

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA



TESIS DOCTORAL

**Efecto de la adrenalectomía y de los corticoides sobre la
función tiroidea de ratas**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

María José Tarín Remohi

DIRECTOR:

Trinidad Jolín Buzo

Madrid, 2015



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

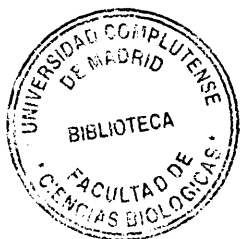


5318222331

T 591. 444
TAR
efe

EFEECTO DE LA ADRENALECTOMIA Y DE LOS
CORTICOIDES SOBRE LA FUNCION TIROIDEA
DE RATAS

Tesis presentada para optar al
grado de DOCTOR EN FAR-
MACIA por la Licenciado MA-
RIA JOSE TARIN REMOHI.



R. 36464

Madrid, 1972

El trabajo aquí presentado ha sido realizado bajo la dirección científica de la Dra. Trinidad Jolín Buzo, en la Sección de Fisiología Endocrina del Instituto G. Marañón del C.S. I.C.. De este Centro he recibido todos los medios y facilidades para realizar el trabajo.

Quiero expresar mi gratitud a la Dra. Jolín quien ha sabido iniciarme y llevarme adelante en este trabajo, y sin cuya constante ayuda no habría podido finalizar la presente Tesis.

Agradezco a los Dres. Escobar el apoyo que en todo momento me han prestado.

Al Prof. Lucas Gallego por su amabilidad en la presentación de este Tesis en la Facultad de Farmacia de Madrid, expreso mi reconocimiento.

No puedo olvidar la colaboración de las Auxiliares de laboratorio Srtas. González, Palacios, Durán, Sánchez y Ruiz, y también a todos los compañeros y compañeras de laboratorio.

INDICE

CLAVE DE ABREVIATURAS	8
INTRODUCCION	10
I - GENERALIDADES	11
II - ANTECEDENTES DIRECTAMENTE RELACIONADOS CON LA PRESENTE TESIS	19
III - EFECTOS DEL ACTH Y GLUCOCORTICOIDES SOBRE LA FUNCION TIROIDEA	40
PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS DE LA PRESENTE TESIS	44
MATERIALES Y METODOS	52
I - METODOLOGIA GENERAL	53
A - <u>Animales</u>	53
B - <u>Dieta</u>	53
C - <u>Temperatura y otras condiciones ambientales</u>	55
D - <u>Anestesia</u>	55
E - <u>Sacrificio de los animales</u>	55
F - <u>Adrenalectomía</u>	60
II - METODOS ANALITICOS	61
A - <u>Valoración de I¹³¹</u>	61
1) <u>Contaje</u>	61
2) <u>Determinación de la composición porcentual de iodoaminoácidos tiroideos marcados con I¹³¹</u>	61

2 _a) <u>Homogenización de tiroides</u>	61
2 _b) <u>Digestión proteolítica</u>	62
2 _c) <u>Separación cromatográfica</u>	62
2 _d) <u>Localización, identificación y cuantitaci3n de los compuestos iodados</u>	64
3) <u>Determinaci3n de I¹³¹ en plasma y PBI¹³¹</u>	66
B - <u>Valoraci3n de I¹²⁷</u>	66
1) <u>M3todo general</u>	67
2) <u>Determinaci3n de I¹²⁷ y PBI¹²⁷ en plasma de ratas</u>	70
3) <u>Determinaci3n de Iodo en tiroides</u>	71
C - <u>Valoraci3n de glucosa en plasma</u>	71
D - <u>Valoraci3n de Insulina en plasma</u>	75
E - <u>Valoraci3n de Hormona Tirotr3pa</u>	78
F - <u>Valoraci3n de Hormona de Crecimiento (GH)</u>	79
III - <u>CALCULO ESTADISTICO</u>	85
A - <u>Diferencia entre los valores medios de dos poblaciones</u>	85
B - <u>Ajuste a una recta por m3nimos cuadrados (Coeficiente de regresi3n)</u>	87
C - <u>Coeficiente de correlaci3n</u>	88
RESULTADOS Y COMENTARIOS	90
EXPERIMENTO I. <u>Efecto de la adrenalectom3a (altos niveles de ACTH) en el peso del tiroides de ratas control y de las tratadas con PTU</u>	91
EXPERIMENTO II. <u>Efecto de la adrenalectom3a (altos niveles de ACTH) en el bocio inducido por PTU o ClO₄K y en el metabolismo intratiroideo de I¹³¹</u>	99

EXPERIMENTO III. <u>Efecto de la adrenalectomía en el desarrollo del bocio inducido por PTU. Efecto de la administración de TSH y corticosterona</u>	111
EXPERIMENTO IV. <u>Efecto de la insulina sobre el peso del tiroides de ratas intactas (I) y adrenalectomizadas (\bar{A}) tratadas con ClO_4K ó PTU † ClO_4K</u>	118
EXPERIMENTO V. <u>Efecto de diferentes dosis de corticosterona sobre la función tiroidea de ratas tratadas con PTU</u>	128
EXPERIMENTO VI. <u>Efecto de la corticosterona en el peso del tiroides de ratas tratadas con PTU ó ClO_4K</u>	137
EXPERIMENTO VII. <u>Efecto de la administración de hidrocortisona sobre el peso del tiroides de ratas tratadas con diversos antitiroideos</u>	152
EXPERIMENTO VIII. <u>Efecto de la administración de anticuerpo anti-insulina sobre el peso del tiroides de ratas tratadas con PTU</u>	159
EXPERIMENTO IX. <u>Captación y metabolización del I^{131} por el tiroides a distintas horas del día</u>	163
DISCUSION	173
I - TAMAÑO DE LOS BOCIOS INDUCIDOS POR DIFERENTES ANTITIROIDEOS EN ANIMALES INTACTOS	174
II - EFECTO DE LA ADRENALECTOMIA (ALTOS NIVELES DE ACTH) SOBRE EL DESARROLLO DEL BOCIO INDUCIDO POR PTU ó ClO_4K	193

III - EFECTO DE LA INSULINA SOBRE EL PESO DEL TIROIDES DE RATAS INTACTAS Y ADRENALECTOMIZADAS CON ClO_4K ó $\text{PTU} \downarrow \text{ClO}_4\text{K}$	199
IV - EFECTO DE LOS CORTICOIDES SOBRE LA FUNCION TIROIDEA	203
1) <u>Posibles alteraciones en los niveles de TSH circulantes</u>	207
2) <u>Posibles alteraciones en los niveles de GH</u> ...	207
3) <u>Posible implicación de las hormonas tiroideas</u>	208
4) <u>Posible aumento de la respuesta del tiroides al estímulo del TSH</u>	209
V - CAPTACION Y METABOLIZACION DEL I^{131} POR EL TIROIDES A DISTINTAS HORAS DEL DIA	210
CONCLUSIONES	218
BIBLIOGRAFIA	231

CLAVE DE ABREVIATURAS

LID	-----	Dieta pobre en Iodo
I	-----	Iodo
¹²⁷ I	-----	Iodo estable
¹³¹ I	-----	Iodo radioactivo
¹²⁵ I	-----	Iodo radioactivo
MIT	-----	Monoiodotironina
DIT	-----	Diiodotironina
I ⁻	-----	Ioduro
T ₃	-----	Triiodotironina
T ₄	-----	Tiroxina
MIT [*]	-----	Monoiodotironina marcada con radioiodo
DIT [*]	-----	Diiodotironina marcada con radioiodo
T ₃ [*]	-----	Triiodotironina marcada con radioiodo
T ₄ [*]	-----	Tiroxina marcada con radio- iodo
I ^{-*}	-----	Ioduro marcado con radioiodo

BEA	-----	Butanol-etanol-amoniaco
PTU	-----	Propiltiouracilo
MMI	-----	Metil-mercaptoimidazol
PBI	-----	Iodo ligado a proteínas
TCA	-----	Acido tricloroacético
TSH	-----	Hormona tirotrópica
GH	-----	Hormona de crecimiento
ACTH	-----	Hormona corticotrópica
Tris	-----	Trihidroximetil amino metano
TRH	-----	Hormona hipotalámica liberadora de hormona tirotrópica
GRH	-----	Hormona hipotalámica liberadora de hormona de crecimiento

INTRODUCCION

I - GENERALIDADES.

Smith y Smith en 1922, fueron quienes primeramente demostraron que la actividad de la glándula tiroidea dependía de una hormona segregada por la hipófisis. Estudiaron la función tiroidea en renacuajos hipofisectomizados, y encontraron que la actividad de esta glándula estaba muy disminuida tras la hipofisectomía, y se normalizaba o incluso se hipertrofiaba si inyectaban extractos hipofisarios bovinos a los renacuajos. Este tratamiento estimulaba al tiroides a segregar sus propias hormonas, lo que se ponía de manifiesto porque los renacuajos emprendían las distintas etapas de la metamorfosis. El hecho de que las hormonas tiroideas activaran el proceso de la metamorfosis había sido anteriormente descrito por Gudernatsch (1913). Posteriormente Smith (1926) desarrolló una técnica para hipofisectomizar ratas y demostró que los extractos del lóbulo anterior de la hipófisis tenían un efecto estimulante sobre la glándula tiroides. Desde entonces numerosas observaciones han confirmado que el funcionamiento del tiroides a nivel fisiológico depende del efecto estimulante de la tirotrópina (TSH) segregada por la hipófisis.

A pesar de las dificultades experimentales para valorar el contenido hormonal de fluidos biológicos, algunos años más tarde Aron y cols. (1931) pusieron de manifiesto que la falta de hormonas tiroideas estimulaba la secreción de tirotrópina, mientras que un exceso producía un efecto inhibitor sobre la secreción de dicha hormona hipofisaria. Fue entonces establecido que, en condiciones fisiológicas, la función de ambas glándulas estaban interrelacionadas de tal manera que el nivel de cada una de ellas en plasma determi-

na la velocidad de secreción de la otra. En tal sistema, una alteración en el balance entre las cantidades de hormonas tiroideas disponibles y los requerimientos del organismo, provoca una respuesta en la glándula hipofisaria, que actuaría para neutralizar el efecto perturbador. Sobre todo en situaciones de ineficiencia tiroidea, el tiroides sería intensamente estimulado por un aumento de los niveles de TSH en plasma. El estudio de la respuesta tiroidea a factores que actúan sobre dicha glándula, dirigió la atención al estudio del aspecto homeostático del sistema que controla la función tiroidea. En 1949, Hoskins formuló su hipótesis sobre la existencia de un mecanismo de "feed-back" negativo entre las glándulas tiroides e hipófisis. Enfatizó la naturaleza homeostática del sistema que actuaba para mantener niveles estables de hormonas tiroideas en plasma. Así mismo, Hoskins manifestó que el nivel en el que las hormonas tiroideas se establecían dependía del nivel funcional de la glándula hipofisaria, y que el estado hipofisario no era invariable, sino que probablemente estaba influenciado por las condiciones ambientales.

En aquellos años, los trabajos de Green y Harris (1947 y Harris, 1948) pusieron de manifiesto la importancia del tallo hipofisario como enlace neurovascular entre la neurohipófisis y la adenohipófisis. Los trabajos de Harris demostraron la importancia del enlace neurovascular en el funcionamiento de la adenohipófisis, hecho que estimuló el estudio de nuevas técnicas e inició un amplio campo de investigación sobre el control en la secreción hipofisaria por el hipotálamo.

El estudio del control del hipotálamo sobre el eje hipó-

fisis-tiroides se intensificó en el año 1951 con los trabajos de Greer (1951, 1954, 1956) quien produciendo lesiones en el hipotálamo de ratas, demostró una severa alteración de la función tirotrópica de la hipófisis y consecuentemente de la glándula tiroidea. Los años siguientes son un tiempo de intensa investigación de la acción del sistema nervioso central y del hipotálamo en particular sobre el control de la función tiroidea. El control del hipotálamo sobre el sistema hipófisis-tiroides es claro. Parece que una de las acciones del hipotálamo es alterar el nivel funcional hipofisario, el cual determina a su vez el nivel a que es regulada la función tiroidea.

Quedó pues establecida por Hoskins la existencia de un servomecanismo negativo en el sistema hipófisis-tiroides. La tirotrópina no parece que juegue un papel esencial en el proceso por el que el tiroides sintetiza y segrega sus propias hormonas. La acción de la tirotrópina es acelerar la velocidad de los procesos que las células tiroideas son intrínsecamente capaz de realizar en una situación de "reposo" en donde no recibe ningún estímulo de la tirotrópina hipofisaria. Su acción consiste en acelerar los procesos ya existentes.

Las células tirotrópicas están sujetas principalmente a dos influencias que determinan el nivel a que estas células trabajan. Una es ejercida por el hipotálamo, que llega al lóbulo anterior de la hipófisis a través del tallo hipofisario, y tiene un importante efecto estimulador sobre las células tirotrópicas. Aunque estas células pueden tener alguna capacidad intrínseca secretora de tirotrópina cuando están separadas del hipotálamo, el nivel a

que funcionan es mucho más bajo que en el caso de que exista dicha unión.

La segunda influencia que controla la actividad de las células hipofisarias productoras de TSH, es la cantidad de hormonas tiroideas metabólicamente activas. Esta acción es específica de las hormonas tiroideas. Ninguna otra hormona a nivel fisiológico tiene algún efecto; esto al menos parece ser cierto en ratas. Efectos inhibidores de los adreno-cortícoides sobre la secreción de tiotropina, se han observado con dosis muy altas de estas hormonas, muy por encima de sus niveles fisiológicos (Purves, 1964, a).

A continuación vamos a considerar la biosíntesis de las hormonas tiroideas, representada en la Fig. 1, y la acción inhibidora de algunos antitiroideos sobre ella. La etapa inicial de la síntesis de las hormonas tiroideas es la acumulación del iodo por el tiroides. La concentración del iodo por el tiroides no es específico de este órgano. Las glándulas salivares y la saliva, las glándulas mamarias y la leche, la secreción estomacal y el intestino delgado, la placenta y la piel son sitios donde se encuentra acumulación de iodo. Sin embargo, es muy diferente el proceso de concentración del ioduro por el tiroides o por los otros tejidos (Halmi y cols., 1956; Halmi, 1961; Brown-Grant, 1961). Anaerobiosis (Schachner y cols., 1944), baja temperatura (Slingerland, 1955), y agentes como el 2-4-dinitrofenol que desacopla la oxidación fosforilativa, inhiben la concentración del iodo por el tiroides, lo que sugiere que este proceso requiere energía (Freinkel e Ingbar, 1955). La concentración de ioduro por el tiroides

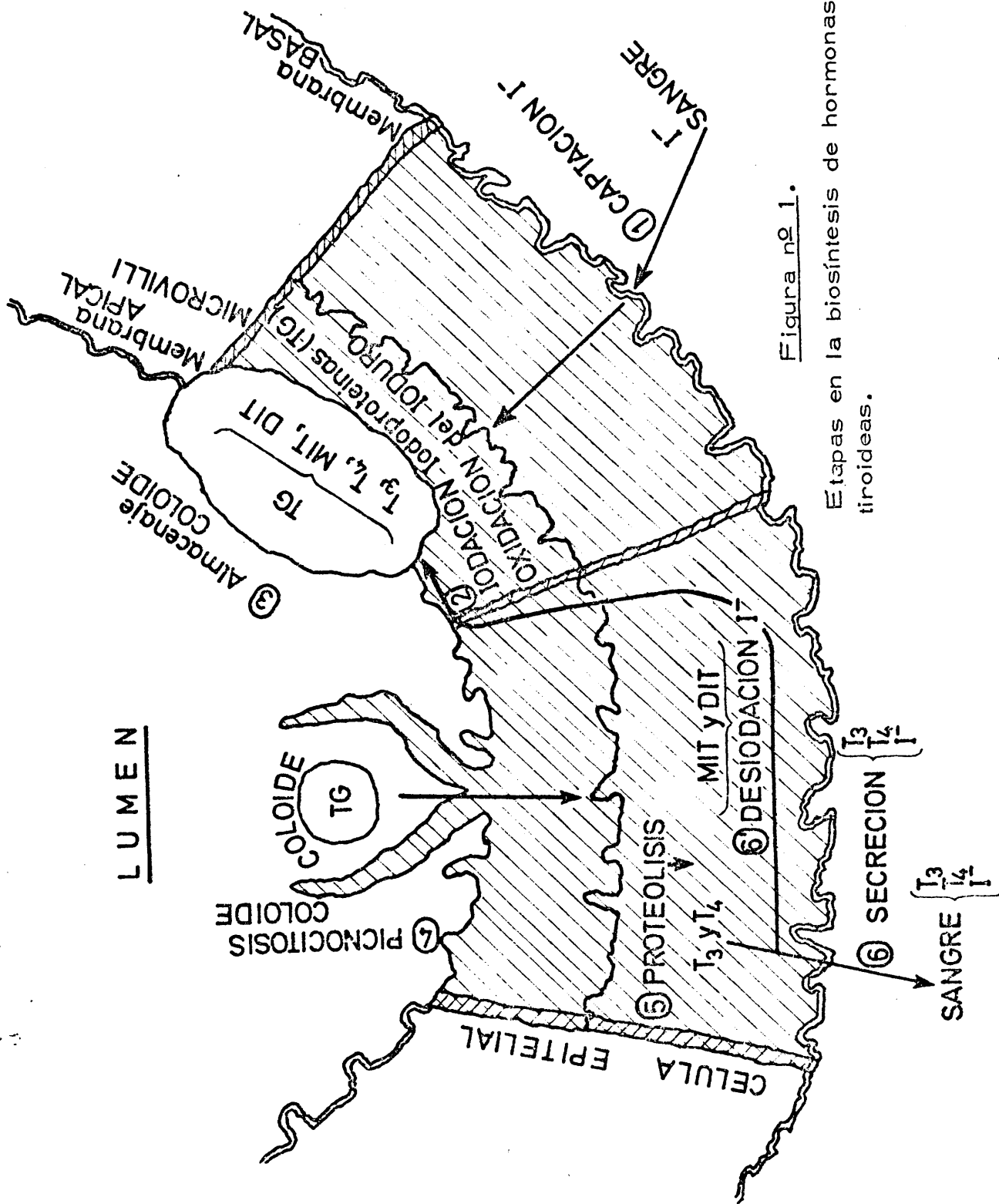


Figura nº 1.

Etapas en la biosíntesis de hormonas tiroideas.

es inhibida por iones monovalentes como el SCN^- o el ClO_4^- (Wolman, 1956; Wyngaarden y cols., 1952). Esta inhibición probablemente ocurre porque estos aniones, al tener una sola carga negativa y un volumen molecular similar al del ion yoduro, compiten con él a nivel de membrana, sitio esencial para el transporte de yoduro (Anbar y cols., 1959, a).

La segunda etapa de la biosíntesis de las hormonas tiroideas es la iodación de los grupos tirosílicos de la tiroglobulina. Está en discusión si esto ocurre en la célula o en el coloi-
de, pero hay más evidencia de que ello ocurre a nivel de las microvellosidades del borde apical de las células (Pastan, 1963; Tong y cols., 1962). Es generalmente aceptado que, antes del proceso de iodación, el yoduro debe ser oxidado al estado de I^{\dagger} (ion iodinium). Esta oxidación es realizada por una peroxidasa (Astwood, 1943), la cual requiere para su acción una fuente generadora de H_2O_2 . El I^{\dagger} así formado sustituye a los iones hidrógenos en posición orto respecto a la función fenólica de los residuos tirosílicos existentes en la tiroglobulina. Ciertas sustancias se comparten como antitiroideos por impedir o disminuir esta reacción de iodación. Dos grandes grupos pueden considerarse a este respecto, las tiocarbamidas y las sulfonamidas.

Las tiocarbamidas, con la tiourea como prototipo, tiene gran efecto antitiroideo por interferir con la iodación de los radicales tirosílicos. Según Pitt-Rivers (1960), las tiocarbamidas impiden la iodación de los radicales tirosílicos por su acción reductora, manteniendo el yodo en forma de I^- . Tanto el metabolismo de carbohidratos, como el de lípidos y proteínas, y la síntesis

sis de ácidos nucleicos no están interferidos por la acción de las tiocarbamidas. Astwood (1943) en un estudio de acción de drogas antitiroideas, presentó evidencias que apoyan que las tiocarbamidas actúan por inhibir la acción de la peroxidasa tiroidea.

Experimentos in vivo (McKenzie, 1947) e in vitro (Schaner y cols., 1944) con sulfonamidas, con la sulfoguanidina como prototipo, han demostrado que estas drogas inhiben la iodación de los radicales tirosílicos, pero no alteran la concentración de yoduro por el tiroides. Fawcett y Kirkwood (1953) postularon que estos compuestos inhiben la función tiroidea por formar compuestos moleculares con la forma activa del yodo, dentro del tejido tiroideo. También se ha sugerido que estos compuestos actúan como antitiroideos por inhibir la acción de la peroxidasa tiroidea (Rosenberg, 1953). El tiocianato es el único anión, que no sólo inhibe el transporte del yoduro, sino que a grandes dosis inhibe la iodación (Wolff y cols., 1946).

La tercera etapa de la biosíntesis de las hormonas tiroideas es el acoplamiento de las tirosinas iodadas para dar lugar a la formación de las iodotironinas: triiodotironina (T_3) y tetraiodotironina (T_4). El mecanismo exacto de la unión de iodotirosinas para dar lugar a la formación de iodotironinas es oscuro. El paso posterior es la hidrólisis de la tiroglobulina, por el cual quedan en libertad las hormonas tiroideas para ser segregadas.

Estas sustancias que deprimen o inhiben la biosíntesis de las hormonas tiroideas en algunas de sus etapas, son los llamados antitiroideos.

Los antitiroideos son sustancias que por interferir en la biosíntesis de hormonas tiroideas producen bocio. Como consecuencia de su acción, los niveles de hormonas tiroideas en plasma son bajos; disminuye así el freno que impide que la hipófisis responda plenamente a la estimulación hipotalámica, aumentando la secreción de TSH. Este aumento de los niveles en plasma de TSH estimula a su vez al tiroides a crecer en un intento de ser más eficiente. Si el compuesto antitiroideo tiene poca actividad o su acción es relativamente corta, el incremento compensativo en el tamaño y en la función del tiroides pueden ser suficientes para subsanar el efecto del antitiroideo, y mantener al organismo con cantidades normales de tiroxina. Este caso daría como resultado la producción de bocio, pero el animal sería eutiroideo. Mas, si la sustancia antitiroidea se administra en cantidad suficientemente grande o por largo tiempo, como para bloquear prácticamente la síntesis de las hormonas tiroideas, no le es posible al tiroides producir cantidad suficiente de hormonas en respuesta al vigoroso estímulo que recibe de los altos niveles de TSH. En este caso el tiroides aumenta de tamaño y el animal desarrolla bocio, siendo hipotiroideo.

II - ANTECEDENTES DIRECTAMENTE RELACIONADOS CON LA PRESENTE TESIS.

Si se consigue producir un hipotiroidismo intenso en un animal joven mediante el uso de antitiroideos, se observa que el tiroides se hipertrofia. La ausencia de las hormonas tiroideas en plasma ocasiona drásticos cambios en la hipófisis de dichos animales. Evans y cols. (1964) y Contopoulos y cols. (1963) han demostrado mediante estudios de la citología adenohipofisaria y por ensayos biológicos de las diferentes hormonas adenohipofisarias, que en animales desprovistos de hormonas tiroideas, bien por tiroidectomía quirúrgica o por tratamiento con bociógenos, la falta de crecimiento y la falta de maduración de las gónadas y de la corteza suprarrenal son atribuibles a una falta de la función de la hipófisis anterior. En las hipófisis de estos animales los niveles de hormona de crecimiento (GH), corticotropina (ACTH) y gonadotropinas (FSH y ICSH) y tiotropina (TSH) son muy bajos. Los niveles de GH, ACTH y gonadotropinas en plasma son así mismo extremadamente bajos, mientras que los de TSH son altos, como era de esperar por la ausencia de hormonas tiroideas que habitualmente ejercen un freno sobre la secreción de dicha hormona hipofisaria. En términos generales puede decirse que un animal intensamente privado de hormonas tiroideas desde muy joven es comparable a un animal "adenohipofisectomizado", excepto por el hecho de que los niveles de TSH en plasma son muy altos.

El grupo de Griesbach y Purves (1946) ha visto que las alteraciones de las acidófilas adenohipofisarias productoras de GH, observadas en ratas tiroidectomizadas, se regulan con dosis

de T_4 mucho más pequeñas que las necesarias para normalizar las basófilas productoras de TSH. Evans y cols. (1964, 1960) demostraron que esta normalización de las acidófilas va acompañada de la regularización en el crecimiento del animal. Es importante señalar que las dosis mínimas de T_4 necesarias para normalizar el crecimiento son muy inferiores a las que habitualmente se consideran como "dosis de sustitución", es decir, aquellas que regulan el metabolismo basal o deprimen los altos niveles de TSH en plasma del animal hipotiroideo hasta valores normales. Con dosis de $0,05 \mu\text{g}$ de T_4 por día, una rata tiroidectomizada puede crecer casi normalmente, normalizándose el número de acidófilas de su adenohipófisis. Mientras que hacen falta dosis unas 20 ó 30 veces superiores, aproximadamente de $1,7 \mu\text{g}/100 \text{ g}$ de peso por día para que estos animales tengan unos niveles de TSH y un metabolismo oxidativo normales. Las cantidades de T_4 necesarias para que puedan normalizarse las gónadas y la corteza suprarrenal son aun más bajas. La corteza suprarrenal de las ratas tiroidectomizadas muestran una notable sensibilidad a las hormonas tiroideas, advirtiéndose a dosis tan bajas como $0,01 \mu\text{g}/100 \text{ g}$ de peso por día, dosis que no influyen a ninguno de las otras glándulas "diana" estudiadas (Evans y cols., 1964). Estos datos ponen claramente de manifiesto, no sólo que la hipófisis puede considerarse como un tejido "diana" de las hormonas tiroideas, sino que es además el de mayor sensibilidad actualmente conocido.

Si cantidades tan pequeñas de hormonas tiroideas son suficientes para normalizar la adenohipófisis, se comprende que la interrupción del crecimiento y el desarrollo de las gónadas y

corteza suprarrenal sólo puedan ponerse de manifiesto en animales intensamente privados de dichas hormonas.

Todos estos hechos ponen de manifiesto cómo la carencia de una hormona afecta el contenido y la acción de otras hormonas. Muchos son los ejemplos que encontramos en la literatura de este hecho. Así por ejemplo, se ha visto que la administración de TSH a animales hipofisectomizados tiene muy poca acción sobre algunos parámetros de la función tiroidea (Alexander y Wolff, 1966), lo cual sin duda podría deberse a que en ausencia de otras hormonas hipofisarias o de hormonas producidas por glándulas dependiente de la hipófisis, el tiroides no puede responder plenamente al estímulo del TSH exógeno.

Numerosas veces se ha sugerido que la hipófisis anterior segrega más de una hormona(s) o factor(es) relacionados con la función tiroidea (Greer, 1952; Dobyms y Steelman, 1952; Levit, 1953). El grupo de Evans (1958) ha demostrado que la hormona de crecimiento intensifica la acción de la tirotropina sobre la calorigénesis en ratas hipofisectomizadas, y un mayor estímulo se obtiene si junto con TSH y GH se administran corticoides.

Es claro, que no es posible llegar al conocimiento profundo de cualquier acción hormonal sin tener en cuenta la acción de otras hormonas, idea resumida por Houssay (1955) en la siguiente frase: "En el estudio de la acción de una hormona debe tenerse en cuenta el balance e interrelación de otras hormonas. No es posible el estudio de una de ellas por separado. Lo que constituye sin duda uno de los aspectos más importantes y difícil-

les de la Endocrinología".

Desde muy antiguo se consideraba que en aquellas situaciones donde los niveles de TSH en plasma estaban elevados por la administración de un antitiroideo, existía una correlación entre estos y el tamaño del bocio producido. Este concepto clásico estaba tan firmemente establecido, que en los antiguos trabajos, se tomaba como medida de los niveles de TSH en plasma el tamaño del bocio desarrollado. Sin embargo, cuando estos niveles han podido ser medidos bien por bioensayo o actualmente por radioinmunoensayo, cada vez han ido apareciendo en la literatura más casos en donde no se encuentra correlación entre estos dos parámetros.

Así, Sellers y Schönbaum (1962, 1965) observaron en ratas tratadas con antitiroideos que el bocio desarrollado era mucho mayor, si junto con el antitiroideo administraban dosis muy pequeñas de T_4 o T_3 . Esta observación fue interpretada como prueba de que la administración a animales hipotiroideos de dosis pequeñas de hormonas tiroideas, aumentaba sus elevados niveles de TSH en plasma. Podría parecer que esta interpretación va en contra de lo que se deduciría a partir de la teoría clásica, según la cual hay un servomecanismo negativo (feed-back), que regula la secreción de TSH por la hipófisis y de la T_4 y T_3 por el tiroides. Pero en realidad no es así, y para comprenderlo mejor resulta útil considerar el esquema representado en la Fig. 2, propuesto por Purves (1964), en su revisión sobre las interrelaciones que se supone existen entre las secreciones de TSH y las hormonas del tiroides. Se ha asignado un valor unidad arbitrario a la

cantidad de T_4 y T_3 asequible al organismo en condiciones fisiológicas normales y a la velocidad de secreción de TSH que le corresponde. Se indica, cómo muy pequeñas variaciones en la cantidad de hormonas tiroideas asequibles al organismo van acompañadas de cambios muy intensos en la secreción de TSH. Un aumento de T_4 de aproximadamente el 5 % por encima del valor unidad, da lugar a la supresión total de la secreción de TSH. Asimismo, basta una disminución de T_4 del mismo orden, para desencadenar un brusco aumento de la secreción de TSH. Estas relaciones inversas entre las hormonas tiroideas y el TSH existente alrededor de las concentraciones fisiológicas, representadas esquemáticamente en la Fig. 2, están ampliamente documentadas por valoraciones directas de las concentraciones circulantes de ambas hormonas. Parece que disminuciones o aumentos en las cantidades de T_4 asequibles al organismo ya no van acompañadas de cambios de mucha mayor intensidad que los producidos por variaciones relativamente pequeñas por debajo o por encima de las cantidades fisiológicas.

Este esquema destaca que el servomecanismo o "feedback" negativo entre las hormonas tiroideas y el TSH funciona para asegurar niveles normales de estas hormonas. Pero no debe extrapolarse a situaciones muy alejadas de las fisiológicas. Así por ejemplo, no se sabe lo que ocurre con la secreción de TSH en aquellas zonas de concentración de T_4 en la que se va llegando a la deficiencia absoluta de las hormonas tiroideas, (zona entre el eje de ordenadas y la línea B). Por esto en el esquema está incluida la línea de trazo interrumpido, que refleja la creencia, bastante generalizada, de que la secreción de TSH en animales inten-

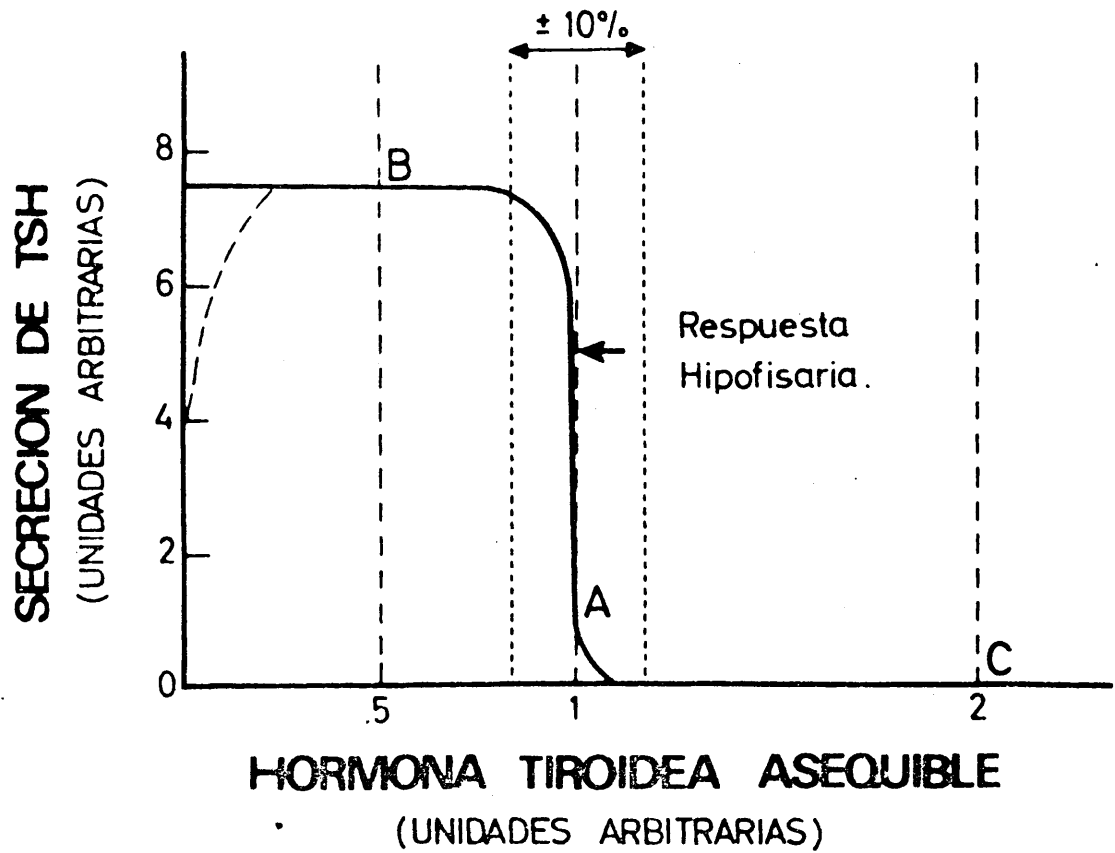


Figura nº 2.

Esquematización de las interrelaciones entre las hormonas tiroideas y el TSH. Modificación del esquema de Purves (1964). La curva de trazo continuado representa la respuesta de la hipófisis a cambios en las cantidades de hormonas asequibles al organismo.

samente hipotiroideos no llega a ser tan elevada como en los animales en los que no hay una deficiencia tan aguda. O sea, que la adenohipófisis del animal intensamente hipotiroideo, privado de hormonas tiroideas, no llega a sintetizar suficiente TSH para poder mantener una velocidad máxima de secreción de esta hormona. De acuerdo con esta hipótesis la deficiencia de hormonas tiroideas no sólo afectaría a hormonas adenohipofisarias como GH, ACTH y gonadotropinas, sino a las células productoras de TSH.

La idea de que los niveles de TSH circulante aumentan en animales intensamente hipotiroideos cuando se administra pequeñas cantidades de T_4 , no se derivan de la medida directa de esta hormona en plasma, sino que se extrapola a partir de las variaciones observadas en el tamaño del bocio, usando ratas en las que el hipotiroidismo se inducía con antitiroideos. En el único caso (Contopoulos y Koneff, 1963) en el que se realizaron medidas de TSH en plasma de animales tiroidectomizados, antes y después de administrarles pequeñas dosis de T_4 , no se encontraron aumento en los niveles de TSH, aunque este tratamiento sí había aumentado los niveles de GH y gonadotropinas en plasma e hipófisis. Ahora bien, como utilizaron ratas tiroidectomizadas, no pudieron observar si en sus experimentos la administración de T_4 hubiese dado lugar a un aumento del tamaño del bocio, como ocurría en los de Sellers y Schönbaum (1962, 1965).

Otra posible explicación de los resultados de Sellers y Schönbaum, sería que el tiroides de los animales que reciben pequeñas dosis de T_4 es más grande que el de los animales intensamente hipotiroideos, porque en los primeros se han normalizado

los niveles de otras hormonas de la adenohipófisis, y como consecuencia, los de las hormonas producidas por glándulas dependientes de ella. Esta normalización contribuiría a que el tiroides pueda responder mejor al estímulo producido por los altos niveles de TSH. En otras palabras, si el hipotiroidismo se hace tan intenso que disminuyen o se anulan la mayor parte de las funciones de la adenohipófisis, y como consecuencia de ello, las de las glándulas endocrinas dependientes de ella, el tiroides no puede crecer al máximo posible en respuesta al gran estímulo que recibe de los altos niveles de TSH. Esta idea está resumida en la Fig. 3. La posibilidad I recoge en esquema la idea de que el aumento de bocio en animales tratados con dosis pequeñas de T_4 se debe a un aumento de TSH. La posibilidad II recoge la idea de que los niveles de TSH son los mismos, pero se normaliza un factor X, que actúa sinérgicamente con el TSH.

Escobar del Rey y cols. (1968) trabajando con ratas intensamente hipotiroideas comprobaron que al cabo de 20 días de iniciado el tratamiento se producía, junto con la parada del crecimiento corporal, una desaparición del contenido de GH en hipófisis, puesto de manifiesto por electroforesis en gel de poliacrilamida. Este hipotiroidismo intenso lo consiguieron sometiendo a las ratas desde el destete a una dieta pobre en iodo, exenta de proteínas animales, y tratándolas con ClO_4K . Este compuesto actúa como anti-tiroideo por impedir la entrada de iodo en el tiroides, y como consecuencia, se dificulta la síntesis de T_4 y T_3 . Asimismo, comprobaron que en estos animales tan deprivados de hormonas tiroideas, los niveles de insulina, valorados por radioinmunoensayo, eran bajos. Si a estos animales se les inyectaba a diario pequeñas dosis

ALTERACIONES EN ANIMALES INTENSAMENTE HIPOTIROIDEOS.

EFFECTOS DE DISTINTAS DOSIS DE L-TIROXINA.

DOSIS T ₄	0	0.1µg/100g	1.5-1.7µg/100g
Crecimiento	nulo	casi normal	normal
Maduración cort. suprarr.	"	normal	"
Gonadas	"	"	"
Metab. basal	bajo	bajo	"
Hormonas adenohipofisarias			
GH	casi nula	casi normal	normal
ACTH	" "	normal	"
FSH, LH	" "	normal	"
TSH(plasma)	alto	alto	"
TIROIDES	grande	Muy grande	normal

CONCLUSIONES

Dosis pequeñas de T₄ son bociogenicas en animales intensamente hipotiroideos.

?Cual es el posible mecanismo?

