacara J.M., M.V. Garcia y Valverde-R. (1979). Fundamentos de Endocrinología Clínica. La Prensa Médica. México.

May J.D. (1978). A radioimmunoassay for 3, 5, 3' - triiodothyronine in chicken serum. Poultry Sci 57: 1740-1745.

Norris D.O. (1980). Vertebrate Endocrinology. Lea & Febiger USA.

Omeljaniuk R., F. Cook and J.G. Eales. (1984). Simultaneous measurement of thyroxine and triiodothyronine in trout plasma using a solid phase radioimmunoassay. Can J Zool 62: 1451-1453.

Omeljaniuk R. & J.G. Eales. (1985). Immersion of rainbow trout in 3, 5, 3'-triiodo-L-thyronine (T_3): Effects on plasma T_3 levels and hepatic nuclear binding. Gen Comp Endocrinol 58: 81-88.

Oppenheimer J.H., H.L. Schwartz, C.N. Mariach, W.B. Kinlaw, N.C. Wong & H.K. Freak. (1987). Advances in our understanding of thyroid hormone action at the cellular level. Endocr_Rev 8: 288-298.

Osborn P.H., Simpson T.H., & Youngson A.F. (1978). Seasonal and diurnal rhythms of thyroidal status in the rainbow trout Salmo gairdneri Richardson. J. Fish Biol. 12:531-540.

Parra A., S. Villalpando, E. Junco, B. Urquieta, S. Alatorre y G. Garcia-Bulnes. (1980). Thyroid gland function during childhood and adolescence. Changes in serum THS, T₄, T₃, thyroxine-binding globulin, reverse T₃ and free T₄ and T₃ concentrations. Acta endocr (Kbb) 93: 306-314.

Pedding M.J., C.B. Schreck, E.K. Birks, & R.D. Ewing. (1984). Cortisol and its effects on plasma thyroid hormone and electrolyte concentrations in fresh water and during seawater acclimation in yearling coho salmon Oncorhynchus kisutch. Gen Comp Endocrinol 56: 146-155.

Refetoff S., N.I. Robin & U.S. Fang. (1970). Parameters of thyroid function in serum of 16 selected vertebrate species: A study of PBI, serum T₄ and the patterns of T₄ and T₃ binding serum proteins. Endocrinology 86: 793-805.

Robbins J. (1978). Thyroxine transport proteins of plasma. Molecular properties and biosynthesis. Rec_Progr_Horm_Res 34: 477-520.

Robbins J. & L. Bartalena. (1986). Plasma transport of thyroid hormones In: Hennemann G. (Ed). Thyroid Hormone Metabolism Marcel Dekker, Inc. New York.

Roche J. & Y. Yagi. (1952). Fixation d'iode radioactif par les algues et sur les constituants iodes des Laminaires. Compt Rend Soc de Biol 146: 642-645.

Romero C., L. Sahagun y C. Valverde-R. (1986). Modificaciones de fase y amplitud en el perfil endócrino por un eclipse solar en ovejas. Presentado en el XI Congreso Panamericano de Endocrinología. La Habana, Cuba.

Ruiz-Juvera A. (1976). Implementación y normalización del radioinmunoanálisis de gastrina. Tesis de licenciatura. F. Química, Universidad Iberoamericana.

Rydevic M., K. Lindahl & G. Fridberg. (1984). Diel pattern of plasma T₃ and T₄ levels in Baltic salmon parr Salmo salar L. during two seasons. Can J Zool 62: 643-646.

Sower S.A. & Schreck E.B. (1982). Steroid and thyroid hormones during sexual maturation of coho salmon Oncorhynchus kisutch in seawater or freshwater. Gen_Comp_Endocrinol 47: 42-53.

Sower S.A., Sullivan C.V. & Gorbman A. (1984). Changes in plasma estradiol & effects of T3 on plasma estradiol during smoltification of coho salmon Oncorhynchus kisutch Gen_Comp_Endocrinol 54: 486-492.

Sterling K. & Lazarus J. (1977). The thyroid and its control. Ann_Rev_Physiol 39: 349-372.

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

Taurog A. (1979). Hormone synthesis. In: Endocrinology. DeGroot et al. (Eds) Grune Stratton. Vol 2; pp 331-342.

Uriz G.M. (1989) Perfil temporal de hormonas tiroideas (T₃ y T₄) durante el crecimiento y engorda en pollos de la línea Arbor acres. Tesis de Licenciatura. ENEP - UNAM Iztacala.

Valverde-R. C. (1983). Control y regulación neuroendócrina de la función tiroidea. En: Tiroides, Fisiología y Patología. J. Maisterrena (ed.) Asanca.

Valverde-R. C., A. Orozco P., C. Romero R. (1988). Control y regulación de la función tiroidea. En: Texto de Fisiología. Soc Mex Ciencias Fisiológicas, PRONFOPAB - SEP. (en prensa)

Vinogradov A.P. (1935). Chemical composition of marine organisms. Trav_du_Lab_Bio_L'acad_Sci_de_L'USSR 3.

Wolff J. (1964) Transport of iodide and other anions in the thyroid gland. Physiol_rev 44: 45-90

Yalow S.R. (1980). Radioimmunoassay: A probe for fine structure of biological systems. Science 200: 290-294.

Yalow, R.S. & Berson, S.A. (1959). Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods. Nature 184: 1648-1654.

Young J.Z. (1981). The life of vertebrates. Third edition. Clarendon Press. Oxford.

Yuichi Tanabe., Taodo I. & Yoshinori T. (1969). Comparison of thyroxine-binding proteins of various vertebrates and their evolutionary aspects. Gen_Comp_Endocrinol 13: 14-21.