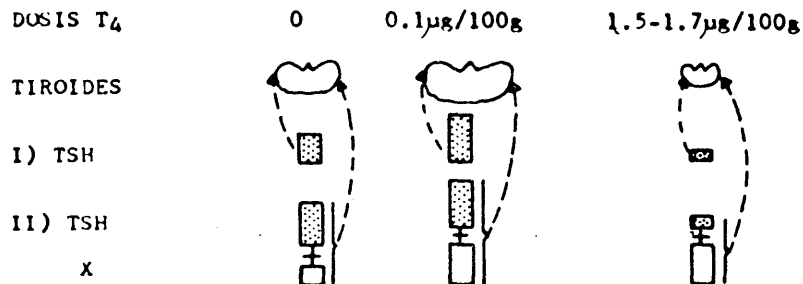


Figura nº 3.

Resumen de los efectos de pequeñas dosis (0,1-0,2 µg/100 g) de T₄ y dosis de "sustitución" (1,5-1,7 µg/100g) en animales intensamente hipotiroideos, resaltando su acción sobre el peso del tiroides. Para explicar estos cambios se propone: 1º Los cambios en el peso del tiroides se deben a variaciones en los niveles de TSH circulante y 2º la respuesta ponderal del tiroides a los niveles de TSH requiere niveles normales de un Factor X.

de T_4 , volvían a crecer y reaparecía la banda correspondiente a la GH en los extractos hipofisarios, a la vez que se normalizaban los niveles de insulina. Junto a estas variaciones se observó que sus tiroides aumentaron de tamaño. Por ensayo biológico de los niveles de TSH en el plasma de estos animales, vieron que dicho aumento del peso del tiroides tenía lugar sin que se detectara un aumento en los ya elevados niveles de TSH.

Por lo tanto hay prueba experimental de que al menos dos hormonas de importante papel en la síntesis de proteínas (GH e insulina) se normalizaban cuando se trataron ratas intensamente hipotiroideas con dosis muy pequeñas de T_4 . En estas condiciones el tiroides crece más, fenómeno que requiere una intensa síntesis de proteínas. Además, este crecimiento ocurrió sin que se detectaran aumentos en los niveles de TSH circulante, hecho de la máxima importancia.

Alexander y Wolff (1966) estudiando la producción de bocio por distintos antitiroideos, pusieron de manifiesto una vez más que, en algunas situaciones experimentales, no existía correlación entre el tamaño del bocio producido y los niveles de TSH en plasma. Alimentando ratas jóvenes con una dieta de bajo contenido en iodo, suplementada con diversos antitiroideos, bien uno a uno, bien mezclados, encontraron que los animales desarrollaban bocios de diferentes tamaños según la droga o mezclas de drogas usadas. A pesar de las diferencias en el tamaño del bocio, los distintos parámetros de la función tiroidea que midieron, PBI¹²⁷, contenido de iodo en tiroides, niveles de TSH en plasma, captación de I¹³¹ por el tiroides y organificación, estaban igualmen-

te alterados. Esto demostraba que en los distintos grupos de ratas tratadas con los diferentes bociógenos empleados, la síntesis de hormonas tiroideas había sido igual e intensamente inhibida, y que los distintos grupos de animales presentaban un hipotiroidismo de grado muy semejante. Vieron que la administración de drogas bociogénicas como el PTU o el SCNK daban lugar a bocios de mucho mayor tamaño que los inducidos por drogas como el ClO_4K o el ReO_4K . Aun más difícil de explicar mediante los conceptos clásicos sobre la relación entre los niveles de TSH circulante y el tamaño del bocio, era la observación de que ratas tratadas con ambos tipos de drogas, como PTU \ddagger ClO_4K , el bocio era de tamaño intermedio al producido por los dos tratamientos aislados. En estos animales era de suponer que el hipotiroidismo fuese más intenso que en las ratas tratadas con una sólo droga, puesto que la síntesis de hormonas tiroideas quedaba bloqueada por dos mecanismos distintos. Efectivamente, el nivel de TSH en plasma era algo más alto que en el caso del tratamiento con cada una de las drogas por separado. A pesar de ello, el bocio inducido por PTU \ddagger ClO_4K o PTU \ddagger ReO_4K , era más pequeño que el obtenido con PTU sólo. Estas observaciones están esquematizadas en la Fig. 4. Dos posibles explicaciones cabían para los resultados de estos autores. En primer lugar, la posibilidad de que los niveles de TSH circulantes hubiesen sido más elevados en los animales a PTU o SCNK que en los animales a ClO_4K o ReO_4K durante parte del periodo de tratamiento anterior a los 19 días, único momento en que Alexander y Wolff habían medido esta hormona. La segunda posibilidad podría ser que los animales tratados con PTU o SCNK, que desarrollan bocios grandes, mantuvieran alguna (s) hormona (s) o factor (es) hipofisario, o hormonas producidas por glándulas de-

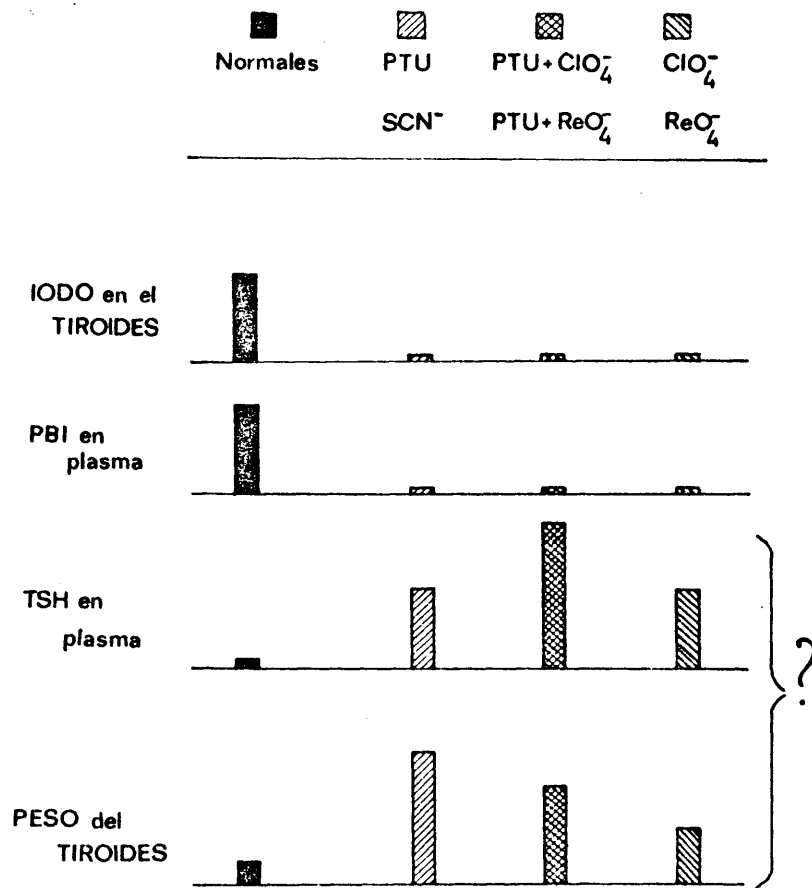


Figura nº 4.

Representación esquemática de las observaciones de Alexander y Wolff (1966).

pendientes de la hipófisis (hipotético factor X de la Fig. 3) en niveles más altos que en los animales a ClO_4K o ReO_4K , que desarrollan bocios pequeños, permitiendo un mayor desarrollo del tiroides en presencia de niveles de TSH igualmente altos.

Jolín y cols. (1968) investigaron la primera de estas dos posibilidades. Encontraron que los niveles de TSH eran igualmente altos en todos los tiempos comprendidos entre 6 y 24 días de tratamiento, y que en todos estos intervalos, los grupos de ratas que recibían las dos drogas, tenían los niveles de TSH más altos que los sometidos a cada una de las drogas por separado, a pesar de lo cual el tamaño del bocio era intermedio. Estos resultados se resumen en la Fig. 5. En ella se pone de manifiesto que los animales a PTU desarrollan bocios mayores que los de los animales a PTU + ClO_4K . Al estudiar los niveles de insulina en plasma de estas ratas, encontraron que los animales a PTU mantenían niveles significativamente más altos que los animales a ClO_4K o PTU + ClO_4K . Asimismo, demostraron que existía una correlación positiva entre el peso del tiroides y los niveles de insulina en plasma.

A partir de estos hallazgos sobre los niveles de insulina de ratas tratadas con estas drogas bociógenas, fue necesario aclarar: 1º.- Si los niveles bajos de insulina encontrados en ratas a ClO_4K o ReO_4K eran debidos al hipotiroidismo en sí, o al modo de producirlos, y 2º.- si los niveles altos de insulina en plasma de los animales tratados a PTU eran igualmente debidos al hipotiroidismo o a la administración de esta droga.

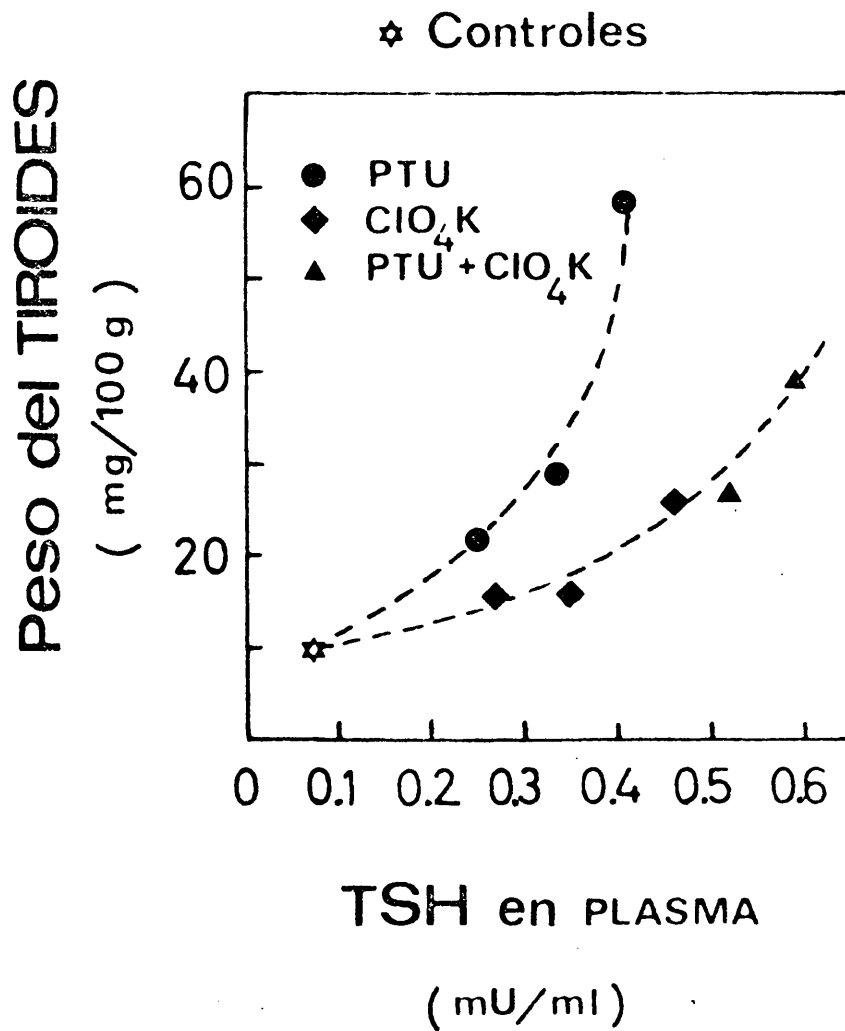


Figura nº 5.

Resumen de los hallazgos de Jolín y cols. (1968) que indican que para un mismo valor de TSH en plasma, las ratas a PTU tienen bocios mayores que los animales a ClO₄K o PTU + ClO₄K, tanto a los 6 como a los 19 y 24 días de tratamiento con estos bociógenos.

Para aclarar estos puntos estudiaron los niveles de insulina en plasma de animales con un hipotiroidismo "puro", o sea, en animales tiroidectomizados (Jolín y cols., 1970). Encontraron que los animales tiroidectomizados mantenían niveles de insulina en plasma muy bajos, lo que se ponía de manifiesto a partir de los 12 días de la extirpación del tiroides. Por el contrario, en ratas normales en fase de crecimiento había una correlación positiva entre los niveles de insulina circulantes y el peso corporal de los animales. La administración de pequeñas dosis de T_4 a ratas tiroidectomizadas aumentaron sus niveles de insulina hasta los valores encontrados en animales normales (Fig. 6). Con estas dosis de T_4 se reinició el crecimiento de los animales, inhibido anteriormente por la tiroidectomía. A la vez aumentaba claramente el contenido de GH de sus hipófisis, hormona que en el animal tiroidectomizado había desaparecido totalmente.

La administración de drogas como ClO_4K o ReO_4K daba lugar a niveles de insulina en plasma muy parecidos a los encontrados en ratas tiroidectomizadas, y más bajos que los de animales controles de la misma edad. Por el contrario, los animales tratados con PTU o SCNK mantenían niveles de insulina en plasma altos. En algunos casos como, por ejemplo, tras corto tiempo de tratamiento, estos niveles eran incluso más altos que los de ratas controles de la misma edad. Al aumentar el tiempo de tratamiento con estas drogas, los animales presentaban niveles de insulina más bajos que sus controles, debido sin duda a que, al aumentar el grado de hipotiroidismo, éste afectaba el mecanismo por el cual el PTU producía niveles de insulina altos.

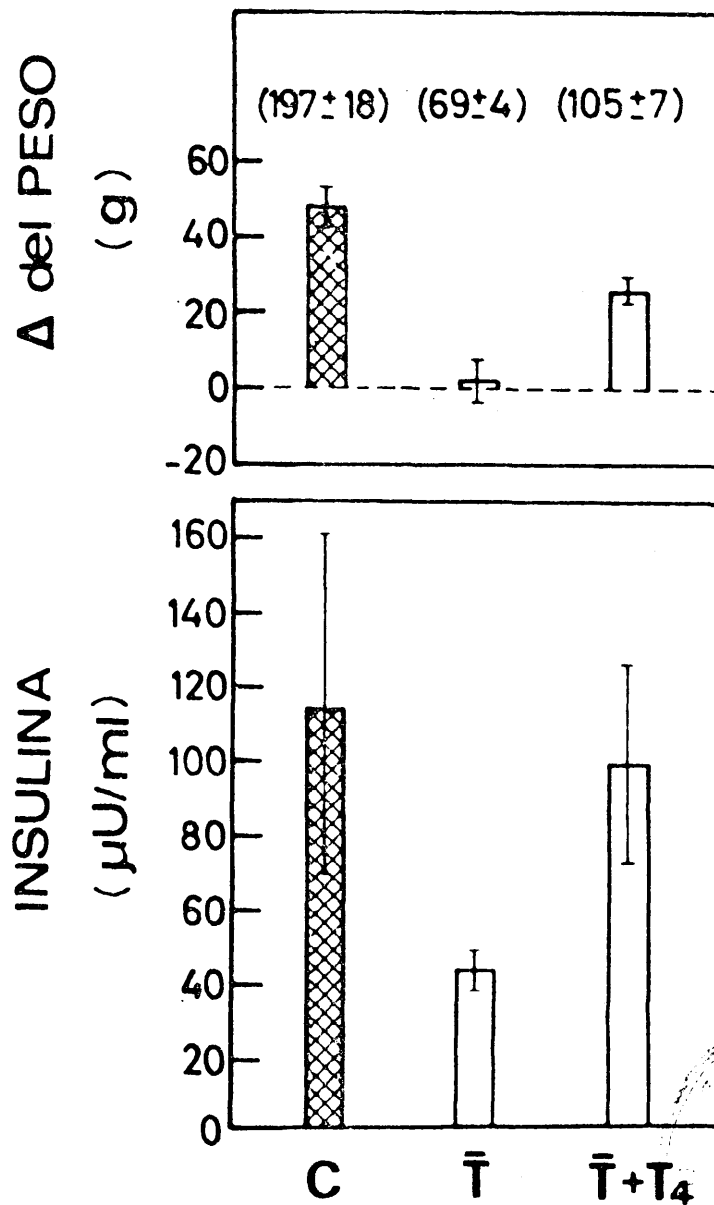


Figura nº 6.

Peso corporal y niveles de insulina en ratas controles (C), tiroidectomizadas (\bar{T}) y tiroidectomizadas tratadas con 0,2 μg de L-T₄/100 g/rata/día ($\bar{T} + T_4$) durante 12 días, después de 10 horas de ayuno y 1/2 hora de inyectadas con L-T₄. Los animales se tiroidectomizaron 35 días antes de iniciar el tratamiento con T₄, y estuvieron sometidos a una dieta pobre en iodo (\bar{T}), o suplementada con iodo (Controles). Los datos presentados son medias \pm D.E. de ratas/grupo.

Evaluando estadísticamente el conjunto de los datos obtenidos en animales tratados con diversas drogas bociógenas durante más de 12 días, estos autores encontraron que había una correlación altamente significativa entre el peso del tiroides y el nivel de insulina en plasma, tanto si consideraban los valores del peso del tiroides en mg como si lo referían a 100 g de peso corporal ($r = 0,56$, $p < 0,001$ y $r = 0,46$, $p < 0,001$, respectivamente).

Si la insulina estaba implicada en el mecanismo por el que drogas como el PTU y el SCNK producen grandes bocios, inyectando insulina a animales sometidos a aquellas drogas que producen bocios pequeños, debería afectar el tamaño del tiroides, aumentándolo. Efectivamente, inyectando 0,2 U de insulina/rata/día a ratas tratadas con PTU + ClO_4K , se produjo un aumento significativo en el peso del tiroides con respecto a los animales tratados sólo a PTU + ClO_4K , y este efecto se producía sin inducir cambios en los niveles de TSH circulantes. Esta acción de la insulina se modificaba por el grado de hipotiroidismo de los animales. Así, en ratas ligeramente hipotiroideas, con un contenido de GH en hipófisis del 80 % del de sus controles en el momento de iniciar la administración de insulina, ésta indujo un aumento significativo en el peso del tiroides. En animales medianamente hipotiroideos, cuyo contenido de hormonas de crecimiento en hipófisis en el momento de iniciar el tratamiento con insulina, era sólo del 30 % del valor de sus controles, el efecto de este tratamiento no fue tan intenso como en el caso anterior, aunque significativo. Animales tratados con anti-tiroideos durante 20 días antes de iniciar el tratamiento con insulina, había un hipotiroidismo intenso: el contenido en hormona de crecimiento hipofisario era menor del 5 % del de los controles. En es-

tos animales la administración de insulina no tuvo efecto en el peso del tiroides (Fig. 7). Además, el efecto de la insulina sobre la respuesta ponderal del tiroides a altos niveles de TSH, se inhibía si la insulina se inyectaba en glucosa isotónica (Fig. 8).

De estos resultados los autores concluyeron:

- 1º.- Que la acción de la insulina sobre la glándula tiroides no es directa.
- 2º.- Que este efecto lo ejercía a través de su acción hipoglucémica.
- 3º.- Que en su mecanismo estaban implicadas alguna (s) hormona (s) o factor (es) hipofisario, o hormonas producidas por glándulas dependientes de la hipófisis, cuyos niveles disminuyen o incluso se anulan a medida que el hipotiroidismo se hacía más intenso.

De los resultados y consideraciones expuestos, se deduce que la acción del TSH sobre el tiroides puede ser modificada por la presencia o ausencia de otras hormonas hipofisarias o por las producidas por glándulas dependientes de ella. El efecto de la insulina aumentando el peso del tiroides de ratas tratadas con bociógenos sugerían fuertemente que esas hormonas podrían ser la GH o el ACTH, bien directamente o a través del aumento que produce en los niveles plasmáticos de glucocorticoides.

Recientes estudios, con una gran base experimental,

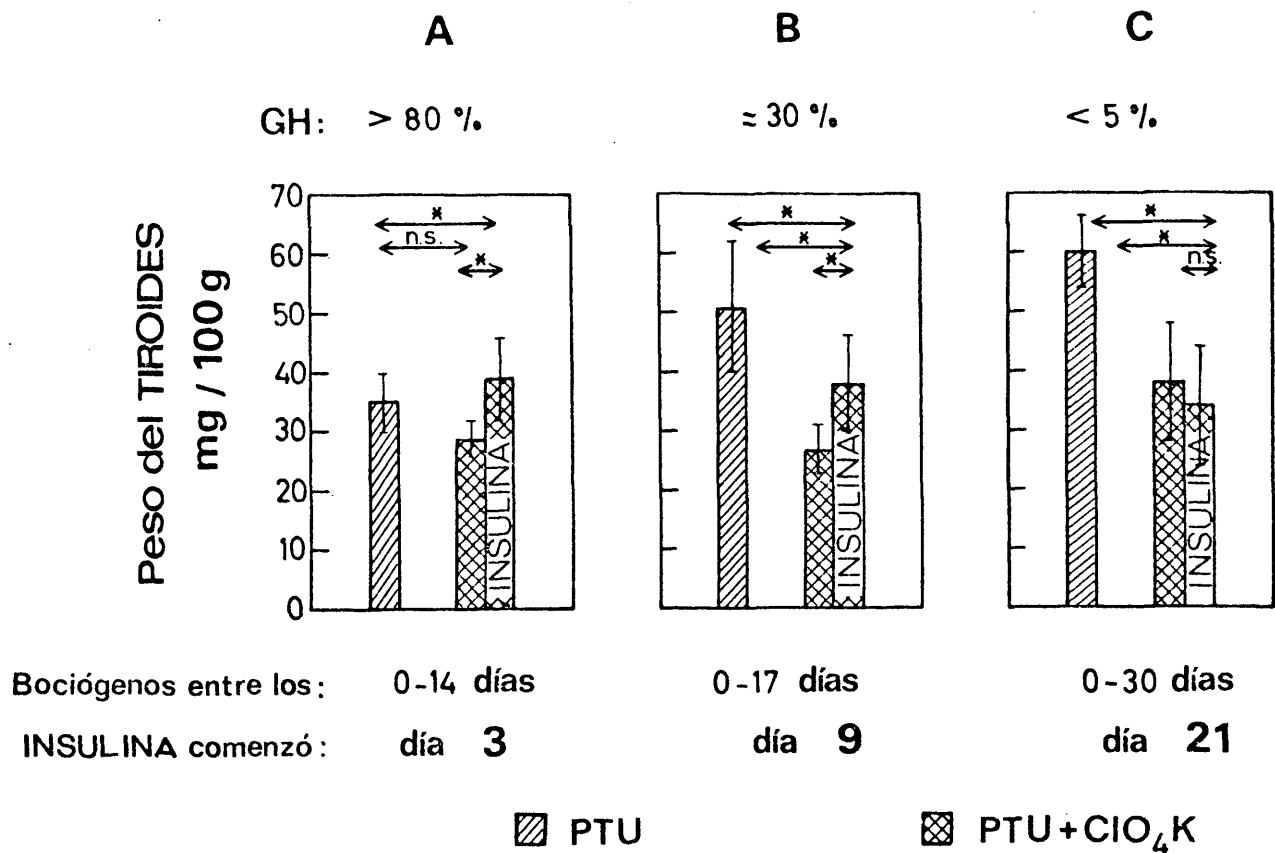


Figura nº 7.

Efecto de 0,2 U de insulina/rata/día sobre el peso del tiroides de ratas previamente tratadas con PTU o PTU + ClO₄K. La administración de insulina se empezó a los 3, 9 ó 21 días después de iniciado el tratamiento con bociógenos, cuando el contenido de GH hipofisario era del 80,30 ó 5 % respectivamente del de los controles de su misma edad. Los datos presentados son medias \pm DS. El asterisco indica la significatividad de las diferencias entre dos grupos: * : p < 0,05; n.s. : no significativo (p > 0,05)

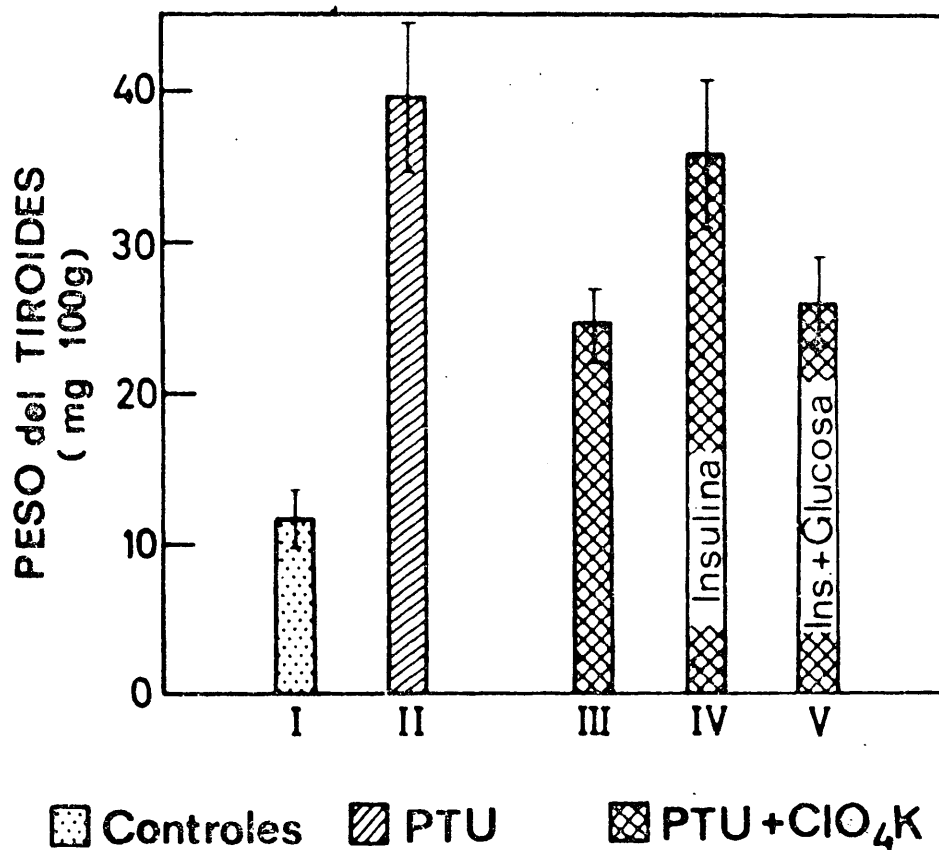


Figura nº 8.

Efecto de 0,5 ml de glucosa isotónica + 0,2 U de insulina sobre el peso del tiroides de ratas tratadas con PTU + ClO₄K. El tratamiento con insulina o insulina + glucosa se inició dos días después del de bociógenos, continuándose durante 13 días. Los datos presentados son medias ± DS.

han demostrado que, al contrario de lo que ocurre en primates, en roedores no se ha podido poner de manifiesto un aumento de los niveles de GH en plasma por radioinmunoensayo, tras la hipoglucemia inducida por insulina (Glick, 1969); aunque si se ha encontrado una disminución del contenido de GH en hipófisis y del GH-RH, factor hipotalámico que estimula la secreción de GH hipofisaria (Katz y cols., 1967). Sin embargo, está claramente demostrado que la hipoglucemia inducida por insulina produce un claro y rápido aumento de los niveles de corticoides en plasma, presumiblemente a través de un aumento de la secreción de ACTH (Kraicer y Logothetopoulos, 1963).

Estas consideraciones nos han llevado a estudiar la acción del ACTH y glucocorticoides sobre algunos parámetros de la función tiroidea, y sus posibles implicaciones en el mecanismo por el cual la insulina aumenta el tamaño de los bocios de ratas tratadas con antitiroideos, sin producir variaciones en los niveles de TSH.

Consideramos conveniente presentar algunos de los hallazgos encontrados en la literatura relativos, a la acción de estas hormonas sobre algunos parámetros de la función tiroidea.

III - EFECTOS DEL ACTH Y GLUCOCORTICOIDES SOBRE LA FUNCION TIROIDEA.

En los últimos años de la década de los cuarenta, se inició un gran interés en el estudio de las interrelaciones entre las glándulas tiroides y adrenales, en situaciones donde se había producido una activación de esta última, como en el stres y el frío. En los años 1949 y 1950 el ACTH y la cortisona pudieron obtenerse en cantidades adecuadas, lo cual permitió a muchos investigadores dirigir sus esfuerzos al estudio de estos agentes sobre la función tiroidea.

Las tablas 1a, b, y c, resumen los principales hallazgos sobre este campo. Como se ve, la literatura presenta numerosos resultados irreconciliables y aparentemente contradictorios. Del estudio de ellos, no es posible llegar a concluir los efectos del ACTH y corticoides sobre la función tiroidea, y mucho menos sobre los posibles mecanismos implicados en estos efectos. En los numerosos trabajos consultados, encontramos una variedad de variables experimentales, edad raza, diferentes dietas y líquidos de bebida, diferentes dosis, modo de administrarla y duración del tratamiento. Sobre todo las dosis empleadas son especialmente llamativas, van desde 2,5 mg hasta 25 mg/rata/día, cantidades todas ellas muy por encima de los posibles niveles fisiológicos de estas hormonas en plasma. Además, en ninguno de los casos consultados, se empleó corticosterona, que es el glucocorticoide con acción hormonal en roedores.

TABLA 1a.- Efectos de la Cortisona y del ACTH sobre la función Tiroidea de ratas normales.

Autores	Tratamiento	Días	Efectos
van Middlesworth	Cortisona 36 mg	2	Disminuye captación I ¹³¹ Disminuye PBI ¹³¹
Verzar	Cortisona 2,5 mg/día	2	Disminuye captación I ¹³¹
Bondy	Cortisona 12,5 mg/día	3	Disminuye PBI ¹³¹
Eoller	ACTH 5 mg/día	4	Disminuye captación I ¹³¹
Albert	Cortisona o ACTH 2 mg/día	5	Disminuye captación I ¹³¹ Ningún efecto en la secreción de I ¹³¹
Perry	Cortisona 2,5 mg i.p. y 2,5 mg sc./día ACTH 4 mg/día	7	Disminuye captación I ¹³¹ Ningún efecto en la secreción de I ¹³¹
Money	Cortisona 5 6 10 mg/día	10	Disminuye captación I ¹³¹
Halmi	Cortisona 8 mg/día	10	Ningún efecto en el cociente I tiroides / I suero
Mercier-Parot	Cortisona 5 mg/día	12	Inactivación tiroidea (histología)
Catz	Cortisona 5 mg/día	15	No cambia la captación I ¹³¹ Aumenta la altura de las células acinares.
d'Angelo	Cortisona 2,5 mg/día	15	No altera los niveles de TSH en plasma e hipófisis
Halmi	Cortisona 5 mg/día	20-83	PBI no cambia. Activación histológica del tiroides. Disminución del Iodo en tiroides
Migeon	Cortisona 4 mg/día	28	No cambia la captación I ¹³¹
O'Neal	Cortisona 3 mg/día	30	No disminuye el PBI. Indicio de aumento de altura de las células

TABLA 1b.- Efectos de la cortisona y del ACTH sobre la función tiroidea de ratas tratadas a bociógenos.

Autores	Tratamiento	Días	Efectos
D'Angelo (1953)	Cortisona 2, 5 mg/día	18, 24	Aumenta peso tiroides Aumenta niveles TSH en plasma
Lederer (1952)	Cortisona 3 mg/día	15	Aumenta peso tiroides
Cheymol (1952)	Cortisona 2, 5 mg/día	12	Aumenta peso tiroides
Gabrielove (1952)	ACTH 2, 5 mg/día	12	Disminuye peso tiroides
	Cortisona 5 mg/día	12, 22	No afecta peso tiroides
	Desoxicorticosterona 1 mg/día	12	No afecta peso tiroides
Halmi (1953)	Cortisona 10 mg/día	10	Ningún efecto cociente I tiroides / I plasma
Yatvin (1966)	Cortisona 5 mg/día	12	Aumenta peso tiroides Aumenta síntesis de pro-

TABLA 1c.- Efecto de la cortisona y del ACTH en ratas hipofisectomizadas tratadas con TSH exógeno.

Autores	Tratamiento	Días	Efectos
Woodburry (1951)	ACTH Cortisona		Disminuye captación I ¹³¹ Disminuye captación I ¹³¹
Halmi (1953)	Cortisona 5 mg/día	10	Ningún efecto cociente I tiroides/l suero
Ingbar (1953)	Cortisona 6,25 mg/ /día; 12,5 mg/día; 25 mg/día	5	Ningún efecto cociente I tiroides/l suero Disminuye captación I ¹³¹

PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS DE LA PRESEN-
TE TESIS

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Los resultados encontrados en la literatura confirman la opinión de que una deficiencia extremada en hormonas tiroideas afecta una gran parte del sistema endocrino del animal, al disminuir notablemente la secreción de la mayoría de las hormonas de la adenohipófisis (Contopoulos y Koneff, 1963; Evans y cols., 1964). También se pone de manifiesto, cómo la carencia de una hormona afecta el contenido y la acción de otras. Así Alexander y Wolff (1966), administrando TSH a animales hipofisectomizados, vieron que tenía poca acción sobre los parámetros tiroideos, lo que podría deberse a que en ausencia de otras hormonas hipofisarias o de hormonas producidas por glándulas dependientes de la hipófisis, el tiroides no puede responder plenamente al estímulo del TSH exógeno.

Esta misma idea está contenida en los trabajos de Greer (1952), Dobyns (1953), Levit (1954) y Evans y cols. (1958), quienes sugirieron que la hipófisis anterior segrega más de una hormona (s) o factor (es) relacionada con la función tiroidea. Todas estas investigaciones, junto con los trabajos de Sellers y Schönbaum (1962, 1965), confirmados posteriormente por Escobar del Rey y cols. (1968), parecen indicar que para que el tiroides pueda responder plenamente a altos niveles de TSH, se requiere la presencia de niveles adecuados de otras hormonas.

Por otra parte, experiencias realizadas en nuestro labo-

ratorio (Jolín y cols., 1968; Jolín y cols., 1970) indicaban que había una correlación positiva entre el peso del tiroides y el nivel de insulina circulante. Para esto cabía la siguiente interpretación. La mayor potencia bociogénica del PTU y SCN^- puede estar relacionada con el hecho de que inducen un estado endocrino más favorable para que sea máxima la respuesta ponderal del tiroides a los altos niveles de TSH. Si efectivamente, una máxima respuesta ponderal del tiroides requiere la presencia de niveles adecuados de otras hormonas, y dichos niveles son muy bajos en animales extremadamente hipotiroideos, se facilitaría ésta en animales a PTU o SCN^- , en los que por lo menos el nivel de insulina no está tan deprimido. Incluso, en algunos casos, se mantiene como el de los animales controles.

Consecuentemente con esta idea, la administración de insulina a ratas tratadas con aquellas drogas, como ClO_4K , ReO_4K o PTU + ClO_4K , que desarrollan bocios pequeños y a la vez mantienen niveles bajos de insulina, debería producir un aumento en el peso del tiroides sobre el desarrollado por los animales tratados sólo con bociógenos. Esta hipótesis fue satisfactoriamente confirmada (Jolín y cols., 1970).

El posible mecanismo, o mecanismos, por el que el tratamiento con insulina a ratas tratadas con antitiroideos induce un aumento en el peso del tiroides, en principio podría pensarse se debe:

1º A nivel de tiroides. La administración de insulina, o bien el tratamiento con antitiroideos que inducen niveles altos de esta hor-

mona en plasma, hacen que el tiroides pueda responder más eficazmente a los niveles de TSH. En la literatura nos encontramos con situaciones donde la acción del TSH está potenciada por la presencia de insulina. Nataff (1968) por estudios "in vitro" del metabolismo de los iodoaminoácidos en tiroides de fetos de ratas, encontró que la formación de tirosinas y tironinas iodadas aumentaban con la presencia de TSH en el medio de incubación, y que esta acción del TSH se potenciaba por la presencia de insulina.

2º A nivel de hipófisis. Inyectando insulina, o por tratamiento con drogas bociogénicas que producen niveles altos de insulina, debe producirse hipoglucemia que provocaría aumento en la secreción de GH, ACTH o quizás de otras hormonas hipofisarias, que bien directamente o aumentando la secreción de hormonas de las glándulas sobre las que a su vez actúan, hacen que los altos niveles de TSH en plasma sean más efectivos en la estimulación del crecimiento del tiroides.

A favor de esta 2ª posibilidad debe considerarse que la acción estimulante de la insulina sobre el peso del tiroides de ratas tratadas con drogas que producen bocios pequeños, es diferente según el grado de hipotiroidismo de los animales. Si la insulina se administra a ratas ligeramente hipotiroideas, cuyas hipófisis son aun capaces de sintetizar hormonas, se obtiene un efecto significativo. Por el contrario, si la insulina se administra a animales intensamente hipotiroideos en cuyas hipófisis hay una total degranulación de las acidófilas no se obtiene efecto alguno a nivel de peso de tiroides.

Por otra parte debe considerarse que la insulina tampoco produce efecto, incluso en animales que son sólo ligeramente hipotiroideos, si la hormona se da junto con glucosa isotónica. De donde se deduciría que este efecto de la insulina está mediado por su acción hipoglucémica.

Estos resultados sugirieron que el efecto de la insulina aumentando el peso del tiroides de ratas tratadas con antitiroideos: a) no era directo sobre el tiroides, b) lo efectuaba a través de su acción hipoglucémica y c) que necesitaba de la presencia de una hipófisis capaz de segregar sus propias hormonas.

A la vista de este planteamiento existente en la literatura, y para estudiar el mecanismo por el que la insulina aumenta la respuesta ponderal del tiroides a los mismos niveles de TSH se inició el presente estudio.

OBJETIVOS DE LA PRESENTE TESIS.

El estudio de los efectos del ACTH y glucocorticoides sobre la función tiroidea tenían especial interés, no sólo por el hecho de que ellos pudieran estar implicados en el mecanismo por el que la insulina aumenta el peso del tiroides de ratas tratadas con bociógenos, sino además, para tratar de aclarar los efectos y el mecanismo de acción de estas hormonas sobre la glándula tiroidea, ya que los resultados encontrados sobre este tema en la literatura son frecuentemente contradictorios. Además, en la mayoría de los estudios realizados sobre este tema en ratas, no sólo se han usado cantidades farmacológicas muy por encima de los posibles niveles fisiológicos (Duyk, 1964), tanto de ACTH como de glucocorticoides, sino que además, rara vez se ha empleado la corticosterona, que es el glucocorticoide con acción hormonal en roedores.

A la vista de todo el planteamiento existente en la literatura, nuestro objetivo es estudiar los siguientes puntos.

- 1) Efecto de la adrenalectomía sobre el peso del tiroides de ratas controles y tratadas con antitiroideos.
- 2) Acción de la insulina sobre el peso del tiroides de ratas adrenalectomizadas tratadas con antitiroideos.
- 3) Acción de los glucocorticoides, usando pequeñas dosis, sobre el peso del tiroides de ratas controles y tratadas con bociógenos.

4) Captación y metabolización del I^{131} por el tiroides, a distintas horas del día, en las que es sabido hay diferencias en los niveles de corticosterona (Allen y Kendall, 1967).

Para el planteamiento experimental hemos escogido las siguientes situaciones:

1ª.- Efectos de la adrenalectomía sobre el peso de ratas controles y tratadas con antitiroideos. Con la adrenalectomía conseguíamos por una parte, ausencia de glucocorticoides evitando la posible acción de estas hormonas a nivel de tiroides, y por otra parte se conseguía elevados niveles endógenos de ACTH en plasma, dentro de los niveles fisiológicos. Si estos niveles los hubiésemos querido conseguir inyectando esta hormona a animales hipofisectomizados-adrenalectomizados, hubiera sido prácticamente imposible mantener niveles altos a lo largo de todo el periodo de experimentación, debido a que el ACTH tiene una vida media muy corta.

2ª Para estudiar si el ACTH o los glucocorticoides están implicados en el mecanismo por el que la insulina aumenta el peso del tiroides de ratas tratadas con antitiroideos, hemos investigado el efecto de la administración de la insulina en animales adrenalectomizados tratados con bociógenos.

3ª.- Para estudiar la acción de los corticoides sobre el peso del tiroides de ratas controles y de las tratadas con antitiroideos, hemos inyectado a los animales cantidades pequeñas de estas hormonas, empleando en la mayoría de los experimentos corticosterona,

que es el glucocorticoide con acción hormonal en roedores.

4º.- Estudiamos la captación y metabolización de I^{131} por el tiroi-
des a distintas horas del día, en las que es sabido hay cambios
en los niveles endógenos de corticosterona, tratando así de ver
si existía o no un paralelismo entre estos parámetros tiroideos y
las oscilaciones en los niveles plasmáticos de corticoides endóge-
nos. Allen y Kendall (1967) encuentran que las concentraciones
de corticoides en plasma de estos animales oscilan a lo largo del
día, observándose una subida de ellos a partir de la 6 de la tar-
de y manteniéndose niveles altos hasta alrededor de las 6 de la
mañana, a partir de cuyo momento mantienen niveles bajos, has-
ta la próxima subida.

La metodología de cada uno de los experimento la ex-
pondremos más detalladamente en los Resultados.

MATERIALES Y METODOS

I - METODOLOGIA GENERAL

A) Animales.

En todos los experimentos realizados en esta Tesis hemos usado ratas de la raza Wistar procedentes del criadero de nuestro Departamento. Las variables controlables se mantenían lo más constante posible. Así, tanto las ratas controles como las experimentales eran del mismo sexo y peso aproximadamente igual, y sobre todo de la misma edad. La distribución de los animales en los distintos grupos controles y experimentales se hacía al azar. Hemos usado ratas machos para evitar la mayor variabilidad de los datos de algunas determinaciones hormonales, por ejemplo, en insulina, que se suele encontrar en las hembras debido posiblemente al ciclo sexual. La comida se suministraba a una misma hora del día durante el periodo de experimentación a todos los animales.

B) Dieta.

Las ratas de nuestro criadero están normalmente sometidas a una dieta de gránulos (Piensos Condor para conejos) que contiene aproximadamente 7-10 μ g de iodo/10 g. Reciben además, lechuga fresca y carne 2 veces por semana. La probable ingesta de iodo es más variable de lo que se necesita para el presente estudio, ya que es fundamental mantener a los animales a una dieta constante y controlada, para evitar las posibles

influencias que la mayor o menor ingesta de iodo pueda tener en la función tiroidea. Por ello poníamos a los animales, al iniciarse el periodo de experimentación, a la dieta descrita a continuación que es rica calorigénicamente y equilibrada en principios inmediatos y vitaminas (LID). Esta dieta está basada en la utilizada por Remington (1936, 1937).

Su composición es la siguiente:

Harina de maíz	6.000 g
Levadura de cerveza	1.000 g
Gluten de trigo	2.500 g
ClNa	100 g
CO ₃ Na	150 g
Agua destilada	s.c.

El contenido en iodo de esta dieta oscila entre 0,05 y 0,09 $\mu\text{g/g}$. Como una rata de unos 100 g de peso ingiere de 10-12 g de comida por día, ello hace que reciban de 0,5-0,9 μg de iodo por día.

Para los animales controles, cuya dieta debe tener un contenido en iodo más alto, se añade a la dieta anteriormente descrita, una cantidad adecuada de una solución de IK de concentración conocida para que la dieta sea equilibrada (1,2 $\mu\text{g l/g}$).

C) Temperatura y otras condiciones ambientales.

Las variaciones de la temperatura ambiente afectan el metabolismo de los animales, e impiden que se tomen como válidos datos procedentes de animales sometidos a diferentes condiciones. Por ello, hemos tratado de mantener la temperatura ambiente de nuestro criadero de forma constante entre 22 y 24°C que es la óptima para la raza que utilizamos en nuestros experimentos.

D) Anestesia.

Tanto para el sacrificio de los animales (experimentos preliminares), como para someterlos a alguna operación quirúrgica (adrenalectomía), las ratas eran anestesiadas. Lo hemos hecho con éter, introduciendo a los animales en un recipiente transparente con un algodón empapado de anestésico en el fondo. Al momento de dormirse el animal se saca del recipiente, y se mantiene anestesiado regulándole la inhalación de éter a voluntad. Procuramos siempre que la anestesia fuese lo más ligera posible.

E) Sacrificio de los animales.

En los experimentos preliminares, sacrificábamos a los animales sangrándolos por la vena cava inferior, después de anes-

tesiadados y tras la inyección de 0,1 ml de heparina amorfa disuelta en salino a la concentración del 1 %, en dicha vena.

Dada la importancia en el presente trabajo de los niveles de insulina y glucosa en plasma, pensamos que el éter y posiblemente el "stres" que sufrían las ratas durante la anestesia, podrían dar lugar a variaciones plasmáticas de glucosa e insulina que falsearían nuestros resultados. Para aclarar este punto, a distintos grupos de ratas experimentales se les sacó sangre del rabo en la que se determinó glucosa. Al día siguiente se sacrificó a los animales con y sin anestesia, al objeto de poder comprobar el efecto de la misma sobre los niveles de insulina, ya que para la determinación de esta hormona ha de disponerse de un volumen de sangre mayor que para la determinación de glucosa, el cual no podíamos conseguirlo sin sacrificar el animal. Al realizar ambas determinaciones, se vio que los animales sacrificados tras anestesia presentaban aparentemente mayores niveles de insulina y glucosa en plasma así como mayor variación en los datos, que los animales sacrificados sin anestesia (Fig. 9 y 10). Por esto decidimos sacrificar a los animales por decapitación con guillotina, ya que así evitábamos la anestesia y el ocasionar el mínimo "stres" posible a los animales.

Una vez sacrificado el animal, el tiroides se limpia rápidamente de otros tejidos, se pesa y se congela a -20°C para la determinación del contenido de I^{127} . En el caso de que las ratas se inyectaron con I^{131} , cada tiroides se homogenizó con 0,5 ml de tris-ClH pH 8,6, que contenía PTU a una concentración 10^{-3} M, para evitar la posible desiodación de los iodo-

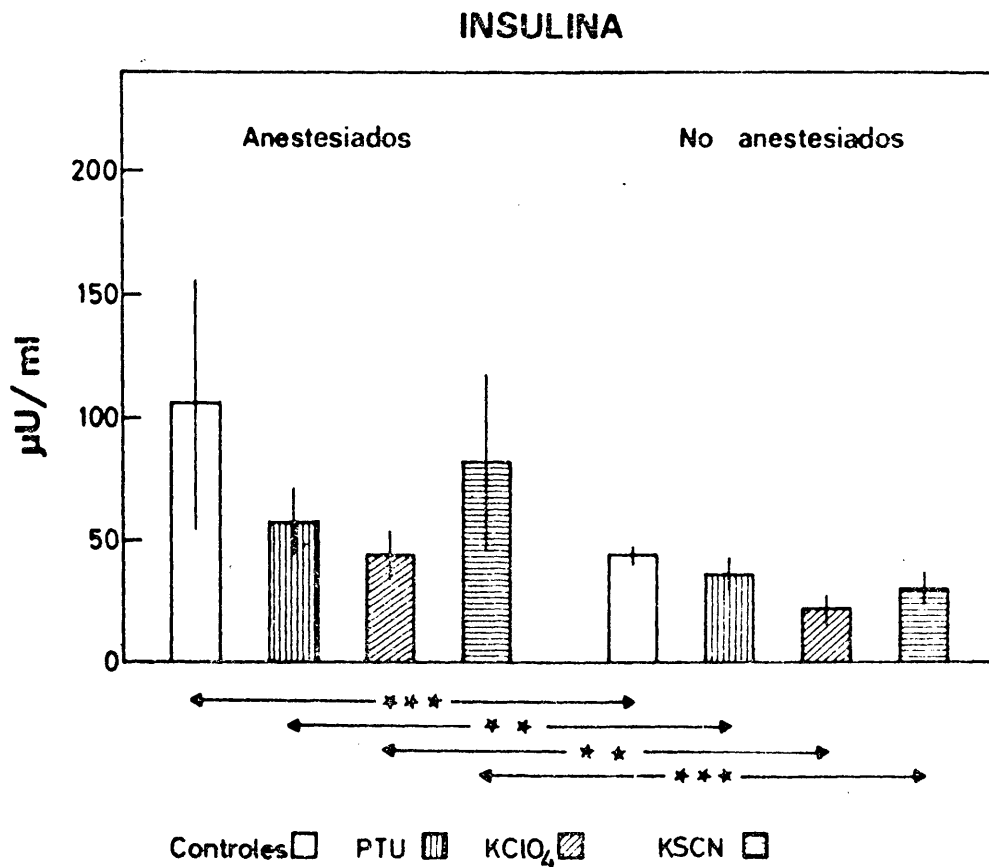


Figura nº 9.

Efecto de la anestesia con éter sobre los niveles de insulina de ratas controles o tratadas con PTU, ClO₄K o SCNK. Los datos presentados son medias \pm DE de ratas/grupo. Los asteriscos indican la significatividad de las diferencias entre dos grupos: **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$.

GLUCOSA

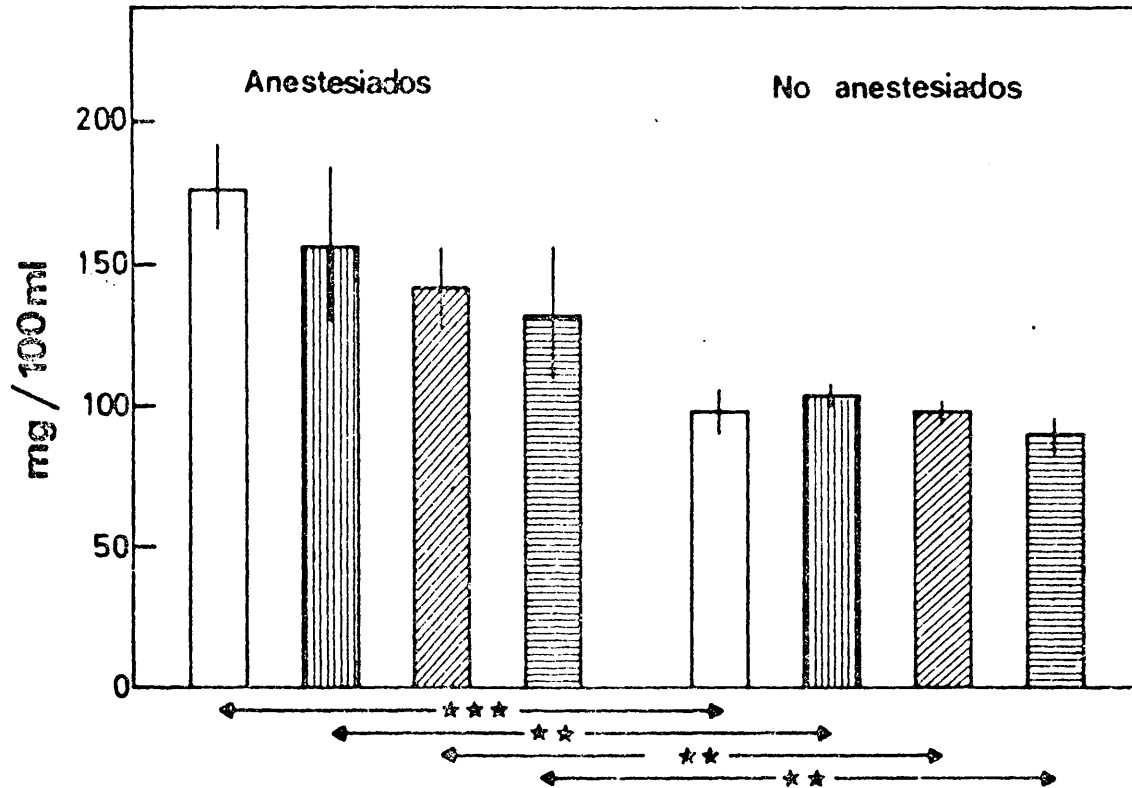


Figura nº 10.

Efecto de la anestesia con éter sobre los niveles de glucosa en sangre de ratas controles o tratadas con PTU, ClO_4K o ECNK . Los datos presentados son medias \pm DE de ratas/grupo. Los asteriscos indican la significatividad de las diferencias entre dos grupos: ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$.

aminoácidos durante la técnica de separación cromatográfica. 0,2 ml se emplearon para la determinación de I^{127} , y el resto se digirió con pronasa durante 8 horas a 37°C . Se cromatografiaron alícuotas de 50 μl en tiras de papel Whatman nº 3, de 2,5 cm y usando n-butanol-etanol-amoniaco (5:1:2). Se contó la radioactividad de las tiras cromatográficas después de ser identificadas las zonas de I^{-} y de los distintos iodoaminoácidos por tinción con Cl_2PI y NO_2Na -ácido (reacción de Pauly). Se limpiaron las adrenales de otros tejidos y se pesaron. La hipófisis se limpió, se pesó y lavó dos veces en sacarosa al 40 %. Se homogenizaron juntas las hipófisis de las ratas de un mismo grupo experimental, usando sacarosa al 40 %, de forma que quedasen a una dilución final de una hipófisis por ml. El homogenado se centrifugó durante 20-30 min. a 1.500 r.p.m., guardándose el sobrenadante a -20°C para ulterior electroforesis en gel de poliacrilamida, según la técnica descrita por Clarke (1964). El PBI se determinó en muestras aisladas o en mezclas de alícuotas iguales de plasma (pool), de cada grupo experimental. Tanto el contenido de iodo en tiroides, como el iodo ligado a las proteínas plasmáticas (PBI), se determinaron por el método de Benotti y Benotti (1963). Muestras individuales de plasma se guardaron congeladas para la determinación de insulina y glucosa. La insulina se determinó por el método de Hales y Randle (1963). Se preparó plasma libre de proteínas con $\text{Ba}(\text{OH})_2$ y ZnSO_4 para la determinación de glucosa (Hugget y Nixon, 1957).

F) Adrenalectomía.

Los animales, anestesiados con éter, se adrenalectomizaron por vía dorsal. Después del sacrificio fueron explorados para ver si tenían restos de glándulas.

II - METODOS ANALITICOS

A) Valoración de I¹³¹.1) Contaje.

El contaje de las muestras radioactivas se hace en un contador de centelleo. Los resultados se expresan en % de la dosis radioactiva administrada a los animales, para lo cual se separa una alícuota de la misma (standard) y se determina su radioactividad al mismo tiempo que las muestras problemas; con esto subsanamos el error debido a desintegración radioactiva. El volumen de las muestras problema y standard debe ser el mismo. Todas las muestras se cuentan en tubos de fondo plano para evitar error de geometría.

2) Determinación de la composición porcentual de iodoaminoácidos tiroideos marcados con I¹³¹.2_a) Homogenización de tiroides.

En un homogenizador Potter de vidrio se pone el tiroides una vez desecado y cortado en trozos, añadiendo 0,5 ml de buffer tris-ClH 0,05 M, exento de iodo, pH 8,6, que contenga PTU (0,2 mg/100 ml = 10^{-3} M). Este se añade para evitar reacciones de desiodación de iodoaminoácidos. Se homogeniza con motor durante breves fracciones de minuto, en frío.

Con una micropipeta se separan 0,2 ml de homogenado para la determinación química del iodo total de la glándula. El resto se utiliza para la digestión proteolítica.

2_b) Digestión proteolítica.

La digestión de estos homogenizados puede hacerse, bien por pancreatina, bien con pronasa. Nosotros hemos preferido el último ya que nos permite disminuir extraordinariamente el tiempo de digestión. La experiencia de otros autores (Tong y cols., 1963) nos indican la gran eficiencia de este producto.

Digestión con pronasa: La técnica que se sigue está basada en las descritas por Tong y Chaikoff (1958) y Mayberry y Astwood (1960) teniendo en cuenta las observaciones de Rosenberg y cols. (1964) para evitar los errores a los que pueden estar sometidas aquellas.

A 0,2 ml del homogenado se añade 0,1 ml de Pronasa (Calbiochem, Los Angeles 63, California) al 4 % en el mismo tampón antes descrito y unas gotas de tolueno, que tapen la superficie del homogenizado para evitar el desarrollo de contaminaciones bacterianas; a continuación se introduce en una estufa a 37°C durante 8 horas para su digestión.

2_c) Separación cromatográfica.

Terminada la digestión, se agita el hidrolizado inten-

samente para conseguir una suspensión homogénea. Se toma una alícuota de la misma (50 μ l) y se pone a cromatografiar en papel Whatman nº 3 de 2,5 cm de ancho. Con anterioridad se ha añadido al origen del cromatograma 10 μ l de una solución de L-tiroxina estable, triiodotironina, mono y diiodotirosina y ioduro, como transportadores y protectores de la desiodación de los compuestos radioactivos. Esto se hace únicamente cuando queremos determinar la distribución de iodoaminoácidos marcados. No debe hacerse, si se quiere realizar la determinación química de los mismos.

Los transportadores son cantidades químicas de los compuestos que queremos identificar en una mezcla radioactiva, que se añaden a la mancha a cromatografiar cuando dichos compuestos se encuentran en cantidades traza y no pueden ser identificados por tinción. Estos transportadores ("carriers"), además de permitir la identificación química de las manchas cromatográficas por tinción directa sobre el papel, facilitan la separación cromatográfica de los compuestos e impiden la desiodación de los mismos (Morreale de Escobar y cols., 1963).

Como transportadores utilizamos una solución formada por:

L-T ₄	8 mg
L-T ₃	8 mg
IK	2 mg
MIT	2,5 mg
DIT	3,5 mg

PTU 4 mg

todo disuelto en 2 ml de n-butanol amoniaco 2 N (3:1). De aquí ponemos 10-20 μ l en la mancha de mezcla a cromatografiar.

Se procede entonces a la separación cromatográfica propiamente dicha. El sistema cromatográfico que hemos utilizado es el BEA-2 (Butanol-Etanol-Amónico), por ser el sistema que mejor separa las dos iodotirosinas (MIT y DIT) y las dos iodotironinas (T_3 y T_4), el I^- y el material no hidrolizado. Se coloca la tira de papel en una caja cromatográfica de forma rectangular, añadiendo a continuación el solvente cromatográfico (BEA). Se coloca la caja cromatográfica de tal forma que los compuestos digeridos emigren ascendentemente con un ángulo de inclinación de unos 20° . De esta forma se mantiene unas 16 horas, al cabo de este tiempo, observando la altura que alcanzó el frente cromatográfico, se sacan las tiras y se secan con un chorro de aire caliente.

2_d) Localización, identificación y cuantitación de los compuestos iodados.

La localización e identificación la realizamos de dos modos distintos: por tinción o por autorradiografía.

Localización por tinción: La tinción directa del papel cromatográfico se realiza espolvoreándolo con una solución un

poco ácida de Cloruro de Paladio al 0,04 %, con lo que aparece una mancha marrón correspondiente al ioduro. Lo localizamos con una señal. Si se alcaliniza a continuación con CO_3Na al 5 % y se vuelve a espolvorear con la mezcla de dos partes de ácido sulfanílico al 0,05 % y una de NO_2Na al 5%, nos aparecen las manchas rosadas de los aminoácidos con un grupo fenólico, es decir, MIT^* , DIT^* , L-T_3^* y L-T_4^* .

Después de localizadas las manchas, las recortamos y contamos su contenido en I^* en el contador de centelleo. La suma de radioactividad encontrada en la totalidad del cromatograma, se toma como 100 % y la proporción de la misma que hay en los distintos compuestos, se expresa en % de esta radioactividad total.

Localización por autorradiografía: La propiedad de los compuestos radioactivos de impresionar placas fotográficas la utilizamos para localizar las manchas radioactivas de las cromatografías. Para ello se coloca el papel cromatográfico, en la oscuridad, en contacto con una película fotográfica (Valca); después del tiempo necesario, según la radioactividad de la muestra, se revela dicha película y las manchas aparecidas coinciden exactamente con las superficies radioactivas del papel cromatográfico.

Para determinar el porcentaje de radioactividad de los distintos componentes de la tira cromatográfica, una vez identificadas las superficies de las mismas, se recortan e introducen en unos tubos de fondo plano para ser contadas por el procedi-

miento descrito anteriormente.

3) Determinación de I^{131} en plasma y PBI^{131} .

La separación del plasma de los animales se realiza centrifugando su sangre heparinizada a 3000 r.p.m. durante 30 minutos. Para determinar la radioactividad se pipetea un volumen determinado en un tubo de ensayo de fondo plano, y de esta forma es contado en el contador de centelleo.

Muchas veces es necesario determinar el iodo radioactivo que va ligado a las proteínas del plasma, ya que este dato representa la proporción de tiroxina marcada circulante por el animal. Para realizar esta determinación, después de contar la radioactividad de una alícuota de plasma, precipitamos sus proteínas con 5 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 10 % en agua destilada; después de dejar reposar 10 minutos, centrifugamos a 3000 r.p.m. durante 15 minutos, al cabo de los cuales decantamos el sobrenadante. Este lavado se realiza 2 veces. Al contar nuevamente el tubo nos dará el % de I^{131} que se ha precipitado con las proteínas.

B) Valoración de I^{127} .

El método de valoración de iodo estable consiste desde hace muchos años, en observar la velocidad de reducción de sulfato cérico por el anhídrido arsenioso. Esta reac-

ción es muy lenta, pero puede ser catalizada por el iodo inorgánico, acelerándola proporcionalmente a la cantidad existente de éste. La decoloración de la forma oxidada del cérico (amarilla) a ceroso (incolora) permite seguir la marcha de la reacción en un espectrofotómetro.

1) Método general.

Seguimos la técnica descrita por Benotti y Benotti (1963) a la que se han introducido algunas modificaciones en nuestro laboratorio, lográndose afinar la precisión del método así como aumentar enormemente la velocidad de las determinaciones.

El método consiste en digerir las muestras directamente en baño de arena a $105-110^{\circ}\text{C}$ durante el tiempo necesario para destruir toda la materia orgánica y convertir los compuestos iodados a forma inorgánica (iodatos), en presencia de un ácido fuerte, el ácido clórico. La digestión se realiza generalmente con 3 ml de clórico, y, como indicador del final de la reacción oxidante del ácido, se adiciona una solución de cromato sódico, de forma que se encuentre a la concentración de 1 mg/3 ml de ácido clórico. Al final de la digestión se observan con toda claridad la aparición de unos cristales de óxido de cromo (naranjas), momento en el que las muestras se pasan a temperatura ambiente, considerándolas en condiciones de hacer la reacción. La preparación del ácido clórico se consigue como resultado de la reacción entre el clorato potásico y el ácido perclórico, conservando la mezcla reaccionante a -23°C

durante 12 horas, ya que a esta temperatura la solubilidad del perclorato potásico formado, es mínima, con lo que se consigue una gran pureza del ClO_3H así obtenido. Al cabo de este tiempo se filtra por un papel Whatman nº 1, obteniéndose una concentración aproximada de ácido clórico del 28 %.

A los digeridos se les añade 2 ml de solución de ácido arsenioso (preparada con 10 gr de anhídrido arsenioso, 50 g de cloruro sódico, 400 ml de ácido sulfúrico 5 N, y aproximadamente 1 litro de agua destilada; una vez disuelta totalmente la mezcla, se lleva a 2 litros con agua destilada). Se vierten dentro de la cubeta para muestras del Autoanalizador. Ya en la cubeta va pasando sucesivamente por unos serpentines en los que se mezcla con el sulfato cérico-amónico; a continuación por un baño de agua a 32°C en el que se realiza la reacción, y finalmente pasa a un colorímetro en el que se mide la densidad óptica a $410\text{ m}\mu$. Las distintas densidades ópticas son recogidas en un registrador.

Con cada serie de problemas deben digerirse una serie de standards. Los baños de arena que utilizamos admiten 16 tubos, por lo que en cada baño ponemos siempre 4 patrones o standards y doce muestras problema. Como patrones empleamos soluciones de IO_3K de las siguientes concentraciones: 0,02, 0,04 y 0,06 μg de iodo contenidos en 1 ml de agua destilada respectivamente, y además un tubo como blanco o control.

Para conseguir éxito en el método es necesario utili-

zar reactivos de la mayor garantía, así como observar una limpieza absoluta en el material utilizado, e incluso un laboratorio totalmente aislado dedicado a la realización de estas determinaciones. Cualquier contaminación es advertida por la rápida decoloración de las standards.

Según la cantidad de iodo que supongamos tienen los problemas a valorar, podemos introducir toda clase de variaciones en el método general.

2) Determinación de I^{127} y PBI 127 en plasma de ratas.

I^{127} total: Se utilizan 0,5 ml de plasma para cada determinación y se sigue el método general sin introducir ninguna variación.

PBI 127 o iodo ligado a proteínas plasmáticas: 0,5 ml de plasma se precipitan con 10 ml de ácido tricloroacético al 5 % en el mismo tubo que vamos a utilizar posteriormente para la digestión. Después de dejar reposar el precipitado durante 20 minutos, se centrifuga a 2000 r.p.m. durante 10 minutos. Se decanta el sobrenadante que contiene el iodo no ligado a las proteínas, y el precipitado se lava con otros 10 ml del mismo ácido, con posterior centrifugación y decantación del sobrenadante. Con el precipitado en presencia de 3 ml de clórico, comenzamos la digestión, continuando el método general.

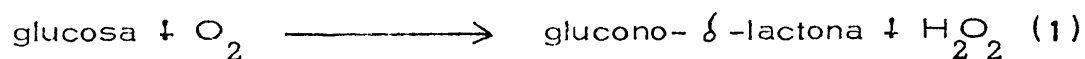
3) Determinación de Iodo en tiroides.

Los tiroides enteros, o fracciones de los mismos, los digerimos con 1,5 ml de clórico. Las standards usadas para estas determinaciones son: 0,0 (blanco), 0,5, 1,0, 1,5, 2,0 y 4,0 μg de iodo. Estas también se digieren con 1,5 ml de ácido clórico. Una vez terminada la digestión, se diluyen las muestras con 10 ml de agua destilada. De esta solución se toma 0,5 ml para agregarle 2 ml de ácido arsenioso y a partir de este momento seguimos el método general.

Si las muestras a valorar presumimos son bajas en iodo variamos un poco las condiciones generales. Las standards usadas son: 0,0 (blanco), 0,2, 0,5, 1,0 y 1,5 μg de iodo. Estos patrones y los tiroides los digerimos con 1,5 ml de clórico. Una vez terminada la digestión añadimos directamente 4 ml de arsenito, y ya seguimos el método general.

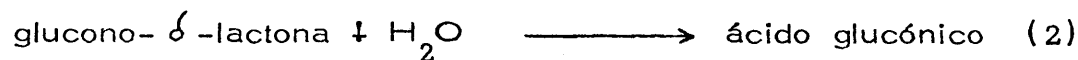
C) Valoración de glucosa en plasma.

El método consiste en la determinación colorimétrica de glucosa basada en una reacción enzimática llevada a cabo por glucosa-oxidasa, capaz de oxidar la glucosa hasta la formación de ácido glucónico. La reacción catalizada es la siguiente:

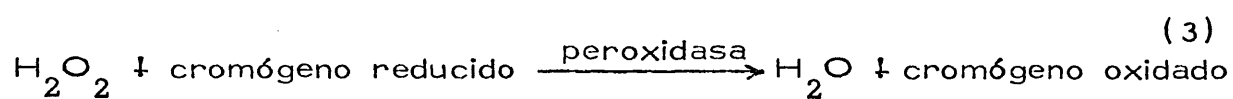


la glucono- δ -lactona es muy poco estable, e inmediatamente se

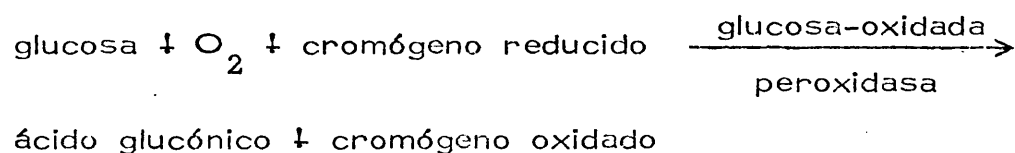
descompone para formar ácido glucónico:



El acoplamiento de estas reacciones con un sistema peroxidasa-cromógeno oxidable facilita un método colorimétrico para la determinación de glucosa. La reacción es:



La unión de las reacciones (1), (2) y (3) nos dará la reacción:



Colocando en la mezcla de reacción cantidades abundantes de cromógeno reducido, glucosa-oxidasa y peroxidasa, y realizando la reacción en el aire (O_2), el color que aparezca (cromógeno oxidado) dependerá de la concentración de glucosa existente en la muestra.

Método general: Siguiendo la técnica descrita por Hugget (1957), con algunas indicaciones realizadas por Sols y de la Fuente (1957) y otras modificaciones, conseguimos afinar la precisión del método y aumentar la velocidad de las determinaciones, así como economizar en el reactivo, razón importante dado el extraordinario número de muestras que se han determina-

do en esta tesis. El método consiste en precipitar las proteínas plasmáticas según la técnica de Somogyi (1936) con $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 0,3 N y SO_4Zn 5 %. La exactitud de las concentraciones de estos reactivos no es tan importante como la equivalencia de una con otra, por lo que debe comprobarse éstas por volumetría en presencia de fenoltaleína.

La precipitación se realiza haciendo una dilución del plasma 1/10 de la siguiente forma: se añade 0,5 ml de plasma a 3,5 ml de agua destilada, agregándose a continuación 0,5 ml de $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 0,3 N. Tras mezclar y añadir 0,5 ml de SO_4Zn 5 %, se centrifuga en cámara fría, decantándose y guardándose el sobrenadante que contiene la glucosa.

Una vez precipitadas las proteínas, se pipetea 0,1 ml de sobrenadante desconocido, standards de glucosa y agua destilada (blanco) a distintos tubos, añadiendo después a todos ellos 0,1 ml de buffer fosfato 0,2 N, pH = 7,4. A continuación, y a intervalos de tiempo iguales, se les agrega 1 ml de reactivo, incubándose a 37°C durante 1 hora, pasada la cual, y por el mismo orden en que fueron introducidos en el baño, se para la reacción echándoles una gota de ClH 2 N. Se sacan del baño y se mide la densidad óptica en un espectrofotómetro Beckman DU a 415 m μ frente a agua destilada.

El reactivo usado es Glucostat (Worthington Biochemical Corporation, U.S.A.) que se presenta en dos tubos. Uno de ellos contiene los enzimas liofilizados y otro el cromógeno. El Glucostat en solución es poco estable, lentamente se co-

lorea dando lugar a blancos altos, debido probablemente a oxidación aerobia del cromógeno por la peroxidasa (Sols y de la Fuente, 1957). Incluso la congelación que asegura la buena conservación de los enzimas, no impide del todo la alteración del reactivo. Por esta razón, debemos preparar el reactivo en el momento de usarlo, disolviéndolo en agua destilada. Nosotros por razón de economía no usamos el vial entero cada vez que hacemos una valoración. Para ello agregamos a cada uno de los viales, cromógeno y enzima, 1 ml exacto de agua destilada y tomamos de estas disoluciones las cantidades necesarias. El reactivo completo lo preparamos del siguiente modo: se pipetea 1 ml de agua destilada a los dos viales, cromógeno y enzima. Se añade el contenido de ambos viales a un matraz aforado de 100 ml. Se agregan 3 ml de solución buffer fosfato, $\text{pH} = 7,4$ agitándose y enrasándose con agua destilada. Según las muestras que vayamos a valorar se prepara distinta cantidad de reactivo. El contenido del vial enzima y vial cromógeno que no usemos se guarda congelado.

El Glucostat Reagent tiene $\text{pH} = 7$ y, aunque no se observa variación en su comportamiento relacionados con variaciones de este parámetro, nosotros añadimos buffer tanto al reactivo como a las muestras y standards, para reforzar la capacidad tampón del reactivo y corregir posibles diferencias de pH entre patrones y problemas que pueden introducir error.

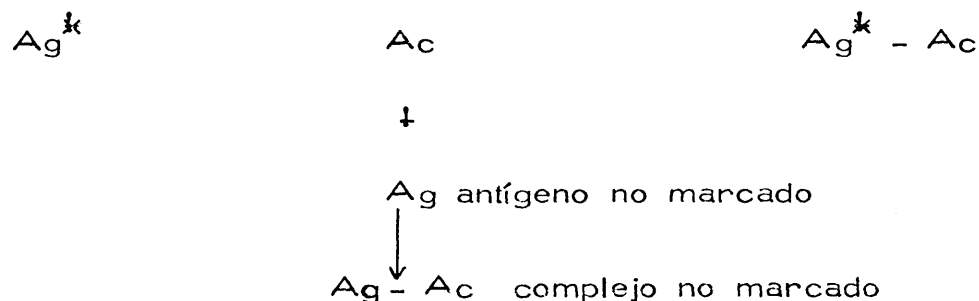
Como patrones empleamos distintas soluciones de glucosa que contienen 6,25, 12,5, 25 y 50 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$, realizadas mediante las diluciones necesarias en agua destilada a partir de un "patrón" de glucosa al 1 % en ácido benzoico. El tubo en blan-

co tiene como misión corregir el color del reactivo y en él se pipetea 0,1 ml de agua destilada.

D) Valoración de Insulina en plasma.

El método para determinar insulina consiste en un radioinmunoensayo. El principio general de los inmunoensayos es el siguiente:

Antígeno marcado + anticuerpo específico \longrightarrow complejo antig.-antic.



La hormona que actúa de antígeno se une al anticuerpo y da lugar al complejo antígeno-anticuerpo. Este complejo puede ser radioactivo o no según que la hormona con la que reaccione el anticuerpo esté o no marcada. Los radioinmunoensayos aprovechan la propiedad de la hormona no marcada existente en el plasma o en otras soluciones de competir con la hormona marcada en su reacción con el anticuerpo específico y por lo tanto de evitar la formación del complejo antígeno-anticuerpo marcado. La radioactividad de la muestra es inversamente proporcional a la cantidad de hormona no marcada existente en la misma.

Para todo radioinmuno método son necesarios tres puntos: 1º Un anticuerpo específico; 2º una hormona marcada y 3º un método que separe el complejo y la hormona que queda libre, puesto que los complejos antígeno-anticuerpo no precipitan espontáneamente dada la baja concentración de las sustancias reaccionantes.

Para el radioinmuno método de insulina seguimos el método del "doble anticuerpo" descrito por Hales y Randle (1963) que consiste en precipitar cuantitativamente el complejo insulina-anticuerpo por la adición de un segundo anticuerpo. Este método nos permite la medida de muy bajas concentraciones de insulina en pequeños volúmenes de plasma.

Se utilizan los siguientes reactivos:

- 1) Tampón A: Tampón fosfato 0,04 M, pH = 7,4 con 0,06 mM Tiomersalato al 0,5 % de albúmina β (Fracción V de Sigma).
- 2) Tampón B: Tampón A isotónico.
- 3) Tampón C: Solución de albúmina β al 4 % en tampón A.
- 4) Antisueros: Nos son administrados por Radiochemical Centre, Amersham, England.
 - a) Suero antiinsulina obtenido en cobaya a partir de Insulina porcina.
 - b) Suero antigamma-globulina (2º antisuero precipitante) conseguido por inyección de gamma-globulina de suero de cobaya en conejo.
- 5) Insulina marcada (Insulina I¹²⁵), también administrada por Ra-

biochemical Centre, Amersham, England, preparada a partir de insulina bovina cristalizada y altamente purificada, teniendo una actividad de $50 \mu\text{Ci}/\mu\text{g}$.

- 6) Patrones de Insulina: los preparamos a partir de Insulina de rata, suministrada por Novo (Copenague), realizando una solución stock en tampón B. Esta solución se guarda congelada a -20°C repartida en distintos volúmenes para descongelar una sola vez. A partir de esta solución stock se preparan los diferentes patrones por diluciones en el mismo tampón.

El procedimiento a seguir es el siguiente: Se preparan 3 series de tubos: a) para los ceros; b) para los patrones de insulina y c) para los problemas. Todas las muestras se ponen por triplicado.

Preparados los tubos se añade al frasco del doble antisuero 8 ml de agua destilada, agitando cuidadosamente para evitar la formación de espuma. Se reparte a todos los tubos 0,1 ml de tampón B*. A los tubos de los grupos b) y c) se añade 0,1 ml de insulina patrón a distintas diluciones, ó 0,1 ml de plasma a valorar. Estos plasmas, si se supone que la cantidad de insulina es superior a la más alta concentración de insulina patrón, deben ser cuidadosamente diluidos con tampón B. A continuación, se pipetea a cada tubo 0,1 ml de antisuero. Después de mezclar el contenido de cada tubo, se incuban a 4°C durante 6 horas.

Transcurrido este tiempo se añade a todos los tubos 0,1 ml de insulina marcada (250 picogramos de Insulina I^{125}).

* A los "ceros" (no llevan Insulina fría) en lugar de 0,1 ml, se les reparte 0,2 ml de tampón B para igualar el volumen con el resto de los tubos.

Se mezcla y vuelve a incubar a 4°C durante 18 horas, después de las cuales se filtra a través de membrana de acetato de celulosa Oxoid, lavando dos veces el filtro con 0,5 ml de tampón C. A continuación se cuentan los filtros en un contador Auto-gamma (Packard) con "setting" adecuado para I¹²⁵. La Insulina viene dada en μU o en % de plasma control interno, según que todas las determinaciones de un mismo grupo experimental se hayan hecho o no en el mismo radioinmunoensayo.

E) Valoración de Hormona Tirotrópica.

El fundamento de este método y parte de la técnica son semejantes al método de valoración de insulina descrito anteriormente. El método ha sido montado en este laboratorio por la Dra. M.D. García y cols. (1971), quienes realizaron las determinaciones.

A continuación hacemos un pequeño resumen de la metodología general utilizada. Siguiendo los procedimientos de Lemarchand-Beraud y Vannotti (1965, a, b) obtuvieron el antisuero anti-TSH bovino en cobayas (M.D. García y G. Morreale de Escobar, 1970). Como antígeno para marcar, emplearon TSH de tumores hipofisarios de ratones, facilitados por el Dr. Bates (NIH, U.S.A.), siendo éste el antígeno ya empleado para este fin por Wilber y Utiger (1967). Marcaron este antígeno por el método de Greenwood y Hunter (1963) con Cloramina T, El antígeno marcado se purifica primeramente por Sephadex G-100.

El anticuerpo específico se utiliza a una dilución final de 1/120.000 y el complejo antígeno anticuerpo marcado se separa, tras 5 días de incubación a 5°C, mediante segundo anticuerpo (antigamma globulinas de cobaya, obtenidas en cabra, Antibodies Incorporated, U.S.A.) y centrifugación. Las standards de TSH de rata eran homogenados crudos de hipófisis, por no haber standard internacional de TSH de rata, diluidos en plasma de ratas inyectadas con T₄.

Los resultados obtenidos, están, por tanto, expresados en unidades arbitrarias. 1 U = TSH contenido en 1 hipófisis de rata normal adulta. Por repetidos bioensayos, usando el método de McKenzie (1968), determinaron que 1 U arbitraria de TSH de rata = 0,21 U de la standard internacional de TSH bovino (NIH).

F) Valoración de Hormona de Crecimiento (GH).

La determinación de GH la realizamos en hipófisis. Para ésto, la hipófisis anterior, una vez limpia y pesada, se homogeniza en 1 ml de sacarosa al 40 %. El homogenado lo centrifugamos durante 20-30 minutos a 1.500 r.p.m., guardándose el sobrenadante a -20°C para la determinación de GH por electroforesis de disco en gel de poliacrilamida.

Seguimos la técnica descrita por Davis (1964), usando la simplificación de Clarck (1964). La banda de proteína asociada con GH ha sido identificada basándonos en los hallazgos descritos por Lewis y cols. (1965) y Jones y cols. (1965) para ratas.

La emigración de las proteínas en disco de gel depende de la carga de las proteínas y del tamaño de las partículas. Eligiendo un tamaño de poro apropiado, conseguiremos separar la GH. Esto lo hemos conseguido con la solución B, acrilamida y bisacrilamida que son las que determinan el tamaño del poro.

Se preparan las siguientes soluciones:

Tampón Tris-Glicina:

Tris	6,0 g
Glicina	28,8 g
Agua hasta	1 litro
Diluir	1/10
pH	8,3

Solución A:

CIH 1 N	48 ml
Tris	36,6 g
TEMED	0,46 ml
Agua hasta	100 ml
pH	8,9

TEMED son las siglas para N, N, N', N'-Tetrametiletilenodiamina.

Solución B:

Acrilamida	30 g
------------	------

BIS 0,8 g
Ferricianuro potásico 15 mg
Agua hasta 100 ml

BIS son las siglas para N, N'-Metilenobisacrilamida.

Solución C:

Persulfato amónico 0,14 g
Agua hasta 100 ml

Solución de Amido negro.

A la mezcla metanol-agua-ácético en las proporciones (5:5:1) se añade amido negro en polvo hasta saturación. Se necesitan unos 250 mg para 500 ml.

Azul de Bromofenol: se disuelve en agua al 0,001 %.

La técnica a seguir es la siguiente: Se prepara una mezcla con:

2 ml de solución A.
4 ml de solución B.
8 ml de solución C.
2 ml de agua.

Se agita ligeramente la mezcla con la que se pueden llenar a una altura de 5 cm, hasta 12 cilindros de vidrio de 0,8 cm de diámetro y 6 cm de altura, que se han cerrado an-

tes por un extremo con papel parafinado. Se añaden cuidadosamente unas gotas de agua con el fin de que el nivel superior del gel quede plano, eliminando el menisco y la retracción de la superficie del gel. Se dejan polimerizar cerca de una ventana porque la luz, especialmente la del sol, cataliza este proceso. Se conoce que se ha terminado éste, cuando claramente se ve la fase de separación entre el gel y el agua añadida en la superficie. Una vez terminada la polimerización se quita el agua, y se acaba de secar con la punta de una servilleta de celulosa, quitando el papel parafinado del extremo inferior.

Se colocan los tubos en el aparato de electroforesis de modo que queden perfectamente perpendiculares (para evitar que las bandas aparezcan inclinadas) y todos a la misma altura. En la bañera inferior se pone tampón Tris-glicina diluido al 1/10 y en el superior se añaden unas gotas de solución de azul de bromofenol al tampón anterior. El nivel de los baños ha de ser tal que cubra completamente los tubos. De este modo se llena de tampón la parte superior de éstos, que estaba vacía de gel. Como es posible que haya quedado alguna burbuja de aire, se introduce tampón con una pipeta Pasteur en la boca del tubo.

Añadimos 0,2 ml de muestra (200-400 µg de proteína), a través del tampón del recipiente superior, con micropipeta dejándola resbalar con cuidado por las paredes del tubo y procurando no dañar la superficie del gel, para lo que no debe estar más cerca de 4 mm de ésta.

Se conecta el aparato con la fuente de alimentación me-

dian­te los electrodo­; el cátodo va unido al ba­ño superior. Se tiene una corriente con una tensión continua de unos 150 voltios y 4 miliamperios por tubo. Se debe vigilar la intensidad para que permanezca constante. Cuando la banda azul (azul de bromofenol que marca el frente) alcance casi el extremo inferior de la columna de gel (pero sin que se salga) se desconecta el aparato de la fuente de alimentación.

Si la electroforesis se lleva a cabo a temperatura ambiente se alcanza una temperatura dentro del gel de unos 35°C , pero si la muestra contiene sustancias lábiles por el calor, será necesario trabajar en la cámara fría y reducir la corriente a 1 miliamperio/tubo con lo que el calentamiento del gel es despreciable.

Acabada la electroforesis y una vez desconectada la fuente de energía, se decantan los tampones de los dos baños cuidando de no mezclarlos, y se guardan por separado para no contaminar el tampón del cátodo con los iones que han emigrado al ánodo.

Los tubos se separan del ba­ño superior y los geles se sacan de ellos introduciendo una aguja entre el gel y la pared del tubo. La aguja va avanzando a lo largo del tubo mientras que éste gira y presiona un poco el gel de modo que salga unos 2 mm. Luego se introduce la aguja por el otro extremo y se hace lo mismo hasta que la columna se desliza y cae fuera del tubo. Esta operación debe hacerse en un recipiente con agua que lubrica la superficie del gel e impide su deterioro por

el movimiento de la aguja o el alambre empleado.

Las columnas se ponen a teñir en solución de Amido negro 3 ó 4 minutos. Se sacan y lavan con agua destilada. Se ponen a decolorar en recipiente adecuado con la mezcla metanol-agua-acético en las proporciones (5:5:1) durante unas 14 horas o más. Durante este tiempo, se cambia varias veces el decolorante. Esta mezcla fija el colorante a las proteínas y lo quita de las partes del gel sin éstas. Cuando la mayoría del colorante ha sido lavado se ponen las columnas dos o más días en ácido acético al 2 % que termina la decoloración. Se conserva en tubitos de diámetro adecuado, también en acético al 2 %. El aspecto inicial se mantiene por lo menos un año.

La densidad de la banda de GH fue medida en un microdensitómetro (Joyce, Loebel y Co., Ltd., England) determinándose el valor del área del pico correspondiente a la hormona de crecimiento.

III - CALCULO ESTADISTICO.

Para poder enjuiciar más objetivamente los datos obtenidos hemos aplicado cálculos estadísticos.

A) Diferencia entre los valores medios de dos poblaciones.

El problema que se presenta con mayor frecuencia, es el de decidir si las diferencias entre los datos medios de dos grupos experimentales distintos, son estadísticamente significativas o se deben a la variabilidad biológica o al error de las determinaciones analíticas. Para resolverlo se aplica el test (Arkin y cols., 1967) según el cual:

$$t = \frac{(\bar{x} - \bar{y})}{\text{error standard de la diferencia (e.s.d.)}} \quad (1)$$

Cuando el número de datos de ambos grupos es el mismo ($n_1 = n_2$):

$$\text{e.s.d.} = \sqrt{\frac{\sum(\bar{x} - x)^2 + \sum(\bar{y} - y)^2}{n(n-1)}}$$

Cuando el número de datos de ambos grupos es distinto ($n_1 \neq n_2$):

$$\text{e.s.d.} = \sqrt{\left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}\right) \frac{\sum(\bar{x} - x)^2 + \sum(\bar{y} - y)^2}{n_1 + n_2 - 2}}$$

Es interesante conocer los términos que influyen en las anteriores fórmulas:

$$\text{Desviación standard (D.S.)} = \sqrt{\text{Varianza}} = \sqrt{\frac{\sum (\bar{x} - x)^2}{n-1}}$$

$$\text{Error standard (e.s.)} = \sqrt{\frac{\text{Varianza}}{n}} = \sqrt{\frac{\sum (\bar{x} - x)^2}{n(n-1)}}$$

x e y: datos de cada animal con su correspondiente grupo;
 \bar{x} e \bar{y} : medias aritméticas de los datos de cada grupo.

Datos dudosos.

A veces en un grupo aparecen uno o varios datos claramente distintos del valor medio. Para saber si estos datos pueden despreciarse se aplica el "test de λ^2 " (Moore y cols., 1951). Para ello se determina en las correspondientes tablas el valor de λ^2 , en función del número de datos dudosos. Por este procedimiento se podrán despreciar los datos que sean

$$\begin{aligned} \text{mayores o menores que la media} & \pm \sqrt{\lambda^2 \cdot (\text{D.S.})^2} = \\ & = \bar{x} \pm \sqrt{\lambda^2 \frac{\sum (\bar{x} - x)^2}{n-1}} \end{aligned}$$

Si se sale algún dato, se vuelven a repetir todos los cálculos, despreciando ya los datos que se salen y entonces mediante las tablas de Student (Arkin y cols., 1967) se calcula la "p" de las pruebas de significatividad, en función de t (fórmula 1). Esta p nos indica la probabilidad de que la dife-

rencia entre las medias \bar{x} e \bar{y} de dos grupos, se deba al caso (variabilidad biológica de los animales experimentales o error de las determinaciones analíticas). Debido a que se trata de experiencias biológicas, se considera como valor límite el de $p = 0,05$, o sea cuando $p > 0,05$, las diferencias se deben al caso; mientras que cuando p es igual o menor que el mencionado valor, la diferencia es estadísticamente significativa.

B) Ajuste a una recta por mínimos cuadrados (Coeficiente de regresión).

El coeficiente de regresión es una medida de la dependencia de dos variables dependientes entre sí, dando información sobre la relación existente entre ambas.

Interesa con frecuencia determinar cuál es la recta que mejor ajusta a una nube de puntos (población). Como la ecuación de la recta es $y = a + bx$, el problema consiste en determinar:

a = Ordenada en el origen

b = Coeficiente de regresión (pendiente)

$$a = \frac{\sum y - b \cdot \sum x}{n} \qquad b = \frac{\sum xy - \frac{\sum x \cdot \sum y}{n}}{\sum (x - \bar{x})^2}$$

$$\text{Error de } a \text{ (} S_a \text{)} = \frac{\sum (y - \bar{y})^2}{n(n-1)}$$

$$\text{Error de } b \text{ (} S_b \text{)} = \sqrt{\frac{\sum (y - \bar{y})^2 \cdot \frac{[\sum y (x - \bar{x})]^2}{\sum (x - \bar{x})^2}}{(n - 2) \cdot \sum (x - \bar{x})^2}}$$

Para comparar las pendientes de las rectas obtenidas por mínimos cuadrados, será necesario calcular el error standard de ambas:

$$S_{(b_1 \pm b_2)} = \sqrt{S_{b_1}^2 + S_{b_2}^2} \quad t = \frac{b_1 - b_2}{\sqrt{S_{b_1}^2 + S_{b_2}^2}}$$

Con el valor de t se buscan en las correspondientes tablas (Snedecor, 1956) los valores de p para ver si dichas diferencias son o no significativas.

C) Coefficiente de correlación.

Sirve para determinar la correlación entre dos parámetros (Snedecor, 1956) y viene dado por la siguiente fórmula:

$$r = \frac{\sum (xy) \cdot \frac{\sum x \cdot \sum y}{n}}{\sqrt{\sum (x - \bar{x})^2 \cdot \sum (y - \bar{y})^2}}$$

n = nº de datos apareados.

La máxima correlación que puede existir entre dos variables es la unidad (± 1). Con el valor de r se acude a las correspondientes tablas y se busca la p para $n - 2$, obteniendo de esta forma si la correlación entre ambas es o no significativa.

RESULTADOS Y COMENTARIOS

Como se ha indicado en la introducción, era interesante el estudio de la acción del ACTH sobre el peso del tiroides de ratas controles y de las tratadas con bociógenos, tanto para tratar de aclarar su acción sobre este parámetro tiroideo, como para investigar su posible implicación en el efecto de la insulina aumentando el peso del tiroides de los animales tratados con anti-tiroideos.

Elegimos la situación del animal adrenalectomizado, ya que así eliminábamos por una parte la posible acción de las hormonas adreno-corticoides, a la vez que lográbamos mantener niveles endógenos altos de ACTH, dentro de los límites fisiológicos, a lo largo del periodo de experimentación.

Realizamos los siguientes experimentos:

EXPERIMENTO I.

Efecto de la adrenalectomía (altos niveles de ACTH) en el peso del tiroides de ratas controles y de las tratadas con PTU.

Ratas intactas (I) y adrenalectomizadas (\bar{A}) se dividieron en dos grupos, cinco días después de la operación. Uno de ambos grupos recibieron la dieta habitual, Remington, suplementada con iodo, mientras que los otros eran sometidos a una dieta de bajo contenido en iodo, y se les inyectaba diariamente 1 mg de PTU i.p. durante 12 días. A estos grupos se les de-

nominará I \pm PTU y \bar{A} \pm PTU. El PTU se les inyectaba, en vez de suministrarlo en el agua de bebida o en la comida, para asegurarnos que todos los animales, intactos y adrenalectomizados, recibían la misma cantidad de droga. Los grupos que no recibieron PTU se inyectaron con 1 ml de salino, volumen en el cual se administraba el antitiroideo. Todos los grupos de animales recibieron salino como bebida, ya que ello es necesario para la supervivencia de las ratas adrenalectomizadas, puesto que está descrito y de todos es conocido, que con la adrenalectomía se produce una pérdida excesiva de Na^+ y Cl^- por el riñón y por lo tanto de agua, lo que ocasiona una deshidratación y la muerte del animal. Dándoles salino se les compensa de la pérdida de Na^+ y consecuentemente de agua prolongándoles el tiempo de supervivencia. Todos los animales se sacrificaron por guillotina, entre las 9 y 10 de la mañana.

En las Tablas 2 y 3 y Figs. 11 y 12 se representan algunos de los datos de animales correspondientes a este Experimento.

La adrenalectomía indujo una disminución del peso corporal de los animales, pero no afectó el peso relativo del hígado, riñones, testículos e hipófisis (Tabla 2). Tampoco produjo variaciones en el contenido de yodo en tiroides o en los niveles de PBI, glucosa o insulina en plasma (Tabla 3).

El tratamiento con PTU afectó el aumento corporal de los animales intactos, pero no el de los adrenalectomizados; no produjo cambios en los pesos relativos de hígado, riñón, testículos o hipófisis, en ambos grupos de ratas. Este tratamiento no

TABLA 2.- Peso de hígado, riñones, adrenales, testículos, hipófisis y aumento de peso corporal durante el tratamiento, de ratas intactas (I) y adrenalectomizadas (A), inyectadas con 1 mg de PTU/rata/día durante 12 días, y de controles de la misma edad.

Grupos	Hígado g/100 g	Riñones g/100 g	Adrenales mg/100 g	Testículos g/100 g	Hipófisis mg/ 100 g	Aumento de peso corporal g
I (I) † salino	5.5 ± 0.5	1.0 ± 0.1	20.1 ± 1.7	1.2 ± 0.3	4.7 ± 0.8	74 ± 11
II (A) † salino	5.9 ± 0.4	1.1 ± 0.1	-	1.3 ± 0.2	3.8 ± 0.5	40 ± 10
III (I) † PTU	5.5 ± 0.3	0.8 ± 0.2	18.1 ± 3.9	1.3 ± 0.1	4.0 ± 0.5	47 ± 6
IV (A) † PTU	6.1 ± 0.9	1.0 ± 0.1	-	1.2 ± 0.2	4.1 ± 0.5	44 ± 7
.....						
Estadística. Valores de p:						
I vs. II	n.s. ^A	n.s.	-	n.s.	n.s.	< 0.01
III vs. IV	n.s.	n.s.	-	n.s.	n.s.	n.s.

Los datos presentados son medias ± DS de 6 ratas por grupo y corresponden a los animales del Experimento I.

^A n.s. = no significativo (p > 0.05)

TABLA 3.- Contenido de iodo en tiroides, PBI, insulina y glucosa en plasma de ratas intactas (I) y adrenalectomizadas (\bar{A}), inyectadas con 1 mg de PTU/rata/día durante 12 días. Estos datos se comparan con los de las ratas intactas y (\bar{A}) controles.

Grupos	I ¹²⁷ en tiroides		Plasma		
	$\mu\text{g/glandula}$	$\mu\text{g/100 ml}$	PBI	Insulina	Glucosa
I I \downarrow salino	5.80 \pm 2.40		5.7	34.7 \pm 4.7	164 \pm 11
II \bar{A} \downarrow salino	6.80 \pm 4.10		5.8	33.1 \pm 8.0	169 \pm 11
III I \downarrow PTU	0.08 \pm 0.03		1.9	27.4 \pm 1.6	168 \pm 8
IV \bar{A} \downarrow PTU	0.11 \pm 0.07		2.0	40.2 \pm 11.0	159 \pm 15
.....					
Estadística. Valores de p:					
I vs. II	n.s.*		-	n.s.	n.s.
III vs. IV	n.s.		-	0.02	n.s.

Los valores presentados son medias \pm DS de 6 ratas/grupo, y corresponden a los animales del Experimento I.

* n.s. = no significativo (p 0.05)

PESO DE TIROIDES

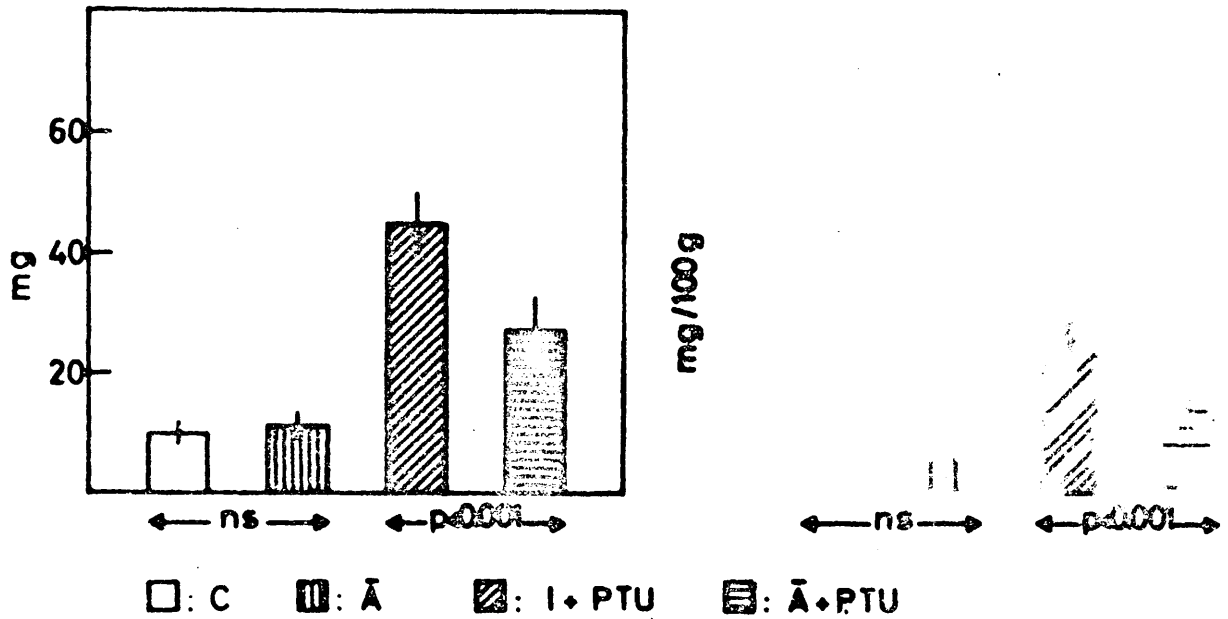


Figura nº 11.

Peso absoluto y relativo de tiroides de ratas intactas (I) y adrenalectomizadas (\bar{A}), tratadas con PTU durante 12 días y sus correspondientes controles. Los datos presentados son medias \pm DE de 6 ratas/grupo y pertenecen a los animales del Experimento I.

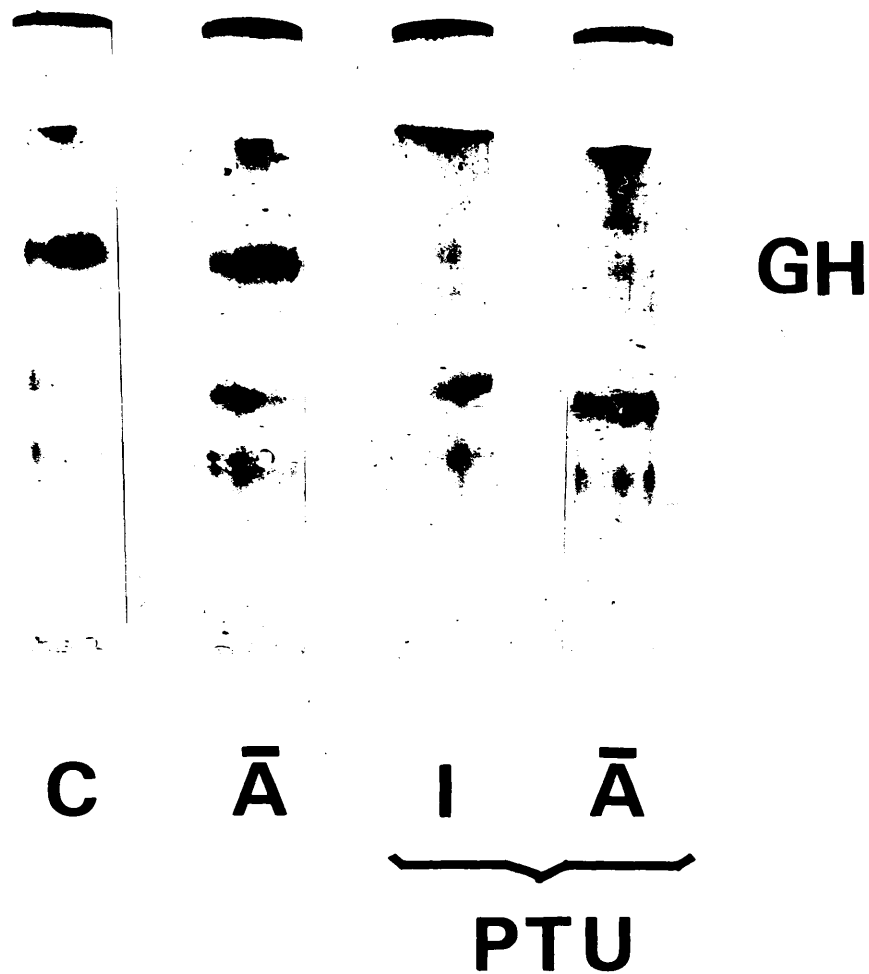


Figura nº 12.

Contenido de GH en pool de hipófisis de ratas controles (C) y adrenalectomizadas (\bar{A}), y de los correspondientes grupos tratados con PTU. Los datos corresponden a los animales del Experimento I.

afectó los niveles de glucosa, pero indujo un aumento significativo en los niveles de insulina de los animales adrenalectomizados.

La adrenalectomía no alteró el peso del tiroides de los animales no tratados. Sin embargo, tuvo un gran efecto en las ratas a PTU. Los animales adrenalectomizados y tratados con PTU, desarrollaron un bocio de mucho menor tamaño que el inducido por esta droga en animales intactos (Fig.11). A pesar de la diferencia en el peso del tiroides de las ratas intactas y adrenalectomizadas tratadas con PTU, no se encontraron diferencias en el contenido de iodo en tiroides ni en los niveles de PBI, que pudieran justificarlo.

En cuanto al contenido de GH en hipófisis (Fig. 12), el tratamiento con PTU lo disminuyó tanto en ratas intactas como en adrenalectomizadas. Aparentemente, la adrenalectomía sólo no altera el contenido de GH de la hipófisis, siendo éste igual que el del correspondiente grupo de ratas intactas con o sin tratamiento a PTU.

Por los resultados obtenidos en este primer experimento, parecía claro que en ausencia de adrenales o en presencia de altos niveles endógenos de ACTH, el tiroides no responde tan íntegramente al tratamiento con PTU. Pensamos que sería interesante investigar si la adrenalectomía afectaba asimismo el bocio inducido por otros antitiroideos, o ello sólo se daba en el caso del PTU. Para esto realizamos el siguiente experimento, estudiando el efecto de la adrenalectomía en animales tratados con ClO_4K , compa-

rando los resultados con los obtenidos en otros animales a PTU.

EXPERIMENTO II.

Efecto de la adrenalectomía (altos niveles de ACTH) en el bocio inducido por PTU o ClO_4K en metabolismo intratiroideo del I^{131} .

Dos grupos de ratas machos de 65-80 g, uno de los animales intactos (I) y otro de adrenalectomizados (\bar{A}), se dividieron en 3 sub-grupos dos días después de la operación. Uno de ambos sub-grupos de ratas (I) y (\bar{A}) recibieron la dieta habitual suplementada con iodo, mientras que los otros grupos recibían una dieta de bajo contenido en iodo y fueron tratadas con ClO_4K o PTU durante 9 días: (I) \dagger ClO_4K ; (I) \dagger PTU; (\bar{A}) \dagger ClO_4K y (\bar{A}) \dagger PTU. Tanto los grupos de ratas controles como los tratados con drogas recibieron salino en la bebida. El PTU se les inyectaba a diario en dosis de 3 mg/rata/día. Todos los demás grupos eran inyectados con 1 ml de salino, volumen en el cual se inyectaba el PTU. Todas las inyecciones se hicieron entre las 10-11 de la mañana. El ClO_4K se suministraba al 1 % en el salino de la bebida. A diario se controlaba la cantidad de salino bebida por los distintos grupos. La tarde antes del día en que los animales iban a ser sacrificados, fueron inyectados con 10 μCi de I^{131} . Todas las ratas fueron sacrificadas por guillotina entre las 9-10 de la mañana de un mismo día.

En las Tablas 4, 5, 6, 7 y 8 y en la Fig. 13 se representan algunos de los datos de animales correspondientes a este Experimento. Durante el periodo de experimentación de 9 días la adrenalectomía no alteró significativamente el peso de los animales

TABLA 4.- Efecto de la adrenalectomía sobre el peso de las adrenales, hipofísicas y aumento del peso corporal durante el periodo de experimentación, de ratas intactas (I) y adrenalectomizadas (\bar{A}) controles y tratadas con ClO_4K y PTU durante 9 días.

Grupos	Hipófisis mg / 100 g	Adrenales mg / 100 g	Aumento de peso corporal durante 9 días g
I (I)	3.9±0.7	21±2	30±8
II (I) + ClO_4K	3.7±0.7	20±1	22±2
III (I) + PTU	3.8±0.3	24±2	25±3
IV (A)	3.7±0.4	-	23±9
V (\bar{A}) + ClO_4K	3.8±1.4	-	20±8
VI (\bar{A}) + PTU	3.9±0.1	-	24±3
Estadística. Valores de p:			
I vs. IV	n.s.*	-	n.s.
II vs. V	n.s.	-	n.s.
III vs. VI	n.s.	-	n.s.

Los valores presentados son medias±DS de 6-7 ratas/grupo y corresponden a los animales del Experimento II.

* n.s. = no significativo ($p > 0.05$)

TABLA 5.- Efecto de la adrenalectomía sobre el contenido de iodo en tiroides, niveles de PBI, insulina y glucosa en plasma de ratas intactas (I) y adrenalectomizadas (\bar{A}) controles, y tratadas con ClO_4K y PTU durante 9 días.

Grupos	^{127}I en tiroides		Plasma	
	$\mu\text{g/glandula}$	$\mu\text{g}/100\text{ ml}$	PBI	Insulina $\mu\text{U} / \text{ml}$
I (I)	3.3 ± 1.0	5.1		32 ± 8
II (I) + ClO_4K	0.45 ± 0.15	1.5		17 ± 4
III (I) + PTU	0.35 ± 0.10	1.4		33 ± 4
IV (\bar{A})	2.3 ± 1.20	4.5		23 ± 4
V (\bar{A}) + ClO_4K	0.57 ± 0.20	1.5		20 ± 51
VI (\bar{A}) + PTU	0.40 ± 0.10	1.4		28 ± 10
Estadística. Valores de p:				
I vs. IV	n.s.*	-		< 0.05
II vs. V	n.s.	-		n.s.
III vs. VI	n.s.	-		n.s.

Los resultados presentados son medias \pm DS de 6-7 ratas/grupo y corresponden a los animales del Experimento II.

* n.s. = no significativo ($p > 0.05$)

TABLA 6.- Salino o salino + ClO₄K bebido por los diferentes grupos de animales del Experimento II.

Grupos		ml / rata / día
I	(I)	20 ± 5
II	(I) + ClO ₄ K	10 ± 3
III	(I) + PTU	18 ± 6
IV	(\bar{A})	18 ± 5
V	(\bar{A}) + ClO ₄ K	9 ± 2
VI	(\bar{A}) + PTU	9 ± 5
.....		
Estadística. Valores de p:		
I	vs. IV	n.s.*
II	vs. V	n.s.
III	vs. VI	< 0.001

Los datos presentados son medias ± DS de 6-7 ratas / grupo.

* n.s. = no significativo (p > 0.05)

TABLA 7.- Captación por el tiroides¹ de I¹³¹ y PBI¹³¹ en plasma de ratas intactas (I) y adrenalectomizadas (\bar{A}) controles, y de las tratadas con PTU ó ClO₄K durante 9 días.

Grupos	Captación % de la dosis	PBI ¹³¹
I (I)	35.1 ± 0.6	70 ± 6
II (I) † ClO ₄ K	1.9 ± 0.1	35 ± 15
III (I) † PTU	2.8 ± 1.2	15 ± 3
IV (\bar{A})	20.3 ± 0.7	60 ± 2
V (\bar{A}) † ClO ₄ K	0.8 ± 0.5	40 ± 11
VI (\bar{A}) † PTU	1.1 ± 0.2	20 ± 10
.....		
Estadística. Valores de p:		
I vs. IV	< 0.001	< 0.001
II vs. V	< 0.001	n.s.*
III vs. VI	< 0.01	n.s.

Los datos presentados son medias ± DS de 6-7 ratas por grupo y corresponden a los animales del Experimento II.

* n.s.= no significativo (p > 0.05)

¹ Los tiroides fueron obtenidos 14 horas después de la inyección de I¹³¹.

TABLA 8.- Distribución porcentual de los compuestos iodados intratiroides¹ marcados con ¹³¹I de ratas intactas (I) y adrenalectomizadas (A) controles, y de las tratadas con ClO₄ ó PTU durante 9 días.

Grupos	Material con RI=0	DIT ^k	MIT ^k	I ^{-k}	T ₄ ^k	T ₃ ^k	MIT/DIT ^k	T ₃ ^k /T ₄ ^k
I (I)	1.9±0.3	41.8±1.7	30.7±1.8	2.8±0.3	19.5±1.3	3.2±0.3	0.74±0.07	0.16±0.01
II (I) † ClO ₄	2.6±0.6	28.6±5.1	53.3±5.2	3.6±0.6	5.6±3.1	4.2±1.3	1.93±0.46	0.75±0.13
III (I) † PTU	2.9±2.2	13.2±1.9	62.2±5.1	15.8±2.5	4.5±1.0	5.2±0.9	4.8±0.78	1.15±0.02
IV (A)	2.7±0.7	36.3±1.5	33.7±1.8	2.1±0.2	20.0±2.3	3.6±0.6	0.90±0.03	0.18±0.03
V (A) † ClO ₄	2.6±1.0	30.5±4.2	42.9±7.6	3.3±0.6	8.9±2.4	5.5±0.7	1.20±0.30	0.61±0.07
VI (A) † PTU	3.8±0.4	13.9±0.7	52.8±1.8	15.7±0.3	6.9±0.8	4.9±0.9	3.81±0.30	0.71±0.09
.....								
Estadística. Valores de p:								
I vs. IV	< 0.05	< 0.001	< 0.05	< 0.05	n.s. ^k	n.s.	< 0.01	n.s.
II vs. V	n.s.	n.s.	< 0.02	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
III vs. VI	n.s.	n.s.	< 0.01	n.s.	< 0.01	n.s.	< 0.05	< 0.01

Los datos presentados son medias ± DS de 6-7 ratas / grupo y corresponden a los animales del Experimento II.

^k n.s. = no significativo (p > 0.05)

¹ Los tiroides fueron obtenidos 14 horas después de la inyección de ¹³¹I.

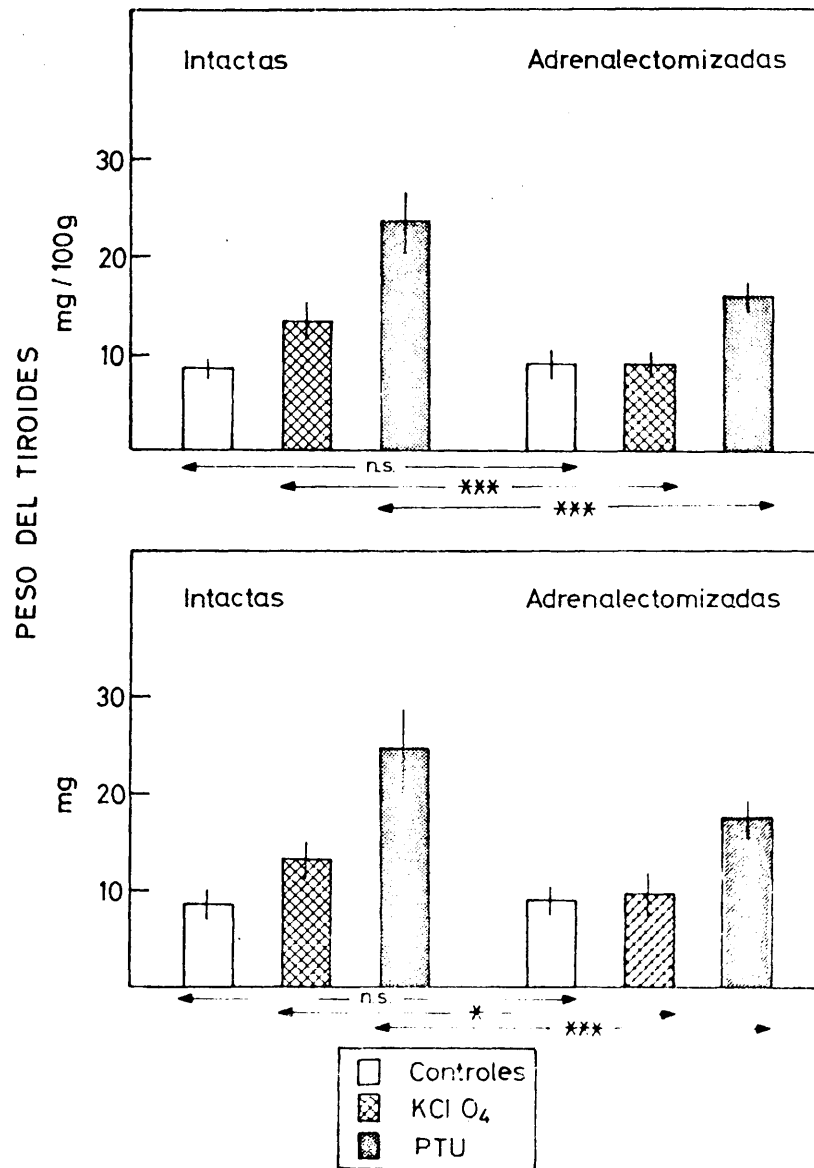


Figura nº 13.

Peso absoluto y relativo de tiroides de ratas intactas (I) y adrenalectomizadas (\bar{A}) controles y tratadas con ClO_4K o PTU durante 9 días. Los datos presentados son medias \pm DS de 6-7 ratas/grupo, y corresponden a los animales del Experimento II. Los asteriscos indican la significatividad de las diferencias entre dos grupos: *: $p < 0,05$; ***: $p < 0,001$; n.s.: no significativo ($p > 0,05$).

de los distintos grupos ni el de sus hipófisis. Asimismo, el contenido de iodo en tiroides y los niveles de PBI tampoco fueron afectados tanto en los animales controles como en los tratados a droga. Los niveles de insulina tenían iguales valores en las ratas (I) y (\bar{A}) tratadas con bociógenos, aunque en los animales controles, la adrenalectomía produjo un ligero descenso de éstos.

El tratamiento con ClO_4K o PTU en animales intactos indujo un aumento en el peso del tiroides, siendo este aumento mucho mayor en los animales tratados a PTU que en los de ClO_4K . Sin embargo, aunque la administración de ambos bociógenos indujo, tanto en el contenido de I^{127} en tiroides como en el PBI plasmático, una disminución con respecto a los valores de estos parámetros en los grupos controles, no había diferencias en estos datos que justificaran el porqué las ratas tratadas con PTU desarrollaban bocios mayores que las tratadas con ClO_4K .

En los niveles de insulina en plasma, se observaban cambios paralelos a los presentados por los pesos de los tiroides. Esto es, las ratas tratadas con PTU, que desarrollaban grandes bocios, mantenían niveles de insulina en plasma mucho mayores que las tratadas con ClO_4K , que desarrollaban bocios más pequeños.

La diferencia encontrada entre los pesos de los tiroides de los animales sometidos a ClO_4K y los tratados con PTU, se manifestaban, asimismo, en las ratas adrenalectomizadas. Sin embargo, las ratas adrenalectomizadas tenían un bocio de tamaño significativamente más pequeño que el de los animales intactos, cual-

quiera que hubiese sido el bociógeno empleado. Hasta tal punto afectó la adrenalectomía el tamaño del bocio que se puede decir, que las ratas (\bar{A}) tratadas con ClO_4K no lo desarrollaban, puesto que el peso de sus tiroides era igual al de los animales controles (\bar{A}) (Fig. 13).

Las diferencias encontradas entre el tamaño del bocio de ratas (I) y el de las ratas (\bar{A}) que recibían los mismo bociógenos, no podía estar justificada por una diferente intensidad de tratamiento, ya que, como ya se indicó en el caso del PTU, éste era inyectado. En el caso de los animales a ClO_4K , las cantidades ingeridas por los dos grupos fueron prácticamente iguales (Tabla 6).

En animales controles, la adrenalectomía afectó significativamente la captación de I^{131} por el tiroides e indujo una disminución en el por ciento de DIT^* . Sin embargo, los por cientos de los restantes compuestos iodados no fueron grandemente alterados. Sí hubo diferencias en el PBI^{131} del plasma, lo que indicaría que el tejido tiroideo de los animales intactos era más activo en cuanto a secreción que el de los adrenalectomizados.

Tanto en ratas (I) como en las (\bar{A}), la captación del I^{131} por el tiroides fue significativamente disminuida por el tratamiento con ambas drogas bociogénicas y este efecto estaba más acentuado en las ratas tratadas con ClO_4K que con PTU. Asimismo, el PBI^{131} fue significativamente disminuido por ambos tratamientos tanto en ratas (I) como en ratas (\bar{A}). Sin embargo, el PTU provocó una mayor disminución del PBI^{131} que el ClO_4K .

en ambos grupos de animales.

El tratamiento con cada una de estas drogas bociogénicas indujo una disminución estadísticamente significativa en los por cientos de T_4^* y DIT^* , lo que iba acompañado por un aumento del de MIT^* , siendo estos efectos más intesos en las ratas tratadas con PTU que en las de ClO_4K . Estos cambios se observaron tanto en las ratas (I) como en las (\bar{A}). Como consecuencia de estos cambios en los porcentajes de iodoaminoácidos, los cocientes MIT^*/DIT^* y T_3^*/T_4^* aumentaron en las ratas tratadas con antitiroideos con respecto a los controles. El contenido de I^{-131} en los dos grupos de ratas tratadas con PTU era muy superior al de los otros grupos.

La adrenalectomía no alteró grandemente los por cientos de los iodoaminoácidos de los animales tratados a ClO_4K o PTU.

Los resultados obtenidos en este experimento ponen de manifiesto que en ausencia de las adrenales y consecuentemente de todas las hormonas producidas por esta glándula, el peso del tiroides de las ratas tratadas con PTU o ClO_4K era mucho menor que en el animal intacto. Este efecto está más acusado en la acción bociogénica del PTU que en la del ClO_4K . Este hecho podía tener numerosas causas, y una de las primordiales de considerar era que hubiese diferencias en los niveles de hormona tirotrópica en plasma, entre animales (I) y (\bar{A}) tratados con antitiroideos.

En los animales adrenalectomizados la síntesis y secre-

ción de ACTH está muy estimulada, ya que existe un sistema "feed-back" negativo de interregulación entre las adrenales e hipófisis, de forma que una disminución de los niveles corticoides en plasma estimularía la función adenohipofisaria a aumentar la síntesis de ACTH, situación que en el animal adrenalectomizado está llevada al máximo. Por otra parte, al tratar con anti-tiroideos a estos animales, se induce una inhibición en la síntesis de las hormonas tiroideas y como consecuencia una disminución de los niveles de estas hormonas en plasma. Esta disminución, junto con la acción del TRH (factor hipotalámico estimulador del TSH), constituyen los dos mecanismos que estimulan a la adenohipófisis a aumentar su síntesis de TSH. O sea, en el animal adrenalectomizado y tratado con bociógenos, la adenohipófisis tiene que sintetizar dos de sus hormonas, ACTH y TSH, a un ritmo mayor que el normal, mientras que en el animal intacto tratado con antitiroideos sólo está aumentada la síntesis de TSH. Y es posible que en el animal (\bar{A}) y tratado con bociógeno la síntesis y secreción del TSH no pueda ser mantenida al mismo ritmo que en el animal intacto, aunque en ambas situaciones reciban el mismo estímulo, ya que los dos grupos de animales tienen el contenido de I^{127} en tiroides y el PBI plasmático igualmente bajos.

Nos pareció del mayor interés obtener datos con respecto a los niveles de TSH en plasma de animales (I) y (\bar{A}) tratados con antitiroideos, y estudiar la respuesta de ambos grupos de animales al tratamiento con TSH exógeno.

Además de obtener los datos de TSH, quisimos ver si la falta de respuesta del peso del tiroides al tratamiento con bo-

ciógenos de las ratas adrenalectomizadas podía deberse a la falta de glucocorticoides. Para aclarar estos puntos realizamos el siguiente experimento.

EXPERIMENTO III.

Efecto de la adrenalectomía en el desarrollo del bocio inducido por PTU. Efecto de la administración de TSH y corticosterona.

Ratas machos con un peso inicial de 65-80 g se dividieron en dos grupos principales: (I) y (\bar{A}). Diez días después de la adrenalectomía cada grupo fue dividido en dos. Uno de los cuales se alimentó con la dieta habitual suplementada con iodo. Los otros dos grupos fueron alimentados con la misma dieta sin agregarle iodo, siendo inyectados con 3 mg de PTU/rata/día en 1 ml de salino durante 12 días: (I) \downarrow PTU y (\bar{A}) \downarrow PTU, siendo los otros dos grupos inyectados con salino. Tres días después de comenzado el tratamiento con bociógeno, un grupo de (I) \downarrow \downarrow PTU o (\bar{A}) \downarrow PTU se inyectaron con 3 U TSH/rata/día (Ambinon de Organon) en 1 ml de salino. Otro grupo de ratas (\bar{A}) \downarrow \downarrow PTU se inyectaron con 500 μ g de corticosterona/rata/día (Sigma Chemical Co.) en 1 ml de salino. Los grupos de animales no tratados con TSH o corticosterona se inyectaron con 1 ml de salino. Tanto el TSH como la corticosterona se administraron hasta el final del periodo de experimentación. Todos los grupos recibieron salino como bebida.

Las Tablas 9 y 10 y la Fig. 14, muestran algunos datos de este Experimento. El peso corporal de los animales adrenalectomizados fue significativamente menor que el de los intactos. Este efecto de la adrenalectomía no se había puesto de manifiesto en el Experimento II, en donde las ratas fueron sacrificadas a

TABLA 9.- Peso de hígado, riñones, testículos, adrenales e hipófisis, y aumento del peso corporal durante el periodo de experimentación, de ratas (I) y adrenalectomizadas (A) tratadas con 3 mg de PTU /rata/día durante 12 días e inyectadas con 3 U de TSH/rata/día o 500 µg de corticosterona/rata/día en los últimos 9 días del tratamiento con bociógenos y de controles (I) y adrenalectomizadas (A) de la misma edad.

Grupos	Hígado g/100 g	Riñones g/100 g	Testículos g/100 g	Adrenales mg/100 g	Hipófisis mg/100 g	Aumento del peso corporal g
I I	5.6±1.0	0.92±0.05	1.60±0.30	19.3±3.2	4.00±0.32	79±11
II A	5.2±0.3	0.94±0.03	1.75±0.43	-	4.30±0.28	59±9
III I ± PTU	5.7±0.5	0.93±0.08	1.57±0.50	20.2±2.3	4.66±0.52	73±9
IV A ± PTU	5.1±1.0	0.95±0.02	1.71±0.57	-	4.60±0.87	52±10
V I ± PTU ± TSH	5.7±0.5	0.94±0.05	1.43±0.40	-	4.60±0.68	72±8
VI A ± PTU ± TSH	5.8±0.9	0.96±0.10	1.34±0.49	-	4.50±0.44	55±16
VII A ± PTU ± corticosterona	5.7±0.7	0.98±0.10	1.86±0.40	-	4.80±0.70	58±12
.....						
Estadística. Valores de p:						
I vs. II	n.s.	n.s.	n.s.	-	n.s.	< 0.001
III vs. IV	n.s.	n.s.	n.s.	-	n.s.	< 0.001
V vs. VI	n.s.	n.s.	n.s.	-	n.s.	< 0.002
IV vs. VII	n.s.	n.s.	n.s.	-	n.s.	n.s.

El peso inicial fue de 65-80 g. Los datos presentados son medias ± DS de 8-12 ratas/grupo y corresponden a los animales del Experimento III.

* n.s. = no significativo (p > 0.05)

TABLA 10.- Contenido de iodo en tiroides, niveles de PBI, glucosa e insulina en plasma y contenido de GH en hipófisis de ratas intactas (I) y adrenalectomizadas (A) tratadas con 3 mg de PTU/rata/día durante 12 días e inyectadas con 3 U TSH/rata/día ó 500 µg de corticosterona/rata/día durante los 9 últimos días del tratamiento con bociógenos y de sus controles (I) y (A) de la misma edad.

Grupos	I ¹²⁷ en tiroides		Plasma		GH mm ²
	µg/glándula	µg/100 ml	PBI µg/100 ml	Insulina % int. C	
I	5.70±3.20	5.20	102±8	164±10	4.5
II	6.40±2.90	5.90	106±14	169±14	4.1
III I ↓ PTU	0.08±0.03	0.69	121±22	169±11	0.5
IV A ↓ PTU	0.09±0.03	0.66	106±29	165±14	0.5
V I ↓ PTU ↓ TSH	0.09±0.03	0.70	120±19	165±12	0.2
VI A ↓ PTU ↓ TSH	0.07±0.02	0.80	89±31	168±15	0.3
VII A ↓ PTU ↓ Corticosterona	0.09±0.03	0.71	135±48	175±12	0.5
Estadística. Valores de p:					
I vs. II	n.s. ^k	-	n.s.	n.s.	-
III vs. IV	n.s.	-	n.s.	n.s.	-
V vs. VI	n.s.	-	n.s.	n.s.	-
IV vs. VII	n.s.	-	n.s.	n.s.	-

Los datos presentados son medias ± DS de 8-12 ratas/grupo y corresponden a los animales del Experimento III.

^k n.s. = no significativo (p > 0.05)

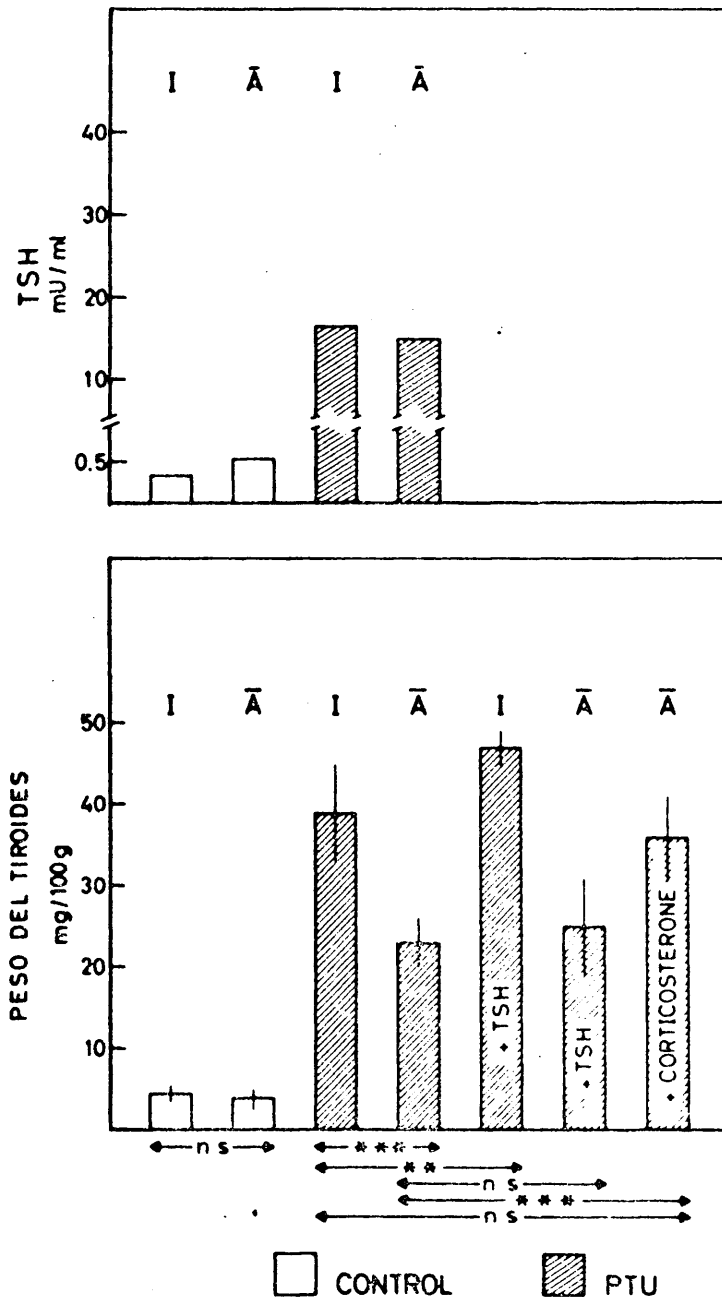


Figura nº 14.

Peso de tiroides y niveles de TSH en plasma (unidades arbitrarias de rata) de animales intactos (I) y adrenalectomizados (\bar{A}) tratados con 3 mg de PTU rata/día durante 12 días, y de los inyectados con 3 U de TSH/rata/día o con 500 μ g de corticosterona rata/día durante los últimos 9 días de tratamiento con bociógeno. Los datos presentados son medias \pm DE de 8-12 ratas/grupo, y corresponden a los animales del Experimento III. Los asteriscos indican la significatividad de las diferencias entre dos grupos: * : $p < 0,01$; ** : $p < 0,001$; n.s.: no significativo ($p > 0,05$).

tiempo más corto después de la operación. El aumento de peso corporal de los distintos grupos de ratas (I) o (\bar{A}) no se afectó respecto a sus controles por el tratamiento con PTU.

Los índices de la función tiroidea, como contenido de I^{127} en tiroides y PBI en plasma, los animales (\bar{A}) mantuvieron los mismos valores que los (I). El tratamiento con PTU indujo una disminución estadísticamente significativa de los niveles de estos dos parámetros y su efecto fue igualmente intenso en todos los grupos.

Los niveles de insulina y de glucosa en plasma eran iguales en todos los grupos de ratas (I) o (\bar{A}), tratadas o no con PTU, aunque parece notarse ligero aumento en el grupo de ratas (\bar{A}) tratado con corticosterona.

Por no tener determinaciones individuales del contenido de GH en hipófisis es muy difícil juzgar si hubo o no diferencias entre los distintos grupos. Pero parece que las hipófisis de las ratas (\bar{A}) tenían menor contenido que las de los animales (I). El tratamiento con PTU indujo una intensa disminución en el contenido de GH hipofisario en todos los grupos, siendo quizás más intenso en los grupos tratados además con TSH (Tabla 10).

Las ratas (I) tratadas con PTU desarrollaron un bocio de tamaño significativamente mayor que el de los animales (\bar{A}) \downarrow PTU. Sin embargo, esta diferencia en el peso del tiroides de ambos grupos de animales no podía justificarse por el contenido de iodo en tiroides ni por los niveles de PBI o TSH en plasma,

que eran los mismos en los dos grupos de animales (I) o (\bar{A}) tratados con este antitiroideo.

El tratamiento con TSH exógeno indujo un aumento significativo en el peso de los tiroides de ratas intactas tratadas con PTU. Sin embargo, en las ratas (\bar{A}) sometidas al mismo bociógeno, el tratamiento con TSH exógeno no tuvo ningún efecto.

La administración de 500 μ g de corticosterona a ratas (\bar{A}) tratadas con PTU indujo un aumento significativo en el peso de los tiroides sobre los valores encontrados en el grupo de (\bar{A}) \downarrow PTU, alcanzando los valores del grupo de (I) \downarrow PTU (Fig. 14).

En los resultados de este Experimento, volvíamos a encontrar que los animales (\bar{A}), en donde los niveles de ACTH son muy altos, responden al tratamiento con PTU con mucha menor intensidad que los animales (I), a pesar de que ambos grupos de ratas tenían los mismos niveles de TSH. El tratamiento con TSH exógeno, que fue efectivo a nivel de peso de tiroides en ratas (I), no lo fue en ratas (\bar{A}).

Por otra parte, el que se obtuviera un aumento significativo del peso del tiroides de ratas (\bar{A}) tratadas con PTU cuando se les administró corticosterona, pone de relieve la importancia de los glucocorticoides en esta situación.

Quedaba, pues, aclarado que el ACTH en sí no tenía acción sinérgica con el TSH a nivel de crecimiento del tiroides.

Se había descrito anteriormente (Escobar del Rey y cols., 1968; Jolín y cols., 1970) que en el animal intacto tratado con antitiroideos, la administración de insulina inducía un aumento del peso de los tiroides. ¿Tenía la insulina algún efecto en el tamaño de los bocios de las ratas (\bar{A})? El estudiar este punto era sumamente interesante pues él nos podía aclarar el mecanismo por el que la insulina producía un aumento en el peso de los tiroides de animales (I) tratados con bociógenos.

EXPERIMENTO IV.

Efecto de la insulina sobre el peso del tiroides de ratas intactas (I) y adrenalectomizadas (\bar{A}) tratadas con ClO_4K o PTU \pm ClO_4K .

Ratas intactas (I) y adrenalectomizadas (\bar{A}) se dividieron 1 día después de la adrenalectomía en los grupos siguientes: (I) \pm PTU; (I) o (\bar{A}) con ClO_4K y (I) o (\bar{A}) con PTU \pm ClO_4K . El tratamiento con antitiroideos duró 12 días. Tres días después de iniciado este tratamiento, subgrupos de ratas (I) o (\bar{A}) tratadas con ClO_4K o PTU \pm ClO_4K se inyectaron i.p. con 0,05 U de insulina/rata/día (Novo Lente) en 1 ml de salino hasta el final del periodo de experimentación. En los experimentos en los que está descrito que la insulina aumenta el peso del tiroides de ratas tratadas con bociógenos, usaron 0,2 U de insulina/rata/día. Nosotros intentamos usar en principio esta misma dosis, pero las ratas adrenalectomizadas no soportaban tan alta cantidad, muriendo un gran número de animales, por lo que tuvimos que emplear una dosis de insulina más baja. Los grupos no tratados con insulina se inyectaron a diario con el mismo volumen de salino. Todos los grupos de ratas bebieron salino durante el tiempo que duró el experimento. El PTU en dosis de 3 mg/rata/día fue inyectado i.p. a diario en 1 ml de salino. El ClO_4K se administró en la bebida al 1 %. Cada mañana se midió la cantidad de salino o salino \pm ClO_4K bebida por cada grupo.

Las Tablas 11, 12 y 13 y las Figs. 15 y 16, repre-

TABLA 12.- Contenido de iodo en tiroides, niveles de PBI e insulina en plasma, y contenido de GH en hipófisis de ratas (I) y adrenalectomizadas (A) tratadas con PTU, ClO₄K ó PTU + ClO₄K durante 12 días, y de las inyectadas con 0.05 U de insulina en los últimos 9 días de tratamiento con bociógenos.

	I ¹²⁷ en tiroides yg/glándula	Plasma		GH-Hipófisis mm ²
		PBI yg/100 ml	Insulina % Int. C	
I I+PTU	0.06±0.02	0.4±0.1	170±22	0.5
II I + ClO ₄	0.05±0.00	0.4±0.1	54±12	0.7
III A + ClO ₄ K	0.08±0.06	0.5±0.2	45±10	0.8
IV I + PTU + ClO ₄	0.06±0.02	0.4±0.1	54±17	0.8
V A + PTU + ClO ₄	0.07±0.02	0.4±0.1	63±28	0.5
VI I + ClO ₄ + insulina	0.04±0.01	0.5±0.1	-	0.7
VII A + ClO ₄ + insulina	0.07±0.02	0.4±0.1	-	0.5
VIII I + PTU + ClO ₄ K + insulina	0.04±0.02	0.4±0.1	-	0.4
IX A + PTU + ClO ₄ K+insulina	0.05±0.00	0.4±0.1	-	0.8
			
Estadística. Valores de p:				
II vs. III	n.s.	n.s.	n.s.	-
IV vs. V	n.s.	n.s.	n.s.	-
II vs. VI	n.s.	n.s.	-	-
III vs. VII	n.s.	n.s.	-	-
IV vs. VIII	n.s.	n.s.	-	-
V vs. IX	n.s.	n.s.	-	-

Los datos presentados son medias ± DS de 4-7 ratas/grupo y corresponden a los animales del Experimento IV.

n.s. = no significativo (p > 0.05)

TABLA 13.- Salino o salino + ClO₄K bebido por los diferentes grupos durante el periodo de experimentación

Grupos	ml / rata / día
I PTU (I)	23.3 ± 5.1
II ClO ₄ K (I)	8.7 ± 1.1
III ClO ₄ K (A)	12.9 ± 5.6
IV PTU + ClO ₄ K (I)	10.2 ± 3.4
V PTU + ClO ₄ K (A)	11.1 ± 3.3
VI ClO ₄ K + insulina (I)	9.6 ± 1.2
VII ClO ₄ K + insulina (A)	12.7 ± 3.6
VIII PTU + ClO ₄ K + insulina (I)	10.4 ± 2.6
IX PTU + ClO ₄ K + insulina (A)	11.6 ± 0.9
.....	
Estadística. Valores de p:	
II vs. III	n.s.*
IV vs. V	n.s.
II vs. VI	n.s.
III vs. VII	n.s.
IV vs. VIII	n.s.
V vs. IX	n.s.

Los datos presentados son medias ± DS de 4-7 ratas/grupo y corresponden a los animales del Experimento IV.

* n.s. = no significativo (p > 0.05)

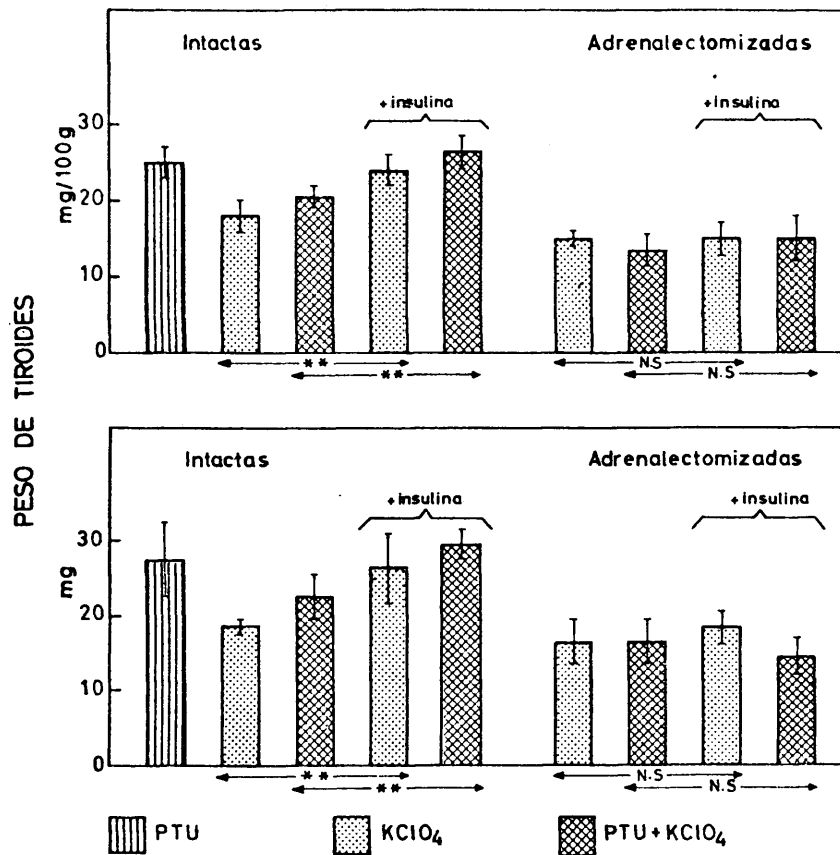


Figura no 15.

Peso de tiroides de ratas intactas (I) y adrenalectomizadas (\bar{A}) tratadas con PTU, ClO₄K o PTU + ClO₄K durante 12 días, y de las inyectadas con 0,05 U de insulina/rata/día durante los últimos 9 días de tratamiento con bociógenos. Los resultados presentados son medias \pm DS de 4-7 ratas/grupo, y corresponden a los animales del Experimento IV. Los asteriscos indican la significatividad de las diferencias entre dos grupos: **: p < 0,01; n.s.: no significativo (p > 0,05).

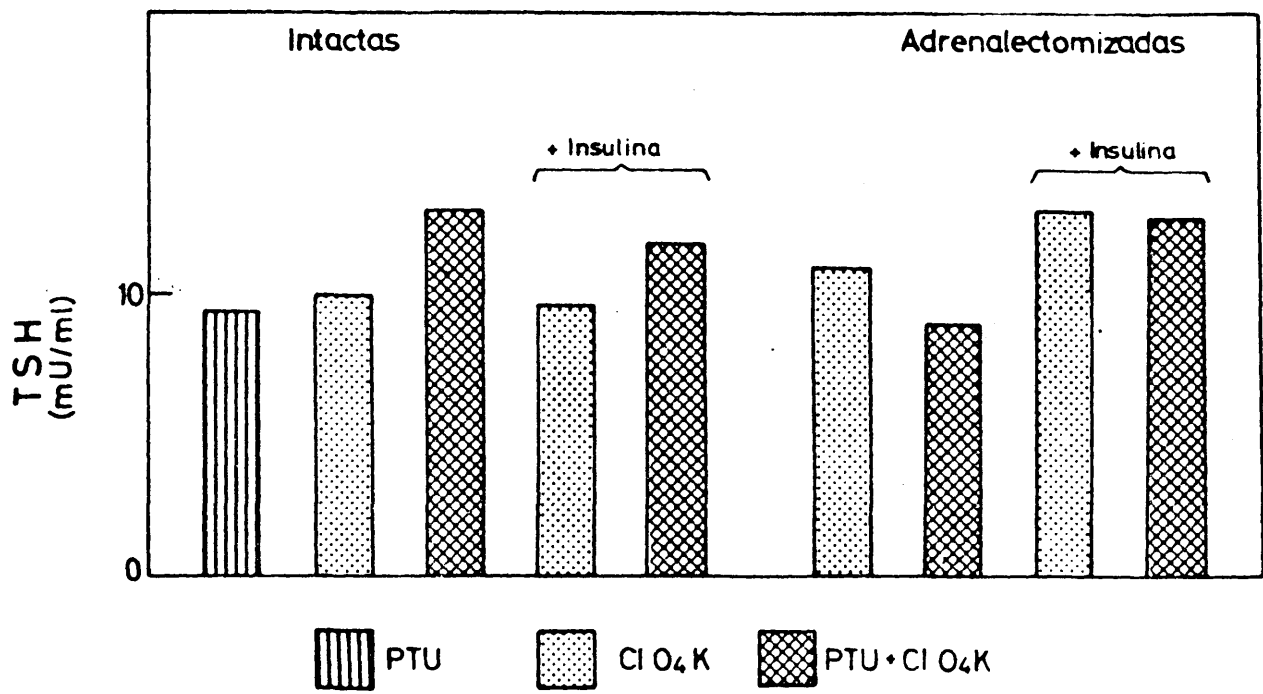


Figura nº 16.

Niveles de TSH (unidades arbitrarias de rata) en plasma de ratas intactas (I) y adrenalectomizadas (\bar{A}) tratadas con PTU, ClO₄K y PTU + ClO₄K durante 12 días, y de las inyectadas con 0,05 U de insulina/rata/día en los últimos 9 días de tratamiento con bociógeno. Los resultados presentados son valores en el pool de plasmas de cada grupo, y corresponden a los animales del Experimento IV.

sentan los resultados de este experimento.

El aumento de peso corporal durante el periodo de experimentación fue el mismo para las ratas (I) o (\bar{A}) tratadas con los distintos antitiroideos. El tratamiento con insulina no afectó el peso de los animales en la mayoría de los grupos. Sólo el grupo de (\bar{A}) \downarrow PTU \downarrow ClO_4K \downarrow insulina mostró un aumento de peso significativamente inferior al grupo analogo de ratas intactas. El peso de las hipófisis, en valor absoluto o relativo, presentan igual valor en los distintos grupos de animales. Los animales tratados a PTU mostraron un peso absoluto y relativo de las adrenales superior al de las ratas tratadas con ClO_4K ($p < 0,05$). Por otra parte el tratamiento con insulina indujo un aumento significativo en el peso de las adrenales de los grupos (I) \downarrow ClO_4K y (I) \downarrow PTU \downarrow ClO_4K . (Tabla 11).

Las ratas (I) tratadas con PTU desarrollaron un bocio de tamaño superior al de las ClO_4K ($p < 0,001$), mientras que el grupo (I) \downarrow PTU \downarrow ClO_4K desarrollaron un bocio cuyo peso absoluto era intermedio al de los grupos que recibían ambos antitiroideos por separado, o sea, estadísticamente inferior al de los animales tratados con PTU ($p < 0,05$), y superior al de los tratados solo con ClO_4K ($p < 0,001$). En el peso relativo del tiroides se encontraron diferencias análogas entre los grupos considerados: (I) \downarrow PTU $>$ (I) \downarrow PTU \downarrow ClO_4K $>$ (I) \downarrow ClO_4K . Sin embargo, estas diferencias entre el peso del tiroides de estos tres grupos no estaba justificada por el contenido de iodo en tiroides ni por el PBI en plasma, que eran igualmente bajos en los tres grupos de animales, ni por los niveles de TSH que eran igual-

mente altos, aunque quizás un poco más alto en el grupo (I) \downarrow PTU \downarrow ClO_4K que no era precisamente el grupo que desarrollaba los bocios mayores. (Fig. 15 y 16).

Solamente encontramos diferencias en los niveles de insulina en plasma. Las ratas tratadas con PTU, que eran las que desarrollaban los mayores bocios, mantenían niveles de insulina en plasma muy superiores al de los grupos tratados con ClO_4K ($p < 0,001$) o PTU \downarrow ClO_4K ($p < 0,01$).

La adrenalectomía, como en los experimentos anteriormente descritos, afectó intensamente el desarrollo del bocio. Las ratas (\bar{A}) tratadas con ClO_4K o PTU \downarrow ClO_4K tenían un peso de tiroides mucho menor que el de los respectivos grupos de ratas (I), siendo este efecto más acusado en los animales tratados a PTU \downarrow ClO_4K que en los de ClO_4K . A pesar de las diferencias encontradas entre los animales (I) o (\bar{A}), ambos grupos mantenían igual contenido de iodo en glándula y niveles de PBI o TSH en plasma, y tampoco los niveles de insulina podían justificar estas diferencias ya que tanto las ratas (I) como (\bar{A}) a ClO_4K o PTU \downarrow ClO_4K mantenían iguales niveles.

La administración de insulina indujo un aumento del peso de los tiroides de ratas (I) tratadas con ClO_4K o PTU \downarrow ClO_4K . Sin embargo, dicho tratamiento fue inefectivo en los animales (\bar{A}) que recibían los mismos antitiroideos. La respuesta del peso de los tiroides de las ratas (I) al tratamiento con insulina ocurrió sin que se produjeran cambios en los niveles de TSH y demás parámetros de la función tiroidea.

Además la diferencia en el peso de los tiroides de las ratas (I) o (\bar{A}) tratadas con ClO_4K o $\text{PTU} \dagger \text{ClO}_4\text{K}$, inyectadas o no con insulina, tampoco se podía justificar sobre la base de las cantidades de antitiroideos ingeridas por los distintos grupos. En el caso del PTU , no cabe la posibilidad de que unos grupos estuviesen tratados de una forma más intensa que otros puesto que se inyectaba. En cuanto al ClO_4K , la Tabla 13 muestra que no hubo diferencias entre las cantidades de salino $\dagger \text{ClO}_4\text{K}$ bebida por los diferentes grupos de ratas durante el periodo de experimentación.

Los resultados de este experimento confirmaban lo hallado en los anteriores. La adrenalectomía impedía el pleno desarrollo del bocio inducido por el tratamiento con PTU , ClO_4K o $\text{ClO}_4\text{K} \dagger \text{PTU}$. Por otra parte, el tratamiento con insulina aunque indujo un claro aumento en el peso de los tiroides de los animales (I) tratados con antitiroideos como en ocasiones anteriores, fue inefectivo en ratas adrenalectomizadas. Este hecho, junto al aumento del peso de las adrenales de los grupos de ratas intactas tratadas con insulina respecto de las no tratadas, y que el efecto de la adrenalectomía sobre los pesos del tiroides se revierte por la acción de la corticosterona hacia los valores encontrados en ratas intactas, señalaban la importancia de las adrenales, y por consiguiente de los glucocorticoides, en el mecanismo de la bociogénesis, y en el mecanismo por el que el tratamiento con insulina induce un aumento del peso de los tiroides de ratas tratadas con antitiroideos. Por estos hechos, consideramos de gran interés el estudio de la acción de los corticoides sobre el peso de los tiroides de ratas intactas y de las tratadas con antitiroideos.

El primer problema que se nos planteó fue qué dosis de glucocorticoides deberíamos usar en nuestros experimentos. La consideración de las dosis empleadas por otros autores (Tablas 1 a, b, c) por una parte y el que nosotros quisieramos realizar nuestros experimentos con cantidades de corticoides lo más cercana posible a lo que podrían ser los niveles fisiológicos de estas hormonas en plasma, nos hizo realizar este primer experimento en el que estudiamos el efecto de diferentes dosis de corticosterona sobre varios parámetros de la función tiroidea.

EXPERIMENTO V.

Efecto de diferentes dosis de corticosterona sobre la función tiroidea de ratas tratadas con PTU.

Un grupo de ratas machos de 60-75 g, se sometieron durante 16 días a una dieta de bajo contenido en iodo, recibiendo PTU en el agua de bebida a una concentración de 0,05 %. Tres días después de iniciado el tratamiento, cada uno de los grupos se dividió en cuatro subgrupos, uno considerado como control, y tres que se inyectaron s.c. con 0,2, 1 ó 5 mg de corticosterona/rata/día, respectivamente, en suspensión en 1 ml de salino. El grupo control se inyectó a diario con 1 ml de salino. Este tratamiento duró hasta el final del periodo de experimentación. La inyección se hace subcutáneamente y en suspensión, para conseguir una absorción más lenta, con lo cual, el periodo de acción del corticoide es más prolongado. Todas las inyecciones se hacían preferentemente por la tarde, alrededor de las 17 horas. Doce horas antes del sacrificio, todos los animales se inyectaron con 20 μ Ci de I^{131} . Se sacrificaron todos un mismo día entre las nueve y diez de la mañana.

Las Tablas 14, 15 y 16 y las Figs. 17 y 18, representan algunos de los datos correspondientes a este Experimento. Se incluyen datos pertenecientes a ratas controles de la misma edad, para poner de manifiesto la acción del PTU sobre algunos parámetros, como contenido de iodo en tiroides, iodo ligado a proteínas plasmáticas, crecimiento, etc. Los efectos del PTU fueron

TABLA 14.- Peso de hígado, riñones, testículos, adrenales e hipófisis y aumento de peso corporal de ratas tratadas con PTU durante 16 días, y de las inyectadas con 0.2, 1 ó 5 mg de corticosterona /rata/día en los últimos 13 días de tratamiento con bociógenos.

Grupos	Hígado g/100 g	Riñones g/100 g	Testículos g/100 g	Adrenales mg/100 g	Hipófisis mg/100 g	Aumento del peso corporal g
I Controles	4.3±0.2	1.0±0.1	1.2±0.2	23.0±1.0	3.5±0.1	84±8
II PTU	4.6±0.3	1.0±0.1	1.3±0.3	23.8±1.2	5.5±0.2	45.3±7.9
III PTU ± 0.2 mg corticosterona	4.6±0.3	1.1±0.1	1.3±0.1	21.2±1.4	6.5±0.1	41.8±6.4
IV PTU ± 1 mg corticosterona	5.1±0.4	1.0±0.1	1.3±0.2	15.4±2.1	5.6±0.2	38.8±7.4
V PTU ± 5 mg corticosterona	6.9±0.5	1.3±0.1	1.5±0.3	9.6±1.0	6.2±0.5	14.5±3.4
.....						
Estadística. Valores de p:						
II vs. III	n.s. ^a	n.s.	n.s.	< 0.05	< 0.01	n.s.
II vs. IV	< 0.01	n.s.	n.s.	< 0.001	n.s.	n.s.
II vs. V	< 0.001	< 0.05	n.s.	< 0.001	< 0.01	< 0.001

Los datos presentados son medias ± DS de 6 ratas/grupo, y corresponden a los animales del Experimento V.

^a n.s. = no significativo (p > 0.05)

TABLA 15.- Contenido de iodo en tiroides y niveles de PBI, insulina y glucosa en plasmas de ratas tratadas con PTU durante 16 días, y de las inyectadas con 0.2, 1 ó 5 mg de corticosterona./rata/día en los últimos 13 días de tratamiento con bociógenos.

Grupos	¹²⁷ I en tiroides			Plasma		
	$\mu\text{g/g}$ glándula	PBI $\mu\text{g}/100$ ml	Insulina $\mu\text{U}/\text{ml}$	Glucosa $\text{mg}/100$ ml		
I Controles	8.50 \pm 2.90	3.10	33 \pm 5	158 \pm 12		
II PTU	0.03 \pm 0.01	0.02	31 \pm 8	160 \pm 16		
III PTU \pm 0.2 mg corticosterona	0.04 \pm 0.02	0.02	39 \pm 9	164 \pm 12		
IV PTU \pm 1 mg corticosterona	0.03 \pm 0.01	0.02	36 \pm 8	165 \pm 9		
V PTU \pm 5 mg corticosterona	0.03 \pm 0.02	0.03	63 \pm 16	184 \pm 15		
.....						
Estadística. Valores de p:						
II vs. III	n.s. ^k	-	n.s.	n.s.		
II vs. IV	n.s.	-	n.s.	n.s.		
II vs. V	n.s.	-	< 0.001	< 0.01		

Los datos representados son medias \pm DS de 6 ratas/grupo y corresponden a los animales del Experimento V.

^k n.s. = no significativo (p > 0.05)

TABLA 16.- Distribución porcentual de los compuestos iodados intratiroides¹ marcados con ¹³¹I de ratas tratadas con PTU durante 16 días, inyectadas con distintas dosis de corticosterona durante los últimos 13 días.

Grupos	Distribución intratiroides porcentual del radio- iodo captado.				Proporciones intratiroides relativas del I ¹³¹ en formate iodotirosinas e iodotironinas.				
	Captación % de la dosis	Material R(t=0)	DIT [*]	MIT [*]	I ¹³¹	T ₄ [*]	T ₃ [*]	MIT [*] /DIT [*]	T ₃ [*] /T ₄ [*]
0 C	32.2	3.8	41.1	26.2	6.3	21.2	0.6	0.2	
I PTU	10.2±2.9	1.8±1.9	5.4±0.1	49.9±4.2	40.9±4.2	1.9±0.6	9.7±0.2	0.5±0.8	
II PTU ± 0.2 mg corticosterona	15.2±4.1	3.2±0.4	7.6±0.9	52.2±3.2	34.2±3.3	2.9±0.8	6.9±0.9	0.9±0.4	
III PTU ± 1 mg corticosterona	11.6±6.8	4.4±1.1	7.8±0.9	59.4±5.2	25.0±5.5	3.4±1.2	7.7±1.0	0.7±0.5	
IV PTU ± 5 mg corticosterona	11.5±7.2	3.0±0.8	7.7±1.2	60 ±5.2	26.0±3.5	3.1±0.4	7.8±1.0	0.9±0.4	
.....									
Estadística. Valores de p:									
I vs. II	< 0.01	< 0.001	< 0.001	n.s.	< 0.02	< 0.05	< 0.001	n.s. [*]	n.s. [*]
I vs. III	n.s.	< 0.001	< 0.001	< 0.02	< 0.001	< 0.05	< 0.01	n.s.	n.s.
I vs. IV	n.s.	< 0.001	< 0.01	< 0.01	< 0.001	< 0.01	< 0.01	< 0.01	n.s.

Los valores presentados son medias ± DS de 6 ratas/grupo y corresponden a los animales del Experimento V.

* n.s. = no significativo (p > 0.05)

¹ Las glándulas fueron obtenidas 12 horas después de ser inyectados los animales con ¹³¹I

PESO DE TIROIDES

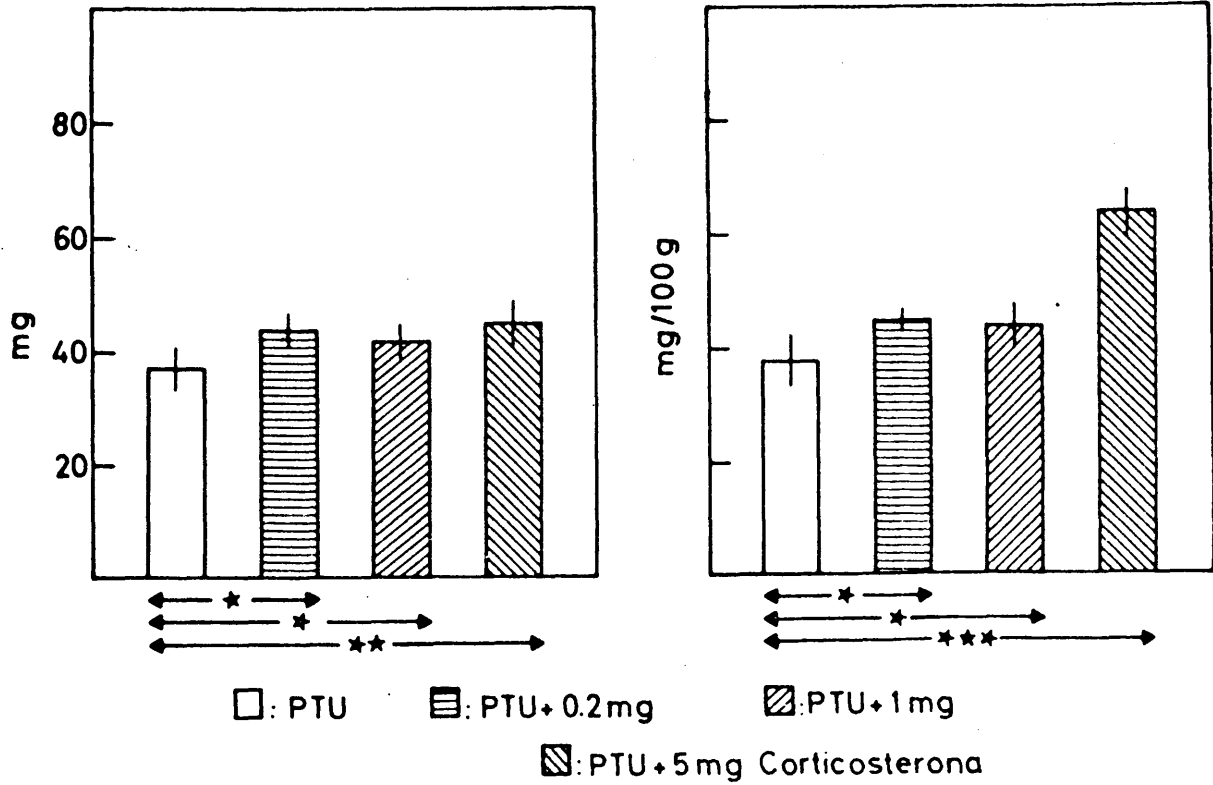


Figura nº 17.

Peso absoluto y relativo de tiroides de ratas a PTU durante 16 días y de grupos a PTU tratados con distintas dosis de corticosterona diariamente durante los 13 últimos días de tratamiento con bociógeno. Los datos presentados son medias \pm \pm DE de 6 ratas/grupo, y corresponden a los animales del Experimento V. Los asteriscos indican la significatividad de las diferencias entre dos grupos: * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$; n.s. : no significativo ($p > 0,05$).

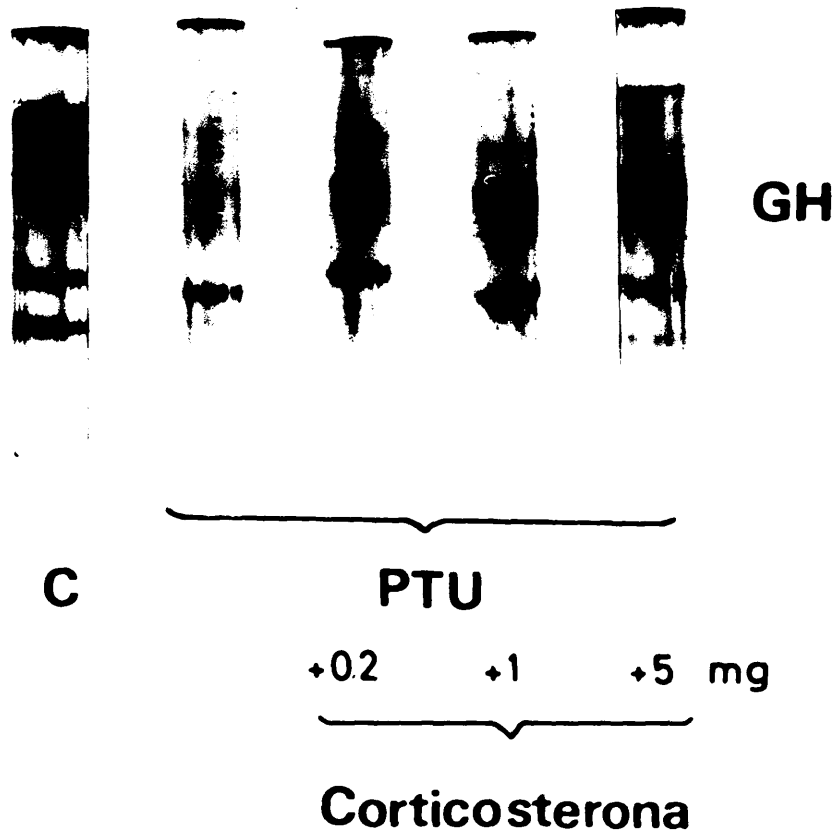


Figura nº 18.

Contenido de GH en pool de hipófisis, en gel de poliacrilamida, de ratas a PTU y de grupos a PTU que recibían distintas dosis de corticosterona. Se incluye un patrón correspondiente a animales controles de la misma edad, para poner de manifiesto el efecto del hipotiroidismo sobre el contenido de GH en hipófisis. Los datos corresponden a los animales del Experimento V.

en todo semejantes a los observados en Experimentos anteriores.

La administración de la dosis más alta de corticosterona disminuyó significativamente el aumento de peso corporal. El peso del hígado aumentó significativamente por la administración de las dos dosis mayores, y el de los riñones aumentó en los animales tratados con 5 mg de corticosterona. Sin embargo, el peso de las adrenales disminuyó significativamente por la administración de las tres dosis del glucocorticoide.

El tratamiento con las tres dosis de corticoide produjo un aumento significativo del tiroides, comparado con el de los animales que sólo recibían antitiroideo (Fig. 17). No obstante, no encontramos una relación lineal entre las dosis y la respuesta, lo que quizás pueda deberse a que las dos dosis más altas empleadas han inhibido los niveles endógenos de corticosterona, posibilidad sugerida por el menor peso de las adrenales de estos dos grupos.

En aquellos casos en que la administración de corticosterona ha inducido un aumento del peso del tiroides de las ratas tratadas con PTU, esta diferencia no se puede justificar por el contenido de iodo en tiroides ni por los niveles de PBI en plasma que son igualmente bajos en todos los grupos, lo que demuestra que todos los animales tienen un hipotiroidismo del mismo grado.

El tratamiento con corticosterona no afectó a los niveles de insulina excepto en las dosis más alta. Se encuentra un

efecto semejante en los niveles de glucosa.

En la Tabla 15, se muestra la distribución del "pool" intratiroideo marcado con radioiodo. Los grupos de animales tratados con PTU muestran un patrón de distribución de iodoaminoácidos marcados intratiroideos muy distinto al que presentan las ratas normales. El tanto por ciento de captación del I^{131} está muy disminuido así como los por cientos de DIT^* y T_3^* y T_4^* . Por el contrario el tratamiento con PTU indujo un aumento en el por ciento de MIT^* y sobre todo de I^{-*} , lo cual es indicativo de que tanto la iodación como el acoplamiento de iodotirosinas para dar lugar a la síntesis de iodotironinas está muy disminuido por el tratamiento con este antitiroideo, lo que habíamos ya encontrado en el Experimento II.

La administración de corticosterona aumentó significativamente la proporción relativa de todos los iodoaminoácidos tiroideos, a la vez que disminuyó el contenido de radioiodo en forma de I^- . El cociente MIT^*/DIT^* disminuyó ligeramente en los grupos tratados con corticosterona, lo que indica un mayor aumento en la ulterior iodación de MIT^* a DIT^* . Simultáneamente, la proporción de radioiodo transformado en hormona (T_3^* y T_4^*) aumentó significativamente con el tratamiento de corticosterona.

La electroforesis de los homogenados de hipófisis en gel de poliacrilamida (Fig. 18) mostró que a medida que aumenta la dosis de corticosterona administrada a los animales, la banda correspondiente a la hormona de crecimiento (GH) aparecía con mayor intensidad comparada con la de los animales tratados sólo a

PTU, en cuyas hipófisis prácticamente había desaparecido dicha banda. Con la dosis más baja de corticosterona este efecto no fue tan intenso, aunque se visualizó un incremento con respecto a los animales tratados sólo con PTU.

A la vista de estos resultados decidimos que en los próximos experimentos usaríamos dosis pequeñas de corticoides, alrededor de 200 $\mu\text{g}/\text{rata}/\text{día}$, que no afecta el peso de órganos, como hígado o riñón, y que influye mínimamente en el peso de las adrenales.

Los resultados de este Experimento parecen confirmar la idea de que la administración de corticoides aumenta el peso del tiroides de ratas tratadas con antitiroideos. Nos pareció interesante comprobar si este efecto de la corticosterona aumentando el peso del tiroides de ratas tratadas con PTU, se producía asimismo en animales tratados con otros bociógenos, comprobando si este efecto de los glucocorticoides era una acción particular relacionada con los múltiples efectos extratiroideos del PTU (Screebny y cols., 1962; Fregly y Tailor, 1964; Fregly y cols., 1960), o se podía hacer extensivo a otros antitiroideos.

EXPERIMENTO VI.

Efecto de la corticosterona en el peso del tiroides de ratas tratadas con PTU o ClO_4K .

Varios grupos de ratas con un peso inicial de 85-95 g se sometieron a una dieta de bajo contenido en iodo durante 20 ó 35 días, al mismo tiempo que fueron tratadas con PTU o ClO_4K . Las dos drogas se les administraron en el agua de bebida a las concentraciones de 1 ‰ y 0,05 ‰, respectivamente. Los animales controles fueron alimentados con la misma dieta suplementada con iodo y bebieron agua destilada. Tres días después de iniciado el tratamiento con antitiroideos cada grupo se dividió en dos. Uno de ellos se inyectaba a diario s.c. con 0,2 mg de corticosterona, (Sigma Chemical Corp.) en 1 ml de salino: Cl † corticosterona, ClO_4K † corticosterona y PTU † corticosterona. Los otros tres grupos se inyectaron con 1 ml de salino: Cl † salino o PTU † salino. Todos los tratamiento se hacían sobre las nueve de la mañana.

Las Tablas 17, 18, 19 y 20 y las Figs. 19, 20, 21, 22 y 23 muestran algunos datos de los animales de este Experimento.

El aumento de peso corporal fue menor en los animales tratados con antitiroideos durante 20 ó 35 días, siendo este efecto más intenso en las ratas tratadas con PTU que en las de ClO_4K , era más patente a los 35 que a los 20 días de experimen-

TABLA 17.- Peso de hígado, riñones, testículos, adrenales e hipófisis, y aumento de peso corporal durante el período de experimentación, de ratas tratadas con PTU ó ClO₄K durante 20 días, de las inyectadas con 200 µg de corticosterona/rata/día en los últimos 18 días de tratamiento con bociógenos, y de los controles de la misma edad.

Grupos	Hígado g/100 g	Riñones g/100 g	Testículos g/100 g	Adrenales mg/100 g	Hipófisis mg/100 g	Aumento del peso corporal g
I C † salino	5.3±0.4	1.02±0.03	1.24±0.10	21.3±2.8	4.0±0.6	84±15
II ClO ₄ K † salino	4.1±0.3	0.81±0.03	1.40±0.20	15.5±2.8	5.3±0.4	60±4
III PTU † salino	4.3±0.1	0.90±0.06	1.55±0.17	16.8±1.8	5.5±0.6	43±3
IV C † corticosterona	4.9±0.4	1.01±0.04	1.23±0.20	15.2±3.0	3.6±0.7	80±16
V ClO ₄ K † corticosterona	4.4±0.5	0.84±0.07	1.31±0.17	11.3±5.1	4.9±0.6	66±10
VI PTU † corticosterona	4.5±0.4	0.89±0.05	1.60±0.15	15.9±1.4	5.5±0.7	46±3
.....						
Estadística. Valores de p:						
I vs. IV	n.s. ^k	n.s.	n.s.	<0.01	n.s.	n.s.
II vs. V	n.s.	n.s.	n.s.	<0.05	n.s.	n.s.
III vs. VI	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Los datos presentados son medias ± DS de 7-8 ratas/grupo y corresponden a los animales del Experimento VI.

^k n.s. = no significativo (p > 0.05)

TABLA 18.- Peso de hígado, riñones, testículos, adrenales e hipófisis, y aumento de peso corporal durante el periodo de experimentación, de ratas tratadas con PTU ó ClO_4K durante 35 días, de las inyectadas con 200 μg de corticosterona/rata/día en los últimos 32 días de tratamiento con bociógenos, y de los controles de la misma edad.

Grupos	Hígado g/100 g	Riñones g/100 g	Testículos g/100 g	Adrenales mg/100 g	Hipófisis mg/100 g	Aumento del peso corporal g
I C † salino	5.1±0.3	0.86±0.14	1.08±0.05	16.0±3.5	3.4±0.40	158±8
II ClO_4K † salino	3.7±0.4	0.73±0.03	1.60±0.04	13.8±2.1	5.4±0.50	55±8
III PTU † salino	4.2±0.5	0.84±0.09	1.70±0.30	17.9±2.4	5.8±0.80	47±11
IV C † corticosterona	4.7±0.3	0.86±0.04	1.03±0.14	15.3±2.4	3.7±1.00	156±15
V ClO_4K † corticosterona	3.7±0.3	0.73±0.06	1.61±0.22	13.1±2.0	5.4±1.00	58±10
VI PTU † corticosterona	3.8±0.5	0.85±0.13	1.65±0.01	14.8±1.5	6.8±0.90	31±7
.....						
Estadística. Valores de p:						
I vs. IV	< 0.05	n.s. ^k	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
II vs. V	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
III vs. VI	n.s.	n.s.	n.s.	< 0.05	n.s.	< 0.05

Los datos presentados son medias ± DS de 7-8 ratas/grupo y corresponden a los animales del Experimento VI.

^k n.s. = no significativo (p > 0.05)

TABLA 19.- Contenido de iodo en tiroides, niveles de PBI, insulina y glucosa en plasma, de ratas tratadas con PTU ó ClO_4K durante 20 días, de las inyectadas con 200 μg de corticosterona en los últimos 18 días del tratamiento con bociógenos, y de sus controles de la misma edad.

Grupos	^{127}I en tiroides $\mu\text{g}/\text{glándula}$	Plasma		
		PBI $\mu\text{g}/100\text{ ml}$	Insulina % Int. C	Glucosa $\text{mg}/100\text{ ml}$
I C + salino	9.50 \pm 3.90	3.00	89 \pm 17	155 \pm 8
II ClO_4K + salino	0.08 \pm 0.04	0.03	61 \pm 6	145 \pm 12
III PTU + salino	0.06 \pm 0.04	0.02	83 \pm 8	145 \pm 7
IV C + corticosterona	10.40 \pm 2.10	2.80	78 \pm 7	156 \pm 7
V ClO_4K + corticosterona	0.08 \pm 0.02	0.03	84 \pm 19	154 \pm 13
VI PTU + corticosterona.	0.07 \pm 0.02	0.03	89 \pm 14	152 \pm 10
.....				
Estadística. Valores de p:				
I vs. IV	n.s.*	-	n.s.	n.s.
II vs. V	n.s.	-	< 0.001	n.s.
III vs. VI	n.s.	-	n.s.	n.s.

Los datos presentados son medias \pm DS de 7 ratas/grupo y corresponden a los animales del Experimento VI.

* n.s. = no significativo ($p > 0.05$)

TABLA 20.- Contenido de iodo en tiroides, y niveles de PBI, insulina y glucosa en plasma de ratas tratadas con PTU ó ClO_4K durante 35 días, de las inyectadas con 200 μg de corticosterona/rata/día en los últimos 33 días de tratamiento con bociógenos, y de sus controles de la misma edad.

Grupos	Tiroides		Plasma		
	$\mu\text{g}/\text{glándula}$	I^{127}	PBI $\mu\text{g} / 100 \text{ ml}$	Insulina % Int. C	Glucosa mg / 100 ml
I C + salino	10.80 ± 4.50		2.50	99 ± 14	155 ± 11
II ClO_4K + salino	0.02 ± 0.02		0.02	63 ± 9	156 ± 15
III PTU + salino	0.03 ± 0.02		0.02	77 ± 3	148 ± 13
IV C + corticosterona	12.20 ± 3.60		2.80	94 ± 12	148 ± 8
V ClO_4K + corticosterona	0.02 ± 0.02		0.02	74 ± 12	152 ± 10
VI PTU + corticosterona	0.03 ± 0.02		0.03	73 ± 13	138 ± 9
.....					
Estadística. Valores de p:					
I vs. IV		n.s. ^k	-	n.s.	n.s.
II vs. V		n.s.	-	n.s.	n.s.
III vs. VI		n.s.	-	n.s.	n.s.

Los datos presentados son medias ± DS de 7 ratas/grupo y corresponden a los animales del Experimento VI.

* n.s. = no significativo ($p > 0.05$)

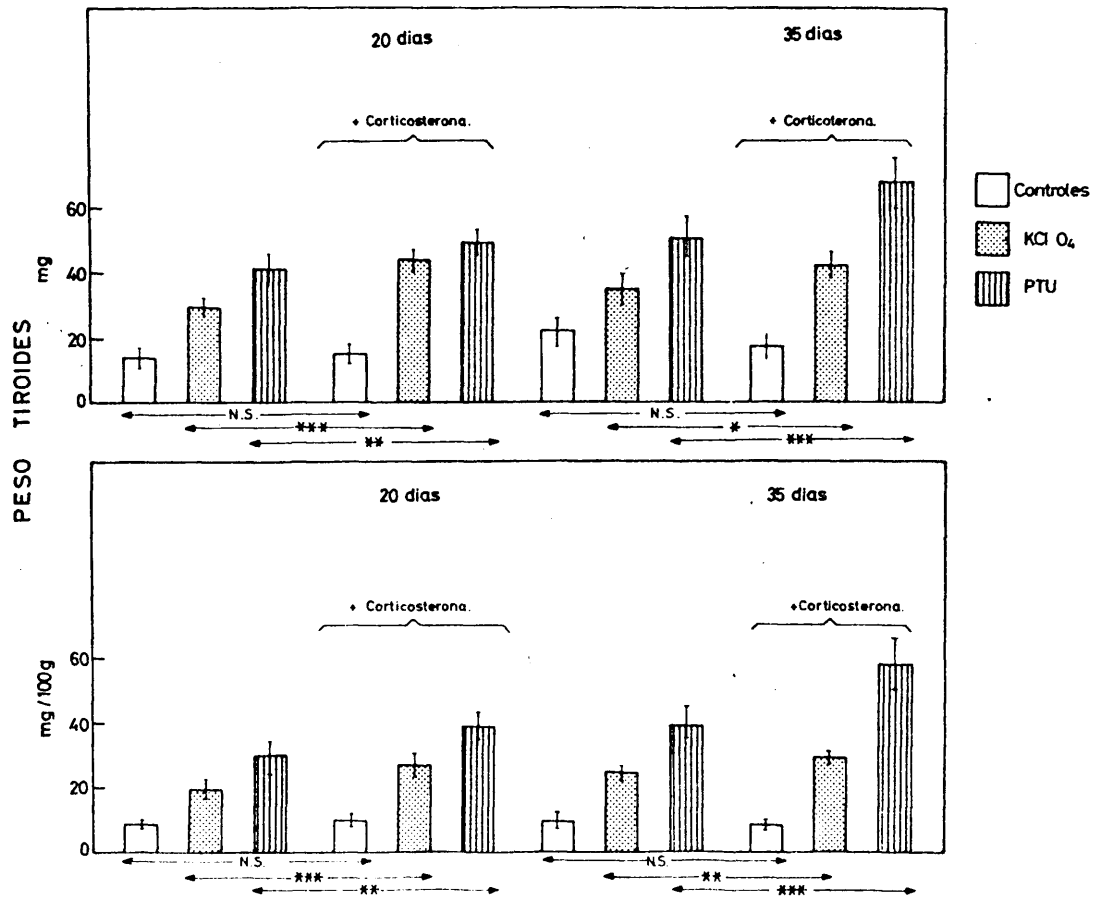


Figura nº 19.

Peso absoluto y relativo de tiroides de ratas tratadas con PTU o ClO_4K durante 20 ó 35 días, y de las inyectadas con 0,2 mg de corticosterona/rata/día en los últimos 18 ó 33 días de tratamiento con anti-tiroideos, respectivamente, y de los controles de su misma edad. Los datos presentados son medias \pm DS de 7-8 ratas/grupo, y corresponden a los animales del Experimento VI. Los asteriscos indican la significatividad de la diferencia entre dos grupos: *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$ n.s.: no significativo ($p > 0,05$).

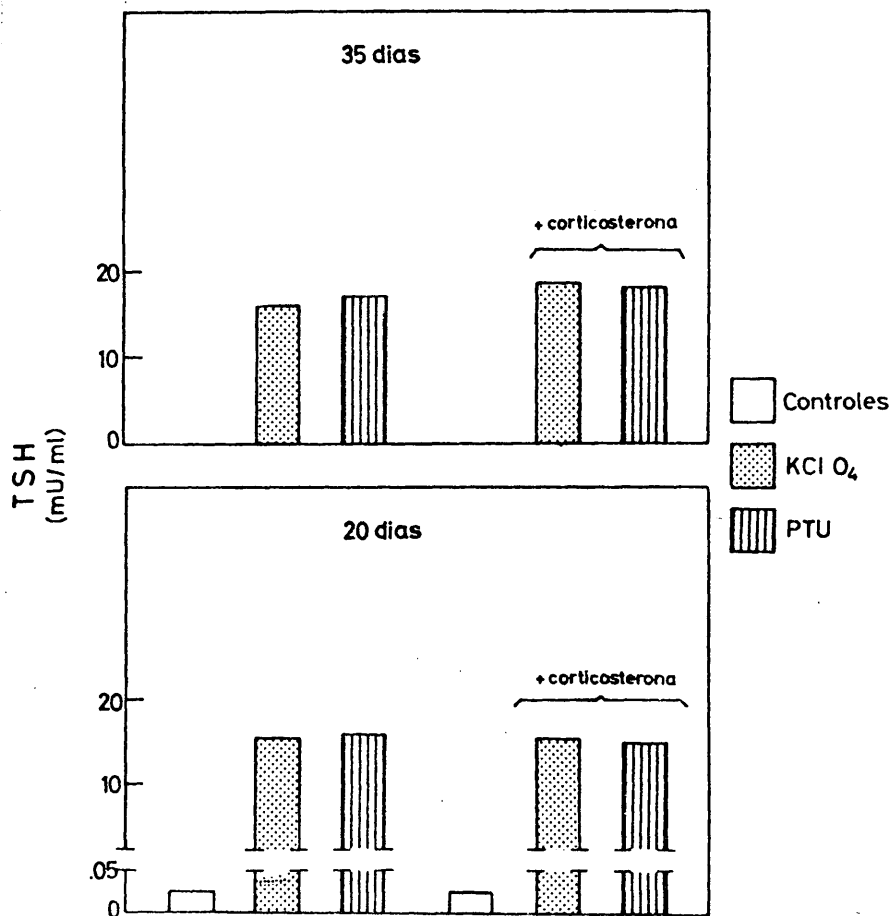


Figura nº 20.

Niveles de TSH (unidades arbitrarias de rata) en plasma de ratas tratadas con PTU o ClO₄K durante 20 ó 35 días, y de las inyectadas con 0,2 mg de corticosterona/rata/día en en los últimos 18 ó 33 días de tratamiento con antitiroideos, respectivamente. Los datos corresponden a los animales del Experimento VI.

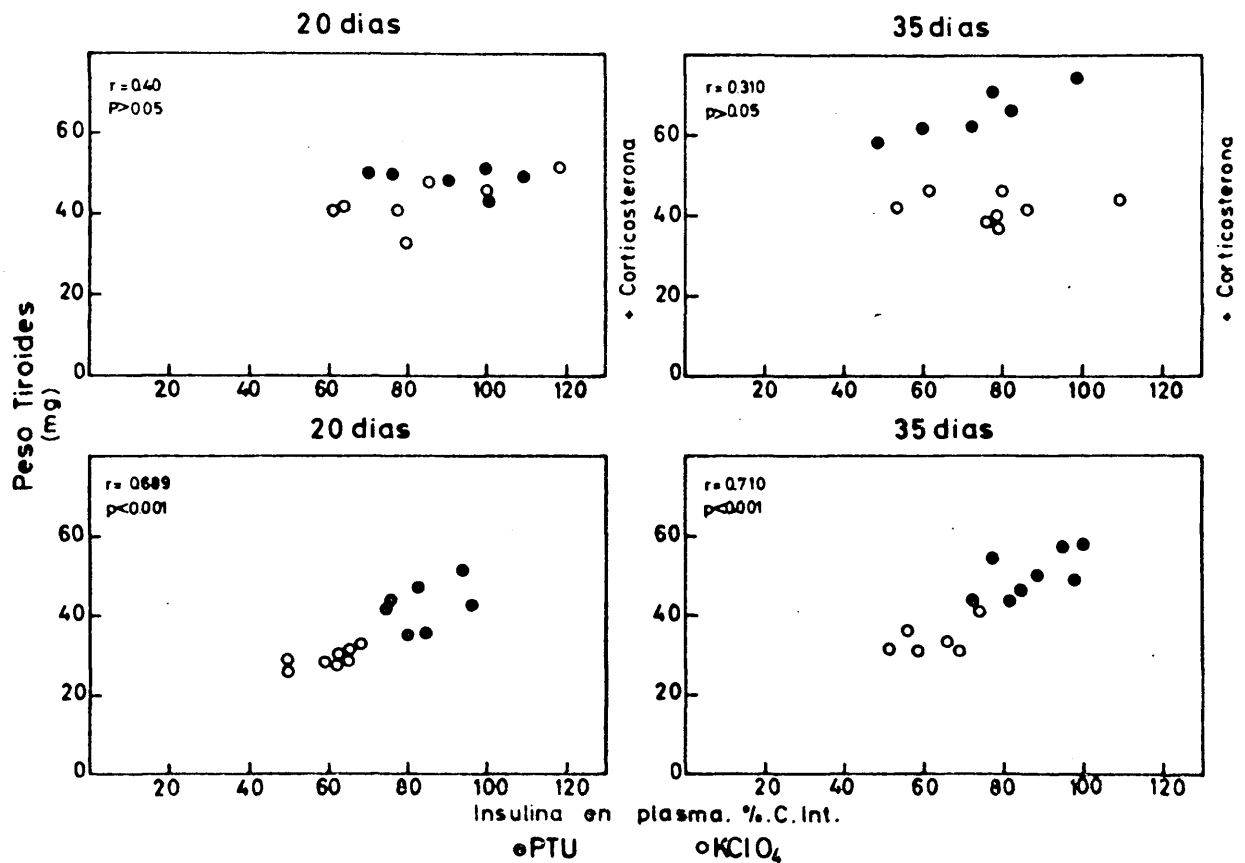


Figura nº 21.

Correlación entre los pesos absolutos de tiroides y los correspondientes niveles de insulina en plasma de ratas tratadas a PTU o ClO_4K durante 20 ó 35 días, y de las inyectadas con 0,2 mg de corticosterona en los últimos 18 ó 33 días de tratamiento con anti-tiroideos, respectivamente. Los datos corresponden a los animales del Experimento VI.

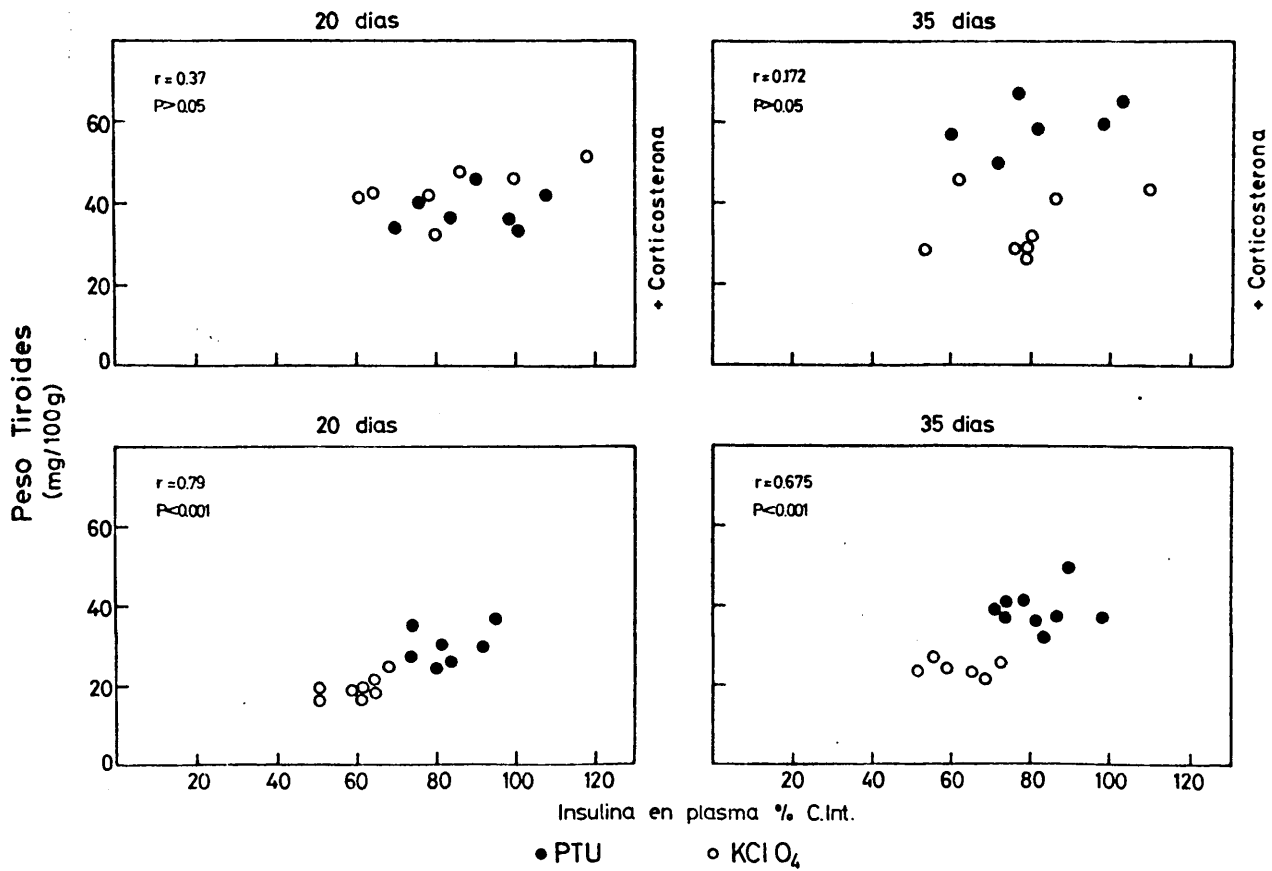


Figura n^o 22.

Correlación entre los pesos relativos de tiroides y los correspondientes niveles de insulina en plasma de ratas tratadas con PTU o ClO₄K durante 20 ó 35 días, y de las inyectadas con corticosterona en los últimos 18 ó 33 días de tratamiento con anti-tiroideos, respectivamente. Los datos corresponden a los animales del Experimento VI.

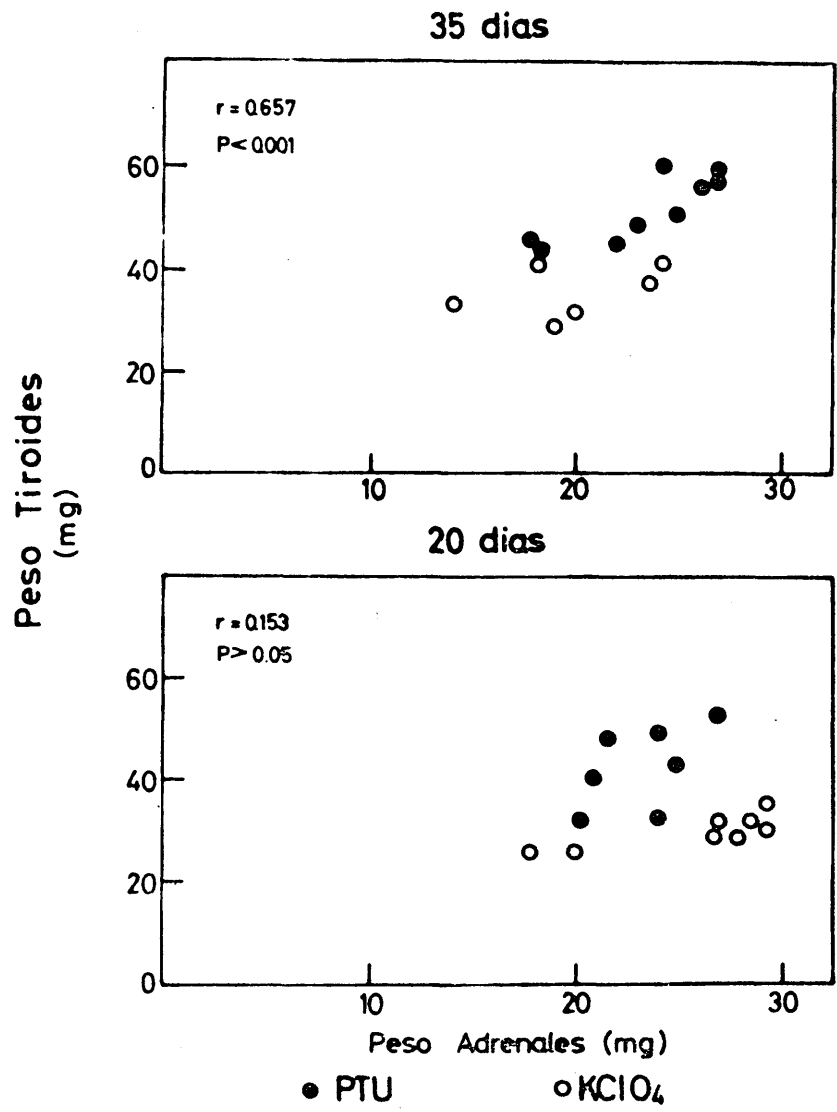


Figura nº 23.

Correlación entre los pesos absolutos de tiroides y los correspondientes pesos absolutos de las adrenales, de ratas tratadas con PTU o ClO₄K durante 20 ó 35 días. Los datos corresponden a los animales del Experimento VI.

tación, ya que los animales a PTU o ClO_4K habían alcanzado el plató en su curva de crecimiento ya al tiempo más corto. Como el grupo control seguía su crecimiento a ritmo normal, las diferencias resultan más acusadas. El aumento de peso, tanto de los animales tratados con cada uno de los antitiroideos como el de sus controles, a los dos tiempos estudiados, no se alteró en general por el tratamiento con la dosis de corticosterona usada, y sólo el grupo a PTU mostró una disminución significativa en el aumento de peso con el tratamiento de mayor duración.

Al tiempo más corto de experimentación, el peso relativo de las adrenales de las ratas tratadas con cada uno de los antitiroideos era significativamente inferior al de sus controles, a un nivel de significancia del 5 % y 1 %. Diferencias análogas se observaron en el peso absoluto, siendo $24,6 \pm 4,5$ y $23,0 \pm 2,8$ para los animales tratados a ClO_4K y PTU respectivamente, y $35,7 \pm 5,5$ para los controles. A los 35 días, el peso absoluto de las adrenales de los grupos con ClO_4K o PTU era $20,0 \pm 1,7$ y $24,2 \pm 2,1$ en el mismo orden anterior y $41,3 \pm 3,8$ para sus controles, siendo significativas las diferencias entre los grupos a cada una de las drogas bociógenas y el grupo control. Sin embargo, el peso relativo de las adrenales de los animales tratados con PTU era igual al de los controles, siendo el de las ratas tratadas con ClO_4K estadísticamente inferior a ellos. ($p < 0,01$). No hubo diferencias entre el peso absoluto o relativo de las adrenales de los animales tratados con ClO_4K o PTU a los 20 días, pero a los 35 días el grupo tratado con PTU tenía adrenales más grandes que las del ClO_4K . El tratamiento con corticosterona durante 18 días disminuyó significativamente el peso de las adrenales

de los animales controles y el de los tratado con ClO_4K , mientras que a los 32 días sólo afectó al de las ratas a PTU.

El peso de las hipófisis, tanto en valor absoluto como en el relativo, fue superior en los animales tratados con cada uno de los antitiroideos al de los controles, sin haber diferencias entre ellos a los dos tiempos de tratamiento. La administración de corticosterona no afectó dicho peso en ninguno de los grupos estudiados.

La Fig. 19 representa el peso de los tiroides en valor absoluto y relativo de todos los grupos de animales considerados en este experimento. El peso del tiroides de las ratas tratadas con ClO_4K o PTU aumentó con el tiempo de tratamiento, y fueron superiores al de los animales controles en valor absoluto o relativo, a los dos tiempos considerados. Sin embargo, las ratas tratadas con PTU desarrollaron un bocio de peso muy superior al de los animales a ClO_4K . Esta diferencia tanto en valor absoluto como en el relativo, evidenciada a los 20 y 35 días de tratamiento, no estaba justificada por el contenido de iodo en tiroides ni por los niveles de PBI en plasma, que eran muy inferior al de los grupos controles, pero prácticamente iguales entre sí. Asimismo, los niveles de TSH en plasma de los animales a ClO_4K o PTU estaban igualmente altos, en los dos tiempos estudiados. O sea, a juzgar por los índices de la función tiroidea, como contenido de iodo en tiroides y niveles de PBI y TSH en plasma por una parte, y por otra, la consideración que el crecimiento corporal, factor muy sensible a los niveles de hormonas tiroideas circulantes, estaba muy inhibido, se podía deducir que en los dos grupos de ra-

tas tratadas con ClO_4K o PTU se había inducido un hipotiroidismo de grado muy semejante. A pesar de ello se desarrollaron bocios de muy distinto tamaño.

Sin embargo, a los dos tiempos estudiados, pudo ponerse de manifiesto una clara diferencia entre los niveles de insulina en plasma de ratas tratadas con PTU o ClO_4K , como en anteriores experimentos.

La administración de corticosterona no alteró el peso del tiroides de los grupos controles ni indujo cambios en el contenido de iodo en tiroides o en los niveles de PBI o TSH en plasma. Los niveles de insulina o glucosa en plasma tampoco se alteraron por este tratamiento, lo que nos indicaba que la dosis de glucocorticoides empleada no era demasiado alta ya que no producía alteraciones en el metabolismo de la glucosa (Fig. 19).

Sin embargo, la administración de corticosterona, durante los dos tiempos considerados, indujo un aumento del peso de los tiroides de los animales tratados con ClO_4K o PTU, siendo igualmente efectivo en ambas situaciones, y aunque aparentemente lo fue más en el grupo de animales tratados con PTU durante 35 días, ello puede ser consecuencia de que en este grupo los animales eran los de menor peso. Este efecto de la corticosterona sobre el peso de los tiroides de ratas tratadas con ClO_4K o PTU; se produjo sin que hubiese cambios en ninguno de los parámetros considerados de la función tiroidea. Sobre todo, es muy importante tener en cuenta que ^{no} alteró los niveles de TSH. O sea, todos los grupos tratados con ClO_4K o PTU con o sin

tratamiento con corticosterona, tenían los mismos niveles de TSH en plasma y a pesar de ello desarrollaban bocios de muy diferente tamaño, (Fig. 20).

La administración de corticosterona provocó un aumento de los niveles de insulina en plasma de los animales tratados con ClO_4K , que fue significativo a los 20 días pero no a los 35 días de tratamiento con bociógenos. Este aumento de los niveles de insulina no iba acompañado de cambios en los de glucosa. Sin embargo, ni en los grupos controles ni en los animales tratados con PTU la corticosterona indujo variaciones en los niveles de insulina.

O sea, el aumento del peso del tiroides inducido por corticosterona en ratas tratadas con ClO_4K , iba acompañado por aumento de los niveles de insulina en el plasma de dichos animales respecto a los encontrados en los tratados sólo con ClO_4K . Sin embargo, estos cambios no tenían lugar en los animales tratados con PTU.

El hecho de que los animales tratados con PTU desarrollen bocios de mayor tamaño, al mismo tiempo que mantienen niveles de insulina en plasma superiores al de las ratas tratadas con ClO_4K , que desarrollan bocios más pequeños, parecía indicar, que en estos animales, ambos parámetros podían estar relacionados. En efecto cuando el peso absoluto del tiroides de ratas tratadas con ClO_4K o PTU se consideraron en conjunto frente a los correspondientes niveles de insulina en plasma, se encontró una correlación positiva tanto a los 20 como a los 35 días

(Fig. 21). Considerando el peso del tiroides en valor relativo, también se encontró una correlación significativa a los dos tiempos estudiados (Fig. 22). El tratamiento con corticosterona hace desaparecer esta correlación existente entre el peso del tiroides y los niveles de insulina, en los animales que solo recibían PTU o ClO_4K , debido posiblemente a que la administración de este corticoide fue capaz de provocar un aumento de los niveles de insulina en el caso de que éstos fueran inicialmente bajos (ratas tratadas con ClO_4K), pero no en el caso de que éstos fueran inicialmente altos (ratas tratadas con PTU).

El hecho de que los animales tratados con PTU, que desarrollan grandes bocios, tengan asimismo más grandes las adrenales que los animales a ClO_4K que desarrollan bocios pequeños (35 días), nos hizo relacionar el peso de ambas glándulas, encontrando una correlación positiva (Fig. 23).

Los resultados encontrados en este experimento sobre el hecho de que la corticosterona inducía un aumento en el peso del tiroides sobre el observado en los animales que sólo recibían PTU o ClO_4K , nos llevó a estudiar el efecto de otro corticoide, la hidrocortisona, en el peso del tiroides de ratas tratadas con diversos antitiroideos.

EXPERIMENTO VII.

Efecto de la administración de hidrocortisona sobre el peso del tiroides de ratas tratadas con diversos antitiroideos.

Varios grupos de ratas de un peso inicial de 65-70 g, se sometieron a una dieta de bajo contenido en iodo durante 18 días, al mismo tiempo que recibían en el agua de bebida ClO_4K al 1 ‰, o PTU a 0,05 ‰ o metilmercaptoimidazol (MMI) al 0,07 ‰, o SCNK al 1 ‰. El grupo control se alimentó con la misma dieta suplementada con iodo y bebieron agua destilada. Dos días después de iniciado este tratamiento, cada grupo se dividió en dos, uno de los cuales se inyectó i.p. con 150 μg de hidrocortisona dos veces al día, mañana y tarde, hasta el final del periodo de experimentación, y los otros grupos se inyectaron con 1 ml de salino, volumen en el que se administraba la hidrocortisona.

Las Tablas 21 y 22 y las Figs. 24 y 25 representan algunos de los datos de este experimento.

La administración de cada uno de estos antitiroideos redujo el aumento del peso corporal con la misma intensidad respecto al del grupo control. El mismo efecto se encontró en el peso absoluto de las adrenales, excepto en el grupo tratado con SCNK. El peso relativo de esta glándula sólo fue disminuido por la administración de ClO_4K . Los niveles de glucosa en plasma estaban disminuidos ligera pero significativamente en los grupos tratados con los distintos antitiroideos, menos en el de PTU. Consecuentemente con los niveles de glucosa, encontramos que los

TABLA 21.- Peso de las adrenales y aumento del peso corporal durante el tratamiento, de ratas a PTU, ClO_4K , MMI y SCNK durante 18 días, inyectadas a diario con 150 μg de hidrocortisona en los últimos 16 días de tratamiento con bociógenos, y de controles de la misma edad.

Grupo	Adrenales		Aumento del peso corporal g
	mg	mg/100 g	
I C ↓ salino	31.2±4.0	24.0±0.3	69±11
II ClO_4K ↓ salino	20.5±0.4	19.0±1.5	44±11
III PTU ↓ salino	24.2±2.0	24.0±2.6	39±14
IV MMI ↓ salino	26.7±1.0	25.3±4.6	40± 9
V SCNK ↓ salino	27.8±2.7	24.3±1.0	46±12
VI C ↓ hidrocortisona	25.3±3.8	21.3±2.8	61± 7
VII ClO_4K ↓ hidrocortisona	18.4±2.6	18.2±2.6	41± 6
VIII PTU ↓ hidrocortisona	21.0±2.2	20.6±2.5	39± 7
IX MMI ↓ hidrocortisona	22.5±2.8	22.2±2.6	38± 4
X SCNK ↓ hidrocortisona	22.7±2.4	23.4±2.2	39±14
.....			
Estadística. Valores de p:			
I vs. VI	< 0.05	n.s.*	n.s.
II vs. VII	n.s.	n.s.	n.s.
III vs. VIII	< 0.05	< 0.05	n.s.
IV vs. IX	< 0.05	n.s.	n.s.
V vs. X	< 0.01	n.s.	n.s.

El peso inicial de los animales fue de 65-70 g. Los valores presentados son medias ± DS de 7 ratas/grupo, de los animales correspondientes al Experimento VII.

* n.s. = no significativo ($p > 0.05$)

TABLA 22.- Contenido de iodo en tiroides, PBI, insulina y glucosa en plasma de ratas a ClO₄K, PTU, MMI y SCNK durante 18 días, inyectadas a diario con 150 µg de hidrocoftisona en los últimos 16 días de tratamiento con bociógenos y de controles de la misma edad.

Grupos	¹²⁷ I en tiroides µg/ glándula	Plasma		
		PBI µg/100 ml	Insulina µU/ml	Glucosa mg/ 100 ml
I C † salino	3.30±0.20	5.40	33.9±5.1	158.0±12.0
II ClO ₄ K † salino	0.05±0.02	0.05	19.2±3.1	141.4±14.0
III PTU † salino	0.03±0.02	0.04	33.6±4.1	146.6±14.0
IV MMI † salino	0.05±0.02	0.08	25.4±4.6	139.0± 8.6
V SCNK † salino	0.06±0.02	0.10	24.0±2.2	142.0±16.0
VI C † hidrocoftisona	3.20±0.10	5.30	31.6±9.2	171.0±12.3
VII ClO ₄ K † hidrocoftisona	0.05±0.01	0.04	25.9±5.5	166.5±13.0
VIII PTU † hidrocoftisona	0.04±0.01	0.04	24.6±4.6	162.4±15.6
IX MMI † hidrocoftisona	0.06±0.02	0.07	21.7±7.2	148.0±14.0
X SCNK † hidrocoftisona	0.05±0.02	0.09	27.1±3.1	149.0±10.0

.....

Estadística. Valores de p:	
I vs. VI	n.s. ^k
II vs. VII	n.s.
III vs. VIII	n.s.
IV vs. IX	n.s.
V vs. X	n.s.

El peso inicial de los animales fue de 65-70 g. Los valores presentados son medias ± DE de 7 ratas/ grupo de los animales correspondientes al Experimento VII.

^k n.s. = no significativo (p > 0.05)

PESO DE TIROIDES

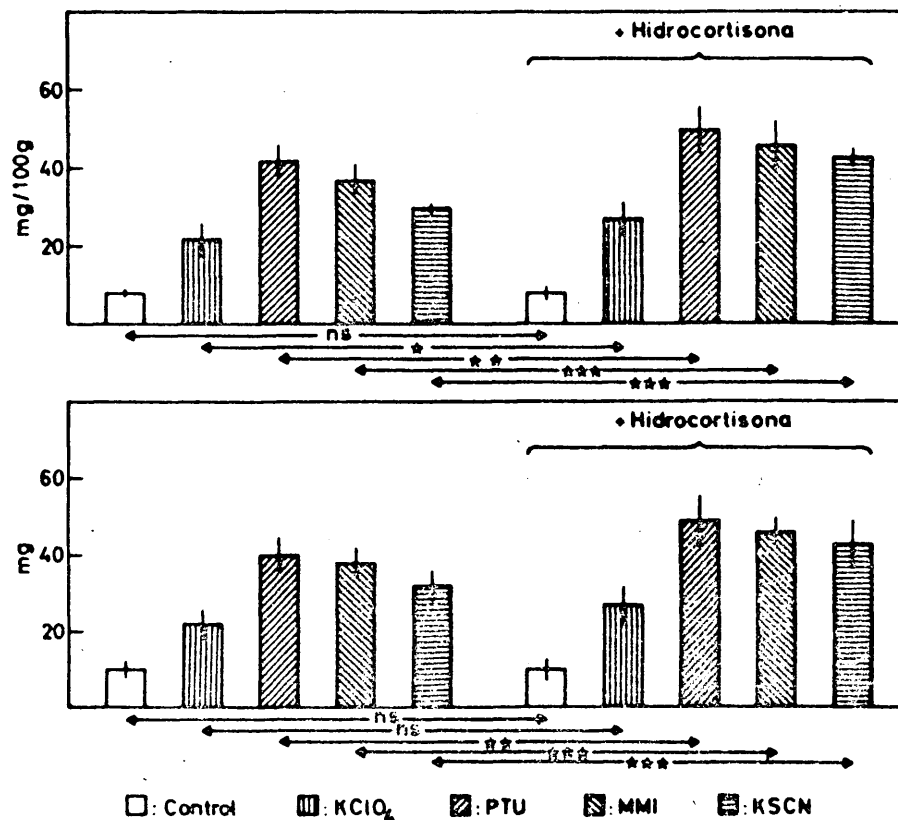


Figura nº 24.

Peso absoluto y relativo de tiroides de ratas a ClO₄K, PTU, MMI y SCNK durante 18 días y de los correspondientes inyectados con 150 µg de hidrocortisona/rata/día en los últimos 16 días de tratamiento con los distintos bociógenos. Los valores presentados son medias ± DE de 7 ratas/grupo, y corresponden a los animales del Experimento VII. Los asteriscos indican la significatividad de las diferencias entre dos grupos: *: p < 0,05; **: p < 0,01; ***: p < 0,001; n.s.: no significativo (p > 0,05).

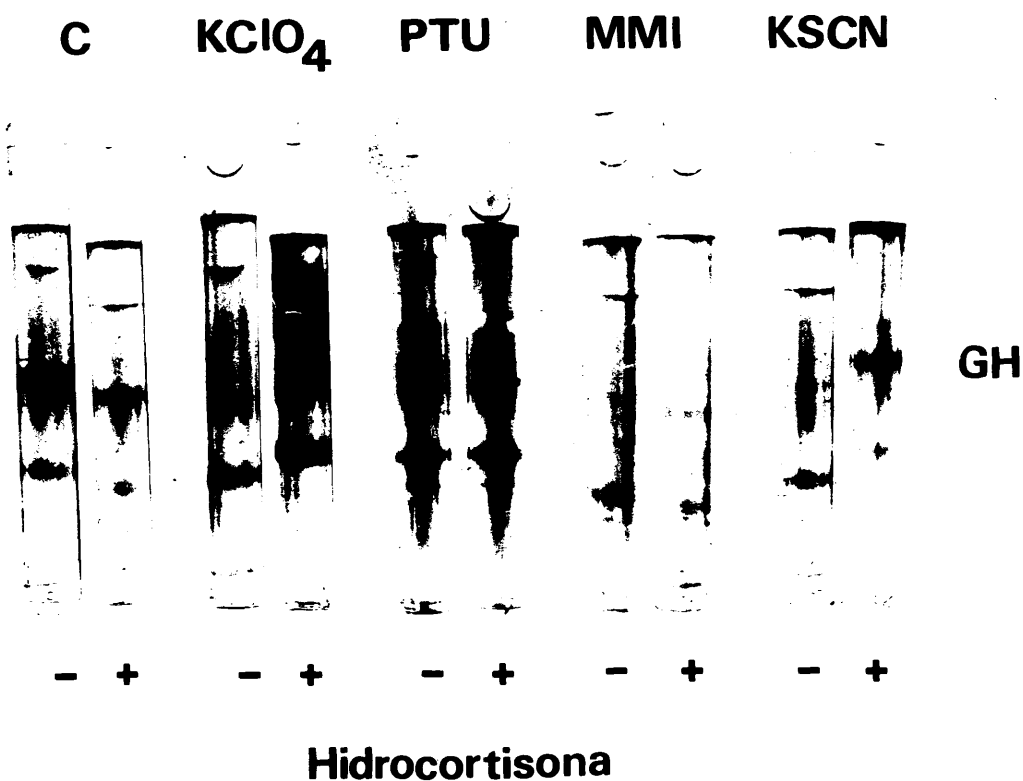


Figura nº 25.

Contenido de GH en pool de hipófisis, en gel de poliacrilamida, de ratas tratadas con ClO₄K, MMI, PTU y SCNK durante 18 días, y de los correspondientes inyectados con 150 µg de hidro cortisona/rata/día en los últimos 16 días de tratamiento. Los datos corresponden a los animales del Experimento VII.



niveles de insulina de los distintos grupos de ratas son ligeramente menor (grupo de MMI o SCNK), claramente menor (ClO_4K) o igual (PTU) al del grupo control. Por lo tanto la correspondencia entre los niveles de glucosa e insulina en plasma de los distintos grupos no es perfectamente superponible. La administración de hidrocortisona, no afectó el aumento de peso corporal durante el periodo de experimentación, sin embargo disminuyó el peso absoluto de las adrenales de todos los grupos, menos el de ClO_4K , pero en valor relativo sólo afectó al de los animales tratados con PTU.

El tratamiento con hidrocortisona indujo un aumento significativo en los niveles de glucosa, menos en el grupo tratado con SCNK. En cuanto a los niveles de insulina en plasma, la hidrocortisona aumentó los de los animales tratados con ClO_4K , disminuyó el del grupo a PTU, y no afectó a los restantes.

La administración de cada uno de estos antitiroideos produjo una igual e intensa disminución tanto en el contenido de iodo en tiroides como en los niveles de PBI en plasma, y estos valores no se alteraron por la administración de hidrocortisona. A partir de estos dos parámetros, cabría suponer que los grupos de ratas tratados con cada uno de los antitiroideos incluidos en este experimento, tenían un hipotiroidismo de grado muy semejante, pero sin embargo, desarrollan bocios de muy distinto tamaño, tanto en valor absoluto como en relativo, siendo mayores en los animales tratados con PTU o MMI y siguiéndole los de SCNK y ClO_4K . La administración de hidrocortisona no afectó el peso del tiroides del grupo control, pero provocó un aumento significativo en el de los animales tratados con los diversos an-

titiroideos, aunque no con la misma intensidad en los distintos grupos, ya que en el caso de los animales tratados con ClO_4K , eran significativos en valor relativo pero no lo eran en valor absoluto (Fig. 24).

En la Fig. 25 se representa la electroforesis en gel de poliacrilamida de los homogenados de hipófisis de ratas controles, de los grupos a bociógenos y de los correspondientes animales tratados con hidrocortisona. El tratamiento con los distintos antitiroideos hizo desaparecer la banda de proteína correspondiente a la GH. En los animales a SCNK y MMI , el tratamiento con corticoides indujo una reaparición de esta banda. En los grupos a ClO_4K , aunque la banda de GH no está claramente definida, aparece en el lugar correspondiente un mayor oscurecimiento que el que se observa en los geles de los animales que reciben solo bociógeno.

Muchos de los resultados expuestos parecían indicar que existía una estrecha correlación entre el tamaño de los bocios y los niveles de insulina en plasma. Este hecho siempre lo habíamos encontrado en los animales con PTU , droga cuya acción antitiroidea había sido muy estudiada en nuestro laboratorio, y que parece tiene una acción extratiroidea sobre la secreción de insulina por el páncreas, por un mecanismo hasta ahora desconocido por nosotros. Pero además, se han descrito otros muchos efectos extratiroideos del PTU (Screebny y cols., 1962; Fregly y Tailor, 1964; Fregly y cols., 1960). Nos pareció interesante estudiar si el impedir los niveles altos de insulina en plasma de las ratas tratadas con PTU , repercutía sobre el tamaño del bocio inducido por esta droga.

EXPERIMENTO VIII.

Efecto de la administración de anticuerpo anti-insulina sobre el peso del tiroides de ratas tratadas con PTU.

Un grupo de ratas de un peso inicial de alrededor de 90 g recibieron una dieta pobre en iodo y bebieron agua destilada durante 10 días. Durante este tiempo los animales se inyectaron i.p. a diario con 1 mg de PTU. El PTU se administró de este modo para estar seguros de que cada animal recibía la misma cantidad de antitiroideo. La mitad del grupo se inyectó i.p. a diario con anticuerpo anti-insulina (recibiendo cada ratita 1/40 parte por día del anticuerpo correspondiente a una curva de "Kit" de radioinmunoensayo de insulina, Amersham, England), hasta el final del periodo de experimentación.

La Tabla 23 y la Fig. 26 presentan los resultados de este Experimento. La administración de anticuerpo anti-insulina a ratas tratadas con PTU no alteró el peso final de los animales, ni el peso de varios de sus órganos como hígado, riñón, testículos, etc. Sin embargo, la administración de este anticuerpo disminuyó significativamente el peso del tiroides respecto al encontrado en los animales tratados con sólo PTU. Esta disminución en el tamaño del bocio se produce sin que haya diferencias en el contenido de iodo en tiroides ni en los niveles de PBI en plasma, que lo pueda justificar.

Estos resultados parecen confirmar nuestra idea, de que al disminuir los niveles de insulina, en este caso por la ad-

TABLA 23.- Efecto de la administración de anti-cuerpo anti-insulina (Ac-Ai) sobre el peso de hígado, riñón, adrenales, hipófisis y peso final de ratas tratadas con 1 mg de PTU / rata / día durante 10 días. El peso inicial de los animales era de 90 ± 10 g. Las ratas recibieron una dieta LID y se inyectaron con 1 mg de PTU / rata / día / 10 días. El anti-cuerpo anti-insulina se administró en los últimos 8 días de tratamiento del bociógeno.

	Hígado g/100 g	Riñón g/100 g	Testículos g/100 g	Adrenales mg/100 g	Hipófisis mg/100 g	Peso corporal final g
PTU	4.7 ± 0.6	0.84 ± 0.03	1.29 ± 0.14	17.0 ± 1.1	3.9 ± 0.7	120 ± 10
PTU+(Ac- Ai)	4.1 ± 0.5	0.97 ± 0.09	1.25 ± 0.2	18.5 ± 3.1	3.9 ± 0.3	129 ± 11
.....						
Estadística. Valores de p:						
	n.s.*	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Los datos presentados son medias \pm DS de 6 ratas/grupo.

* n.s.= no significativo (p > 0.05)

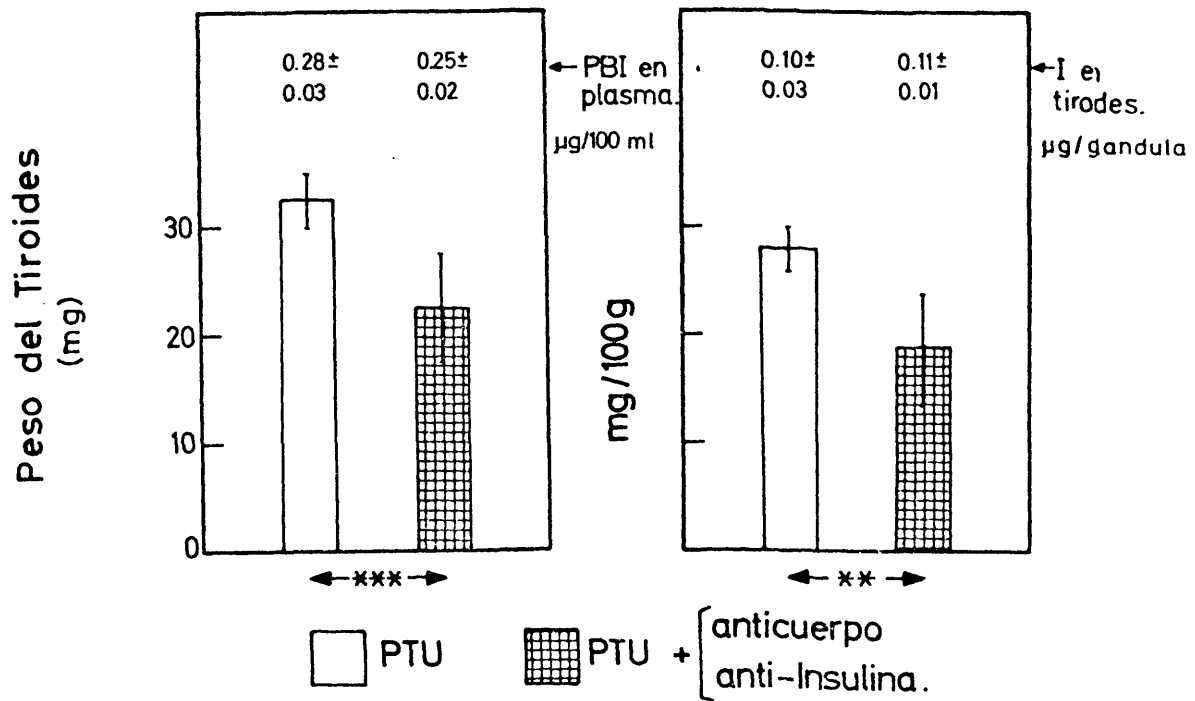


Figura nº 26.

Efecto de la administración de anticuerpo anti-insulina durante 8 días a ratas tratadas con PTU. Los datos presentados son medias \pm DS de 6 ratas/grupo, y corresponden a los animales del Experimento VIII. Los asteriscos indican la significatividad de las diferencias entre dos grupos: **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$.

ministración de anticuerpo anti-insulina, en una intensidad que hizo que estos animales mantuvieran unos niveles de glucosa en plasma de 237 ± 21 mg/100 ml, mientras que los de los animales tratados con sólo PTU tenían una glucemia de 125 ± 10 mg/100 ml, esto repercutía en que los animales desarrollaran un bocio de mucho menor tamaño, tanto en valor absoluto como en relativo.

Los experimentos V, VI y VII nos demostraban claramente que la administración de corticoides en cantidades mucho más pequeñas que las usadas por otros autores (Tabla 1 a, b y c) producía un aumento del peso del tiroides de ratas tratadas con antitiroideos, independientemente de cual fuera éste. Teníamos pues resultados que nos confirmaban, que al menos este parámetro de la función tiroidea es afectado por la administración de corticoides, y que además, tenía lugar sin que se evidenciaran cambios en los niveles de TSH.

Queríamos investigar el efecto de los glucocorticoides sobre otros parámetros en la función tiroidea, y realizar esta investigación dentro de las condiciones fisiológicas posibles. Para ello, estudiamos la captación por el tiroides de una dosis de I^{131} y su organificación, a distintas horas del día, en las que es sabido que hay diferencias en la secreción endógena de corticosterona (Allen y Kendall, 1967).

EXPERIMENTO IX.

Captación y metabolización del I^{131} por el tiroides a distintas horas del día.

Ochenta ratas de un peso inicial de 117 ± 10 g se alimentaron con una dieta de bajo contenido en iodo ($0,07 \mu\text{g/g}$ de dieta) y bebieron agua destilada durante 20 días. Al finalizar dicho tiempo, la mitad de los animales se inyectaron con $20 \mu\text{Ci}$ de I^{131} a las 8 de la mañana, y la otra mitad recibió análogo tratamiento a las 6 de la tarde. Subgrupos de 5-6 ratas, de cada uno de los grupos, se sacrificaron a diferentes horas de un mismo día. Al finalizar el periodo en el que los animales habían estado sometidos a una dieta pobre en iodo, habían alcanzado un peso corporal de 168 ± 17 g, y el contenido de iodo en tiroides y el nivel de PBI en plasma eran de $0,37 \pm 0,09$ y $1,0 \pm 0,2$, respectivamente, siendo el peso del tiroides de $22,6 \pm 6,2$ y $13,9 \pm 2,8$, en valor absoluto y relativo. Teníamos pues unos animales que tenían un tiroides hipertrofiado, con sólo estar sometidos a una dieta pobre en iodo. Este estado tiroideo lo habíamos querido producir, al objeto de poder evidenciar cambios en los parámetros del metabolismo intratiroideo del iodo, a tiempos cortos, lo cual hubiera sido más difícil en un animal completamente normal que tendría un metabolismo intratiroideo del iodo mucho más lento.

En la Tabla 24 y Figs. 27, 28, 29 y 30 se representan algunos de los datos de este experimento.

TABLA 24.- Indices de la función tiroidea a diferentes tiempos de inyectado el I¹³¹ a las 8 o a las 18 horas.

Grupos	Material con R _i =0	DIT ^k	MIT ^k	I ^{-k}	T ₄ ^k	T ₃ ^k	MIT/DIT ^k	T ₃ ^k /T ₄ ^k
<u>Inyectado 8 horas</u>								
<u>Horas después de la inyección con I¹³¹</u>								
3 (11 horas)	1.7±0.4	22.3±2.1	63.2±2.4	6.6±0.6	3.4±0.6	3.0±0.7	2.84±0.34	0.88±0.10
5 (13 horas)	2.8±0.2	20.6±2.3	64.5±5.2	5.4±0.3	3.7±0.8	2.7±1.0	3.15±0.24	0.80±0.10
7 (15 horas)	3.5±1.1	21.0±3.2	64.2±4.4	6.5±1.6	3.9±0.9	2.8±0.5	3.10±0.18	0.97±0.14
9 (17 horas)	2.7±0.5	20.4±2.9	60.5±2.3	5.7±1.0	4.9±1.0	4.3±0.7	3.14±0.60	1.10±0.30
11 (19 horas)	2.9±2.0	21.1±4.3	54.4±6.2	6.3±0.7	7.1±0.6	8.6±0.6	2.51±1.00	1.25±0.41
14 (22 horas)	2.9±0.5	20.1±2.5	51.9±5.4	5.1±0.6	6.9±1.1	8.5±0.9	2.19±0.43	1.35±0.41
<u>Inyectado 18 horas</u>								
<u>Horas después de la inyección con I¹³¹</u>								
3 (21 horas)	3.2±1.1	36.5±3.7	44.7±5.3	3.9±0.4	5.9±1.2	7.0±2.1	1.22±0.90	1.19±0.20
5 (23 horas)	4.0±0.8	30.3±2.7	43.7±2.7	4.1±1.0	6.9±1.2	9.4±1.1	1.20±0.17	1.36±0.20
7 (1 horas)	4.4±0.5	24.1±2.0	42.9±2.8	4.0±1.0	9.2±0.9	12.4±1.6	1.81±0.30	1.35±0.46
8 (2 horas)	4.5±0.3	20.2±1.5	42.0±1.9	3.0±0.9	13.1±1.4	17.1±1.2	2.10±0.75	1.30±0.19
14 (8 horas)	4.5±0.4	21.2±1.6	40.3±2.8	3.2±0.7	13.0±0.9	17.8±0.6	1.97±0.40	1.44±0.30

Los animales fueron alimentados con una dieta de bajo contenido en yodo (LID) durante 20 días. En el día del sacrificio las ratas se inyectaron con I¹³¹, la mitad a las 8 horas y la otra mitad a las 18 horas. La comparación estadística se hace entre el grupo inyectado por la mañana y por la tarde, para cada tiempo. Los asteriscos denotan la significatividad de las diferencias: * p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001. Los valores sin asterisco no son significativamente diferentes (p > 0.05). Los resultados se expresan en medias±DS de 5 ó 6 ratas/grupo.

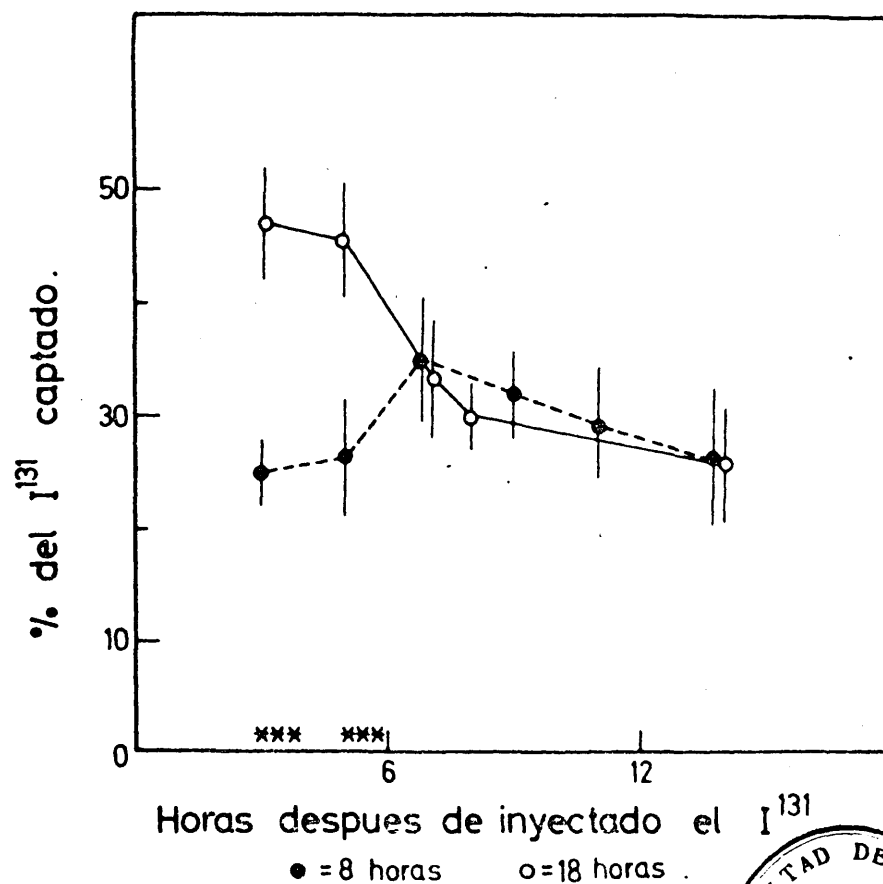


Figura n^o 27.

Captación tiroidea (a distintos tiempos de un mismo día) como % de una dosis de ¹³¹I inyectada a ratas a las 8 horas (8 de la mañana) o a las 18 horas (6 de la tarde). Los animales habían estado previamente durante 20 días, a una dieta pobre en iodo. Los datos presentados son medias \pm DS de 5-6 ratas/grupo. Los asteriscos indican la significatividad de las diferencias entre dos grupos: ***: $p < 0,001$.



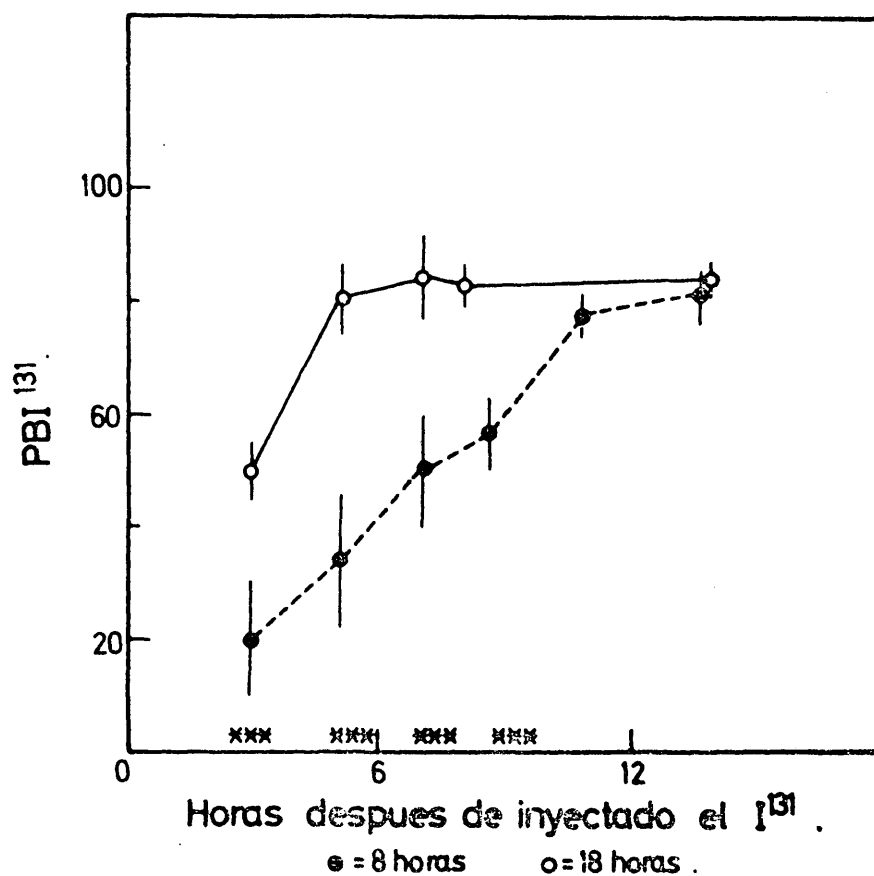


Figura n.º 28.

Valores de PBI ¹³¹ en plasma, a distintos tiempos de un mismo día, después de la administración de 20 μ Ci de ¹³¹I inyectado a las 8 horas (8 de la mañana) o a las 18 horas (6 de la tarde). Los datos presentados son medias \pm DS de 5-6 ratas/grupo, y corresponden a los animales del Experimento IX. Los asteriscos indican la significatividad de las diferencias entre dos grupos: ***: $p < 0,001$.

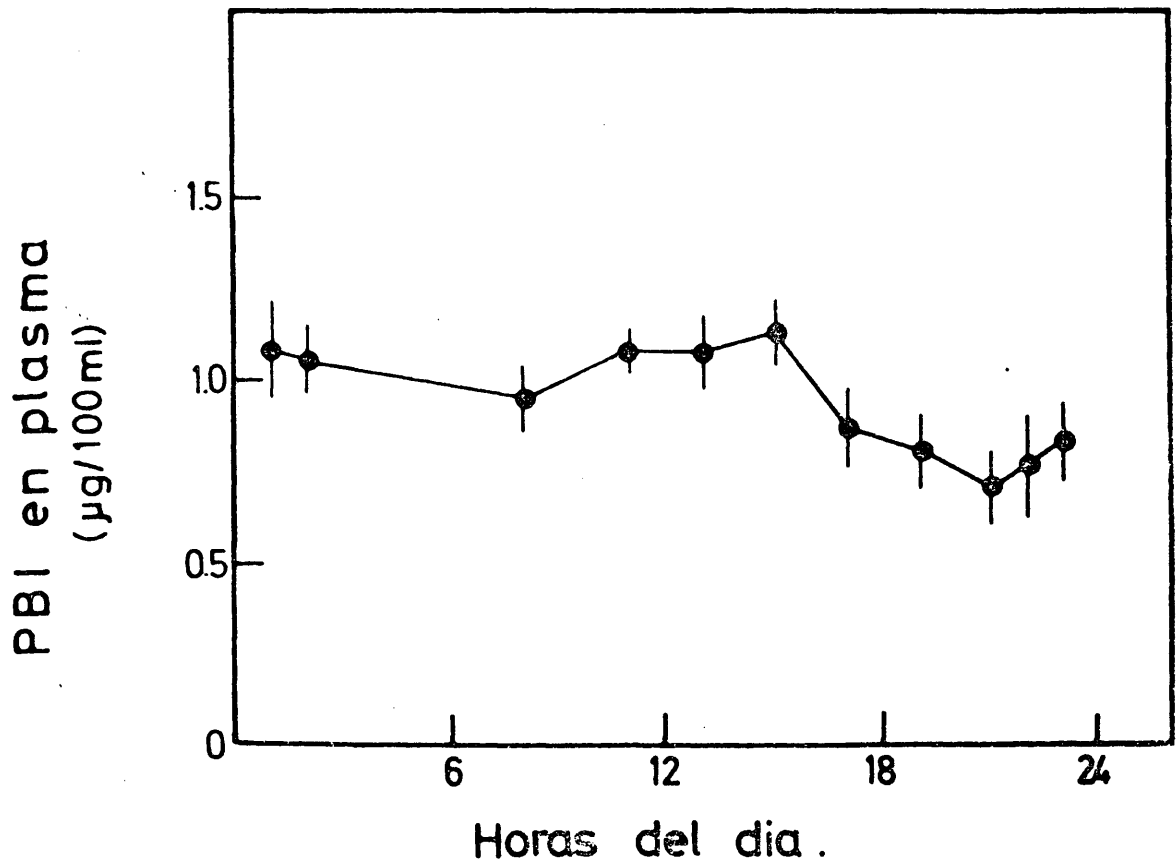


Figura nº 29.

Variaciones de los niveles plasmáticos del PBI¹²⁷ durante 24 horas. Los datos presentados son medias \pm DS de 5-6 ratas/grupo, y corresponden a los animales del Experimento IX.

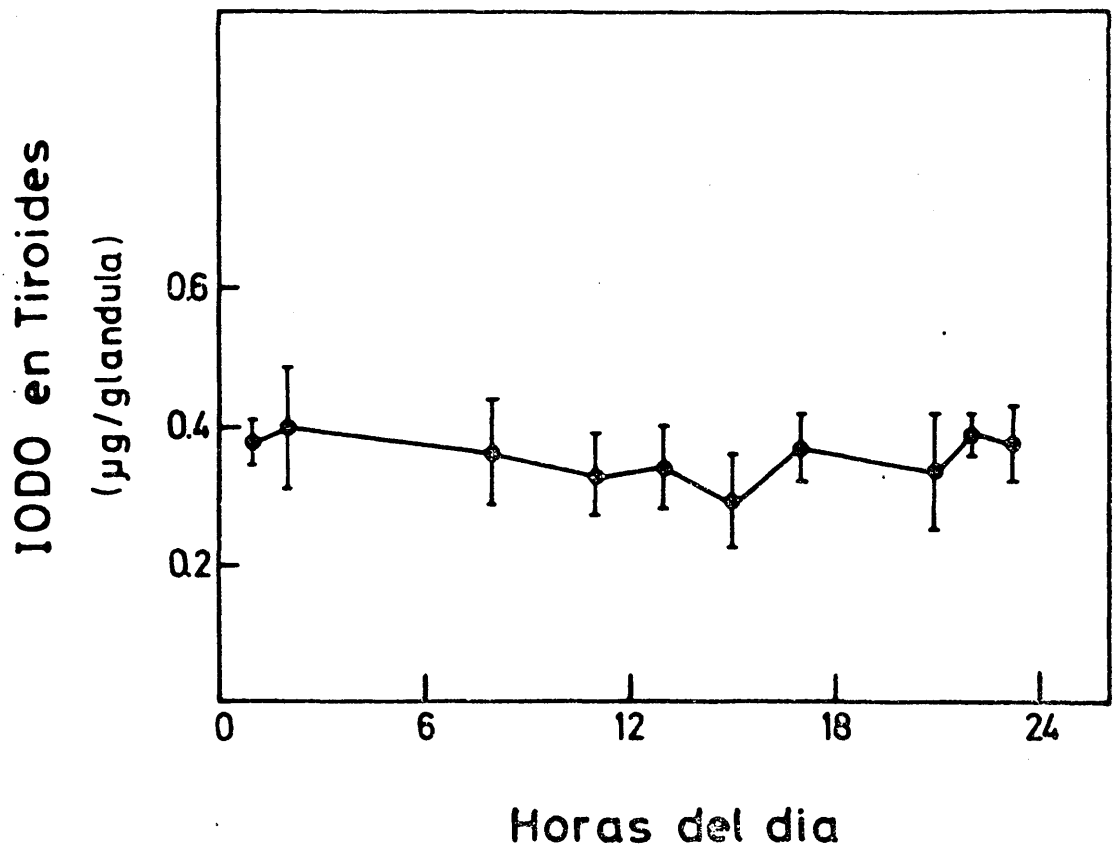


Figura nº 30.

Variaciones del I^{127} en tiroides durante 24 horas. Los datos presentados son medias \pm DS de 5-6 ratas/grupo, y corresponden a los animales del Experimento IX.

A las 3 y 5 horas después de la inyección de I^{131} , los animales que habían recibido dicha dosis a las 6 de la tarde tuvieron una captación (% de la dosis administrada) significativamente mayor al nivel del 1 % que los inyectados a las 8 de la mañana, no habiendo diferencias entre ambos grupos en los sucesivos tiempos estudiados (Fig. 27). Esta diferencia entre la captación tiroidea del I^{131} entre los animales que recibieron este tratamiento a las ⁸ de la mañana y los de las 6 de la tarde de un mismo día, no podía justificarse por qué dichos grupos tuvieran distinto contenido de I^{127} en sus tiroides, lo que explicaría la diferencia entre la avidéz tiroidea por el I^{131} encontrada en ellos. Los animales inyectados a las 8 de la mañana tenían un contenido medio de I^{127} en sus tiroides de $0,36 \pm 0,09 \mu\text{g}/\text{glándula}$, mientras que el de los inyectados a las 6 de la tarde era de $0,40 \pm 0,06 \mu\text{g}/\text{glándula}$, no habiendo diferencia significativa entre ambos grupos.

A las 3, 5, 7 y 9 horas después de la administración de I^{131} , el PBI¹³¹ fue significativamente más alto, cuando se inyectó el I^{131} a las 6 de la tarde que cuando se inyectó a las 8 de la mañana, igualándose el valor de este parámetro en ambos grupos a los tiempos siguientes (Fig. 28).

Encontramos diferencias en el PBI¹²⁷ en plasma de los dos grupos sacrificados a distintas horas de un mismo día. A las 8 de la mañana y 5 de la tarde, estos valores eran $0,96 \pm 0,10$ y $0,85 \pm 0,12 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$, respectivamente, que no son significativamente distintos. Pero el PBI en plasma de los grupos de animales sacrificados entre las 8 de la mañana y 5 de la tarde, son significativamente mayores que los de aque-



llos sacrificados entre las 5 y 9 de la tarde. A partir de entonces vuelven a subir los valores del PBI, de forma que los valores de este parámetro encontrado a la 1 y 2 de la madrugada no son significativamente distintos de los comprendidos entre las 8 de la mañana y 5 de la tarde (Fig. 29).

El I^{131} se metabolizó más rápidamente en aquellos grupos que se administró a las 6 de la tarde que a los de las 8 de la mañana. Los % de I^{-*} y MIT^{*} era mayor en el tiroides de los animales inyectados por la mañana que por la tarde. El efecto contrario se encontró en los contenidos de T_3^{*} y T_4^{*} , encontrándose estos resultados prácticamente a todos los tiempos estudiados.

El cociente MIT^{*}/DIT^{*} era significativamente más alto en los grupos sacrificados tras la inyección de I^{131} administrada a las 8 de la mañana, que en aquellos en que esta dosis trazadora del I^{131} se había administrado a las 6 de la tarde. Por el contrario, el cociente T_3^{*}/T_4^{*} fue significativamente mayor, a las 3 y 5 horas después de la inyección en los grupos de animales que habían sido inyectados a las 6 de la tarde que en los inyectados a las 8 de la mañana.

Este experimento lo hemos realizado en un mismo día. Las ratas previamente habían estado sometidas durante 20 días a una dieta de bajo contenido en yodo, tratando de que sus tiroides tuvieran un metabolismo de iodoaminoácidos intratiroides rápido, para poder así evidenciar diferencias a corto tiempo. En estas condiciones el yodo captado por el tiroides es

rápido e incorporado a la tirosina con la consiguiente formación de iodotirosinas, y tras el acoplamiento de éstas dar lugar a la formación de iodotironinas.

En nuestros animales este metabolismo fue muy rápido. La captación del I^{131} por el tiroides, a las 3 horas de ser inyectado, incluso en el grupo que la tuvo más baja (inyectado a las 8 de la mañana) es análoga a la que normalmente se obtiene a las 12 horas, en un animal sometido a una dieta normal de iodo, que es alrededor de 23 %. Y el valor de este parámetro es muy superior en los grupos de animales sacrificados después de ser inyectados a las 6 de la tarde, que alcanzó el valor del 50 % de la dosis de I^{131} administrada.

En el por ciento de radioactividad encontrada en el origen de la cromatografía (proteína no hidrolizable), los animales inyectados a las 6 de la tarde presentan valores muy superiores al de los inyectados a las 8 de la mañana, siendo significativamente superior a las 3, 5 y 14 horas.

El por ciento de MIT^{*} fue estadísticamente superior, prácticamente a todos los tiempos estudiados, en los animales inyectados a las 8 de la mañana que en aquellos grupos que se inyectaron a las 6 de la tarde. En el por ciento de DIT^{*}, los valores encontrados en ambos grupos, eran más semejantes entre sí, que en el caso de MIT^{*}, aunque a las 3 y 5 horas las ratas inyectadas a las 6 de la tarde tenían por ciento de este iodoaminoácido estadísticamente superior a las inyectadas a las 8 de la mañana.

Los por cientos de T_3^* y T_4^* , a todos los tiempos estudiados, eran significativamente mayores en los animales inyectados a las 6 de la tarde que en aquellos que habían recibido la administración de I^{131} a las 8 de la mañana. Los cocientes MIT^*/DIT^* y T_3^*/T_4^* , en todos los grupos indicaban que el tiroides de estos animales estaba muy estimulado, ya que los valores de estos parámetros en animales sometidos a una dieta normal de iodo son alrededor de 0,7 y 0,2, respectivamente.

DISCUSSION

I - TAMAÑO DE LOS BOCIOS INDUCIDOS POR DIFERENTES ANTITIROIDEOS EN ANIMALES INTACTOS.

Los antitiroideos son sustancias que producen bocio por impedir la biosíntesis de las hormonas tiroideas, lo que da como resultado una disminución de los niveles de dichas hormonas en plasma. Como consecuencia induce un aumento de la secreción de TSH por la hipófisis.

La respuesta más rápida del tiroides ante el estímulo del TSH, es una salida de las iodotironinas y el I^- al plasma. Adams y Purves (1957) han demostrado que tratando animales con pequeñas dosis de TSH, la secreción de hormonas tiroideas es proporcional al logaritmo de la dosis de TSH administrada. Esta relación se mantiene probablemente dentro de las variaciones fisiológicas de concentraciones de tirotropina en sangre. Pero, administrando grandes dosis de TSH, hay factores limitantes intratiroideos, que no permiten que esta proporcionalidad se mantenga, llegandose a la situación en que la secreción de hormonas tiroideas está limitada por la velocidad a que son sintetizadas. Y como el proceso de síntesis es más lento que el de secreción, se produce una disminución de los compuestos iodados intratiroideos.

Una estimulación prolongada de la glándula tiroidea produce hipertrofia celular y un limitado grado de hiperplasia, con lo que el tejido tiroideo consigue aumentar su actividad.

Pero si además de ser estimulado el tiroides por altos niveles de TSH, la síntesis de las hormonas tiroideas está inhibida por la administración de antitiroideos, no le es posible al tiroides sintetizar y segregar sus propias hormonas en respuesta al vigoroso estímulo que recibe de los altos niveles de TSH. En este estado el tiroides crece, llegando a producirse bocio y un estado de hipotiroidismo.

Como consecuencia de todos estos procesos, se producen grandes alteraciones fisiológicas de estos animales. El contenido de los compuestos iodados intratiroides cae hasta valores muy bajos. El valor de este parámetro en los animales controles de nuestros experimentos varía desde 3,3 $\mu\text{g}/\text{glándula}$ (Experimento VII) hasta 10,8 $\mu\text{g}/\text{glándula}$ (Experimento VI). El tratamiento con antitiroideos baja el contenido de iodo en tiroides drásticamente. Así, los animales tratados con PTU durante 12 días tienen un contenido de I^{127} en tiroides de 0,45 $\mu\text{g}/\text{glándula}$ (Experimento II), y dicho vaciamiento se acentúa al prolongar el tiempo de administración del bociógeno, llegando a valores tan bajos como 0,02 $\mu\text{g}/\text{glándula}$ a los 18 ó 20 días de tratamiento (Experimentos VI y VII).

Los niveles de PBI en plasma sufren cambios paralelos a los observados en el contenido de iodo en tiroides. Los animales tratados durante 12 días con PTU tienen un PBI de 1,5 $\mu\text{g}/100 \text{ ml}$, mientras que a los 18 ó 20 días de tratamiento es de 0,04 $\mu\text{g}/100 \text{ ml}$ y 0,03 $\mu\text{g}/100 \text{ ml}$, respectivamente. Las variaciones de PBI en el plasma de nuestros animales controles van desde 3,3 a 5,8 $\mu\text{g}/100 \text{ ml}$.

En esta situación, los procesos de crecimiento, diferenciación y metabolismo energético, que dependen en gran parte de los niveles de hormonas tiroideas circulantes en plasma, estarán muy afectados, por lo que un animal hipotiroideo tendrá un metabolismo energético muy bajo y un crecimiento muy reducido, evidenciándose ésto tanto más intensamente cuanto más joven es el animal. Un ejemplo nos pondrá de manifiesto cuán intensamente está afectado el crecimiento por la carencia de hormonas tiroideas: el aumento de peso corporal de los animales controles durante 35 días fue de 158 ± 8 g, mientras que el de los animales tratados a PTU durante este tiempo fue de 47 ± 11 g (Tabla 18).

Algunas de las alteraciones más llamativas debidas a la falta de tiroxina, son las producidas en la hipófisis. Este tejido muestra una gran sensibilidad a las variaciones de estas hormonas en plasma, siendo las células acidófilas productoras de GH las que más rápidamente se afectan ante la carencia de hormonas tiroideas. Investigaciones realizadas en numerosos laboratorios han demostrado que, la inducción de un hipotiroidismo intenso en ratas jóvenes, produce efectos semejantes a los de la hipofisectomía. Estudios morfológicos de la hipófisis y de glándulas dependientes de ella revelan atrofia de dichas glándulas, y bioensayos del contenido en hipófisis y niveles en plasma de ratas tiroidectomizadas, han mostrado que los niveles de GH, ACTH, FSH e ICSH son muy bajos tanto en hipófisis como en plasma, mientras que los de TSH son altos en plasma y bajos en hipófisis (Griesbach y Purves, 1945; Contopoulos y Koneff, 1963; Evans y cols., 1963; Lazo-Wasen, 1960; Schooley y cols., 1966). La disminución del contenido de GH en hipófisis de ratas tratadas con antitiroideos se

ha demostrado también por electroforesis en gel de poliacrilamida (Lewis y cols., 1965; Escobar del Rey y cols., 1968; Jolín y cols., 1968, 1970), y ha sido de nuevo demostrada en el presente estudio. Así, la medida del área descrita por el densitómetro al registrar la banda de GH del gel de poliacrilamida fue de $4,5 \text{ mm}^2$ en los controles, mientras que la de los animales tratados con PTU durante 12 días fue de $0,5 \text{ mm}^2$. Análogos resultados se obtienen en animales tratados con ClO_4K , MMI o SCNK (Tablas 10, 12 y Fig. 25).

En este estudio hemos conseguido la producción de un hipotiroidismo intenso y la inducción de bocio por tratamiento con dieta baja en iodo suplementada con ClO_4K o PTU, principalmente, aunque también se han empleado otros antitiroideos, como MMI y SCNK. El mecanismo por el que drogas como el ClO_4K o PTU inhiben la síntesis de hormonas tiroideas es distinto. El ClO_4K actúa como antitiroideo por impedir la entrada del iodo en la glándula, debido probablemente a la similitud de carga y volumen que existe entre los iones I^- y ClO_4^- (Anbar y cols., 1959, b). Esta explicación lleva implícito el aceptar que en el mecanismo de la "captación" el tiroides no distingue entre diferentes aniones con la misma carga y volumen parecido. El PTU afecta la función tiroidea por inhibir la oxidación del iodo y, por ende, su incorporación a los radicales tirosílicos, y el acoplamiento de las tirosinas para dar lugar a la formación de tri y tetraiodotironona (Taurog y cols., 1947).

En los numerosos experimentos realizados a lo largo del presente trabajo, en los que hemos comparado la capacidad

bociogénica del ClO_4K y PTU, hemos encontrado que los grupos de animales sometidos a cada una de estas drogas presentan una función tiroidea muy disminuida y semejante entre sí, dependiendo de la longitud del periodo de experimentación. Así por ejemplo, en el experimento II, en el que los animales estuvieron tratados durante 10 días, el contenido de iodo de sus tiroides era $0,45 \pm 0,15$ y $0,35 \pm 0,10$ para las ratas con ClO_4K o PTU, respectivamente, mientras que el PBI era 1,5 y 1,4, en el mismo orden. Además, los niveles de TSH circulantes eran igualmente altos con cada una de estas drogas (Fig. 20). Por otra parte, el contenido de GH en hipófisis (Tabla 12), parámetro muy sensible a los niveles de hormonas tiroideas en plasma, estaban prácticamente afectados con la misma intensidad. Estos resultados indican que la función tiroidea está igualmente inhibida por la administración de estas dos drogas.

Sin embargo, los animales tratados con cada uno de estos antitiroideos desarrollaban bocios de tamaños muy diferentes. Este hecho, que anteriormente había sido descrito por Alexander y Wolff (1966) y por Jolín y cols. (1968, 1970), es muy llamativo ya que desde muy antiguo se había aceptado la existencia de un paralelismo entre el tamaño de los bocios y los niveles de TSH en plasma. Hasta tal punto fue esto así, que en los primeros trabajos de este campo se tomaban los pesos de los tiroides como medida indirecta de los niveles de TSH en plasma.

Aun más sorprendente es el hecho de que al tratar a ratas con estos dos antitiroideos juntos (animales intactos, Experimento IV) diera como resultado la formación de un bocio de

tamaño intermedio al inducido por cada una de estas drogas aisladamente. Es decir, los animales tratados con $\text{ClO}_4\text{K} \dagger \text{PTU}$, en los que la síntesis de hormonas tiroideas está inhibida por dos mecanismos distintos, presentan unos pesos de tiroides que guardan la relación siguiente: $\text{PTU} > \text{PTU} \dagger \text{ClO}_4\text{K} > \text{ClO}_4\text{K}$. Lo lógico hubiese sido que en esta última relación se hubieran cambiado los términos, ya que además las ratas tratadas con $\text{ClO}_4\text{K} \dagger \text{PTU}$ mantienen niveles de TSH en plasma ligeramente superiores al de las tratadas sólo con PTU o ClO_4K . Según estos resultados, cabe suponer que el ClO_4K , al ser administrado junto con el PTU, se comporta frente a él como un antibociógeno, disminuyendo su acción bociogénica. Es decir, que en esta situación el ClO_4K tiene un efecto análogo al que hubiese tenido la administración de tiroxina. Esta acción del ClO_4K cuando se administra junto con PTU es difícil de entender, y el mecanismo por el que lo efectúa no puede ser explicado por los conocimientos clásicos de interregulación tiroides-hipófisis.

Tenemos pues planteada una situación experimental, en la que animales tratados con ClO_4K , $\text{ClO}_4\text{K} \dagger \text{PTU}$ o PTU desarrollan bocios de tamaño muy distinto, aunque padezcan un hipotiroidismo de grado muy semejante, si solo tenemos en cuenta parámetros clásicos, como PBI, crecimiento, etc. La diferencia en el peso del tiroides encontrada entre los animales tratados a ClO_4K o PTU, podría justificarse por la creencia existente en la literatura de que los tiouracilos potencian algunas de las acciones del TSH (Halmi y Spirtos, 1955).

Halmi y Spirtos(1955) encontraron que el cociente T/S (concentración de iodo en tiroides/concentración de iodo en plasma), que es un parámetro muy sensible a la acción del TSH, está muy disminuido en las ratas hipofisectomizadas, $6,4 \pm 6$ frente a $25,7 \pm 6$ en sus controles, y aumenta significativamente con la administración de una sola dosis de TSH ($31,6 \pm 6,2$). Y este efecto del TSH se potencia si junto con él, se administra PTU ($36,8 \pm 3,2$).

Pero más tarde, Rose y Nelson (1956) estudiaron este problema de una forma muy demostrativa. Usando microinyectores, infundieron una solución continuada de PTU en una pequeña área de uno de los lóbulos del tiroides de un perro, durante 8 días. El PTU inhibió marcadamente la captación de I^{131} en el área del tiroides bañada con este antitiroideo, sin afectar la captación del resto de la glándula. Por examen histológico no encontraron diferencias entre el área del tiroides en la que el PTU se infundía y el otro lóbulo. Suponían que, puesto que la misma cantidad de TSH llegaba en su experimento a todas las áreas del tiroides, deberían haber encontrado una mayor evidencia histológica del estímulo de TSH en las células tiroideas bañadas con la solución de PTU, que en las células del lóbulo opuesto. Estos resultados plantearon serias dudas sobre la hipótesis de que el PTU aumente específicamente la acción del TSH, y hacen cuestionable que los tiouracilos potencien la acción de la tirotropina.

Además, los resultados de Halmi pueden explicarse sobre otras bases distintas: a) Es posible que este aparente

efecto del PTU potenciando la acción del TSH medida por el cociente T/S , sea consecuencia de que el PTU disminuya la degradación de la hormona tirótopa, en cuyo caso ésta tendría una acción más prolongada sobre el tejido tiroideo. A este respecto no hay datos en la literatura que apoyen esta interpretación.

b) Ha de tenerse en cuenta una segunda interpretación. Considerando que el metabolismo intratiroideo del iodo es un proceso con una alta cinética, en el estudio de una situación determinada hay que considerar no sólo los procesos por los que el iodo se incorpora a la glándula, sino también aquellos por los que sale de ella. La consideración del simil siguiente nos ayudará a la comprensión del problema. En un recipiente con dos orificios, uno de entrada y otro de salida, el nivel de un líquido viene dado por las cantidades que entran y salen. Si tapamos el orificio de salida el líquido alcanzará más nivel, pero no porque haya entrado más, sino porque se ha impedido su salida. Similarmente, en un momento dado, el contenido de compuestos iodados intratiroideos será la resultante de los procesos de entrada y salida. En el animal hipofisectomizado el metabolismo intratiroideo del iodo es muy lento, y éste se estimula grandemente con la presencia de TSH, por lo que el I^{131} captado pasará rápidamente, mediante un proceso en cadena a incorporarse a las tironinas, y parte de éstas abandonarán la glándula siendo vertidas a la circulación. En presencia de PTU los mecanismos de la biosíntesis de las hormonas tiroideas están inhibidos, y consecuentemente disminuye la cantidad de hormonas que pueden ser segregadas a la circulación. Lo cual equivale

a taponar el orificio de salida de nuestro recipiente. Ello daría lugar a que aparentemente haya un aumento del contenido de iodo en la glándula, pero no debido a que se haya aumentado el proceso de captación sino a que se ha inhibido el de secreción.

En la actualidad no hay base experimental que apoye la hipótesis de que el PTU pueda potenciar la acción del TSH, por lo que ésta suposición no puede ser tomada como explicación al problema aquí planteado.

El hecho de que el ClO_4K y PTU, que inducen un hipotiroidismo del mismo grado, afecten de forma tan diferente la respuesta ponderal del peso del tiroides, ha sido íntegramente estudiada en nuestro laboratorio. Ello dio como resultado el poder poner de manifiesto diferencias en los niveles de insulina entre los grupos de ratas tratadas con cada uno de estos bociógenos. Se encontró que las ratas tratadas con PTU que desarrollan grandes bocios mantienen niveles de insulina en plasma significativamente más altos que los animales a ClO_4K que desarrollan bocios pequeños. Los niveles de insulina en las ratas tratadas con ClO_4K y PTU dependían de la longitud del periodo de experimentación. A tiempo corto de tratamiento, mantenían unos niveles de insulina en plasma muy semejante al de los animales tratados con PTU, y cuando el tiempo de tratamiento con estos bociógenos aumenta, los niveles de insulina en plasma bajan y se hacen más parecidos a los encontrados en las ratas tratadas con ClO_4K .

Estos resultados han sido confirmados en esta Tesis.

En los Experimentos II y VI (Tablas 5, 19 y 20), las ratas tratadas con PTU mantenían niveles de insulina en plasma más altos y desarrollaban bocios mayores que los animales tratados con ClO_4K a los 12, 20 y 35 días de tratamiento (Fig. 13 y 19). Y en el Experimento IV (ratas intactas), los animales tratados con PTU + ClO_4K desarrollaron bocios intermedios al inducido con cada una de las drogas aisladamente (Fig. 15), y mantienen niveles de insulina semejante a los de los animales a ClO_4K (Tabla 12).

En numerosas situaciones experimentales, hemos encontrado que las ratas tratadas con PTU mantienen niveles de insulina circulante superiores al de las ratas a ClO_4K , y en algunos casos no solo eran iguales sino superior al de las controles de la misma edad. Este efecto del PTU podía ser consecuencia de su acción antitiroidea o representar un efecto extratiroideo de esta droga. El estudio de los niveles de insulina en ratas tiroidectomizadas, evidenció que éstas mantenían niveles de insulina en plasma más parecidos al encontrado en ratas tratadas con ClO_4K que al de las tratadas con PTU (Jolín y cols., 1970). De esta observación parecía deducirse que el efecto del PTU sobre los niveles de insulina en plasma era un efecto extratiroideo y que podía desligarse de su acción antitiroidea.

Con los conocimientos actuales, solo nos es posible teorizar sobre los posibles mecanismos por los que el PTU aumenta los niveles de insulina en plasma, ya que son muchos y muy variados los efectos extratiroideos de esta droga.

Se pueden considerar varias posibilidades a este respecto:

1º. Que tenga el PTU acción directa sobre el páncreas. La administración de PTU a ratas tiroidectomizadas induce un aumento de los niveles de insulina circulante, y esta acción disminuye al aumentar el tiempo que transcurre entre la tiroidectomía de los animales y el de iniciación de la administración de PTU. Esto está de acuerdo con el hecho de que la administración de PTU a animales intactos induce un aumento mayor en los niveles de insulina circulante a tiempo corto de tratamiento, que a tiempo largo, cuando el hipotiroidismo es muy intenso (Jolín y cols., 1970). La consideración de estos resultados hace suponer, que, para que este efecto del PTU tenga lugar, necesita de una hipófisis funcionante, o de un páncreas con plena capacidad de respuesta, ya que en el hipotiroidismo intenso están afectadas tanto la función hipofisaria, como la pancreática, puesto que se ha encontrado que los animales intensamente hipotiroideos tienen muy disminuida la respuesta de la insulina al ser estimulados con glucosa (Jolín, comunicación personal).

2º. Posibilidad de una disminución de la degradación de la insulina por el hígado, debida al PTU. Yatvin y cols. (1965) encontraron que los tiouracilos aumentan el tamaño del hígado, y su concentración proteica, y que este aumento en el contenido de proteínas del hígado es el resultado de una disminución del catabolismo proteico junto a un anabolismo inalterado.

3º. Acción del PTU sobre otros órganos. Si comparamos el

hipotiroidismo inducido por tiroidectomía frente al inducido por PTU, encontramos que en las ratas tiroidectomizadas disminuye grandemente el peso absoluto y relativo de diversos órganos como adrenales, riñones, corazón, etc., sin embargo, en los animales tratados con PTU, se observa un aumento en los pesos relativos del corazón, riñones, testículos y adrenales, siendo el peso de esta glándula $23,2 \pm 3,9$ frente a $9,9 \pm 0,3$ en los animales controles (Fregly y cols., 1960). En muchos de nuestros experimentos las ratas tratadas con PTU tienen un peso de adrenales superior al de las de los animales con ClO_4K (Tablas 11 y 18).

Otros hechos experimentales apoyan la idea de que la función adrenal de las ratas tratadas con PTU es mayor que la de las ratas tiroidectomizadas. Estudios in vitro han evidenciado que las adrenales de las ratas tratadas con PTU, en presencia de ACTH en el medio de incubación, tienen más capacidad para sintetizar Δ^4 -3 cetosteroides que las de las ratas tiroidectomizadas (Steinetz y Beach, 1963).

4º. Posible alteración del metabolismo de la glucosa por el PTU. En nuestros grupos experimentales, los altos niveles de insulina encontrados en ratas tratadas con PTU no están justificados por los niveles de glucosa que son altos, ni se debe a que estos animales metabolizan lentamente la glucosa, puesto que experimentos realizados muy recientemente en nuestro laboratorio demuestran que en las ratas tratadas con PTU o ClO_4K durante 30 días, o tiroidectomizadas, al ser estimuladas con glucosa, los animales tratados con PTU la metabolizan mucho más rápidamente que las

ratas tiroidectomizadas o tratadas con ClO_4K .

Por otra parte, los niveles plasmáticos de insulina, más altos en los animales a PTU que en las ratas a ClO_4K , tampoco puede justificarse por diferencias en los niveles de glucosa que son iguales en todos estos grupos. El hecho de que las ratas a PTU mantengan niveles de insulina altos, y que no se haya encontrado en ningún caso niveles de glucosa bajos, hace pensar en una cierta analogía con aquella situación en que los glucocorticoides están elevados. Muy conocido es el hecho de que en aquellos casos donde los niveles de glucocorticoides están elevados, se observan niveles altos de insulina circulante y simultáneamente los de glucosa también están elevados.

El mecanismo por el que el PTU eleva los niveles de insulina es uno de los problemas que están planteados en el momento presente. Su estudio parece de difícil realización, ya que los resultados obtenidos parecen indicar más de un camino a seguir.

Por otra parte, el paralelismo encontrado entre el peso de los tiroides y los niveles de insulina en plasma de ratas tratadas con PTU o ClO_4K , hace pensar la existencia de una estrecha relación entre ambos parámetros. Dicha correlación había sido anteriormente encontrada (Escobar del Rey y cols., 1968; Jolín y cols., 1970) en otras situaciones experimentales. Cuando el peso de los tiroides de ratas tratadas con PTU o ClO_4K se relacionaron con los niveles individuales de insulina en

plasma, se encontró una correlación positiva entre ambos parámetros (Experimento VI), teniendo a los 20 días las siguientes características: $r=0,689$, $n=15$, $p < 0,01$, y a los 35 días: $r=0,587$, $n=14$, $p < 0,05$. Ello nos indicaba que ambas variables están estrechamente relacionadas (Fig. 21 y 22).

Por otra parte, el que los animales tratados con PTU tengan mayores bocios y concomitantemente el peso de sus adrenales sea superior al de los animales a ClO_4K , nos hizo relacionar el peso de dicha glándula. Y se encontró una correlación positiva a los 35 días de experimentación (Experimento VI) de las siguientes características: $r=0,658$, $n=15$, $p < 0,01$ (Fig. 23).

Era lógico pensar que los animales a ClO_4K o $\text{ClO}_4\text{K} \downarrow$ PTU desarrollan bocios pequeños debido a que mantienen niveles de insulina en plasma bajos. Estudios anteriormente realizados (Jolín y cols., 1970) habían demostrado que si los animales con ClO_4K o $\text{PTU} \downarrow \text{ClO}_4\text{K}$ son tratados con insulina, se induce un aumento del peso de los tiroides, alcanzándose los valores encontrados en las ratas tratadas con PTU (Fig. 7).

El hecho de que los animales que desarrollen bocios mayores sean los que mantienen niveles de insulina en plasma más altos que aquellos otros que desarrollan bocios pequeños, que haya una correlación positiva entre ambos parámetros y el que la administración de insulina induzca un aumento del peso de los tiroides de ratas tratadas con bociógenos, son base experimental suficiente que apoyan la hipótesis de que la insulina tie-

ne una acción sobre el peso de los tiroides de ratas tratadas con antitiroideos.

La cuestión que seguidamente se nos planteaba era tratar de aclarar el mecanismo por el que la insulina aumentaba la respuesta ponderal del tiroides a los altos niveles de TSH en plasma. Hay que considerar dos posibilidades: Que tenga una acción directa a nivel de tiroides, o que ésta se ejerza a través de otro mecanismo, como por ejemplo, a través del aumento de los niveles de alguna hormona (s) o factor (es) que sea el que verdaderamente actúe a nivel de tiroides.

Consideremos la primera posibilidad. Como ya se ha indicado repetidamente en el animal hipotiroideo tanto la función adenohipofisaria y consecuentemente la de las glándulas dependientes de ella, como la función pancreática están muy disminuidas. En estas circunstancias la administración de insulina mejoraría en parte el estado endocrino del animal, lo que haría que el tiroides pueda crecer más ante el estímulo del TSH.

En la literatura hay varias situaciones que parecen demostrar un efecto directo de la insulina sobre la glándula tiroides. Nataff (1968), usando técnicas de cultivo de órganos, estudió la acción del TSH e insulina sobre el metabolismo intratiroideo del iodo en el tiroides de fetos de ratas a los 16 días de gestación, cuando aún no tienen capacidad de metabolizar el iodo. Poniendo la insulina como única hormona presente en el medio de cultivo, se aumentó significativamente la incorporación del I^{131} a iodotirosinas y iodotironinas. Cuando añadió juntas in-

ulina y TSH, la utilización del I^{131} excedió a la observada en presencia de TSH sólo. Y sugiere que este efecto de la insulina puede ser realizado por su acción estimuladora sobre la captación de glucosa.

Serif y Shotang (1962) han encontrado que el tiroides de ratas diabéticas por la administración de aloxan tienen una función tiroidea muy baja, medida por la captación de I^{131} y la secreción de aminoácidos iodados marcados. Y que este efecto se corregía por la administración de insulina. Kumaresan y Turner (1966), trabajando con ratas hechas diabéticas por tratamiento con aloxan, encontraron que el TSR (velocidad de secreción de tiroxina) estaba muy disminuido en estos animales, teniendo valor de $0,61 \pm 0,07 \mu\text{g}$ frente a $1,03 \pm 0,04 \mu\text{g}$ en los controles, y que la administración de 3 U de insulina/rata/día durante 10 días produjo un aumento del TSR de las ratas diabéticas revirtiéndolo al valor encontrado en los controles. Estos autores admiten la posibilidad de que en la diabetes se produce una disminución del factor hipotalámico que estimula la secreción del TSH.

Sin embargo, en nuestra situación experimental había base para creer que esta acción de la insulina sobre el peso del tiroides de ratas tratadas con antitiroideos no era directa sobre el tiroides. Ha sido descrito (Jolín y cols., 1970) que esta acción de la insulina parecía depender del grado de hipotiroidismo de los animales. O sea, si el tratamiento con insulina durante 10-12 días, se iniciaba cuando los animales eran ligeramente hipotiroideos, cuando el contenido de GH hipofisario era

el 80 % de sus controles, el efecto de la insulina era muy intenso y respondían a él todos los animales del grupo. Si la administración de insulina se iniciaba cuando los animales tenían un hipotiroidismo más acentuado que en el caso anterior, y tenían un contenido de GH en hipófisis del 30 % de sus controles, la respuesta ponderal del peso del tiroides al tratamiento con insulina era menos intensa que en el caso anterior, y no respondían a él todos los animales del grupo. Por último si la administración de insulina se iniciaba cuando los animales eran intensamente hipotiroideos, siendo el contenido de GH en sus hipófisis menor del 5 % de sus controles, no se obtenía ningún aumento del peso del tiroides como resultado a dicho tratamiento (Fig. 7). Estos resultados sugerían fuertemente que para que el tratamiento con insulina fuese efectivo a nivel de peso de tiroides, se requería la presencia de una hipófisis funcionante. Esta está tanto más afectada, cuanto mayor y más prolongada es la carencia en hormonas tiroideas.

Por otra parte, si la insulina se administraba junto con glucosa isotónica, no tenía efecto. Lo cual indicaba que este efecto de la insulina era ejercido a través de su acción hipoglucémica (Fig. 8) y se producía, sin que hubiese cambios en los niveles de TSH, medidos por el bioensayo de Kirkham (1962).

Teníamos pues, resultados de suma importancia, que nos indicaban por una parte que la acción de la insulina no era ejercida directamente sobre el tiroides y por otra que ella se realizaba a través de su efecto hipoglucémico, y que necesitaba la pre-

sencia de una hipófisis capaz de sintetizar y segregar sus propias hormonas y de mantener una secreción hormonal activa en las glándulas dependiente de ella.

Estos resultados dirigieron nuestra atención al estudio de aquellas hormonas hipofisarias que son segregadas al plasma tras la hipoglucemia: GH y ACTH.

Sin embargo, por lo que respecta a la GH, hay serias dudas de que se estimule la secreción de GH en roedores, tras el efecto hipoglucémico de la insulina. La administración de insulina y arginina, el stress y la exposición al frío, condiciones todas ellas capaces de inducir secreción de GH en primates (Glick y cols., 1965), en roedores o no tienen efecto o inducen una respuesta opuesta a la encontrada en primates (Müller y cols., 1969). Sin embargo, refiriendonos concretamente a ratas hay una discrepancia sorprendente entre los resultados obtenidos por radioinmunoensayo o por bioensayo (Schalch y Reichlin, 1966). Con el tibia test, se ha encontrado en la rata una disminución en el contenido de GH en hipófisis tras la hipoglucemia y el frío, lo que no ha podido ser encontrado en el ratón, (Krulich y McCann, 1966, a y b).

Esta diversidad de opiniones nos hizo dirigir nuestro esfuerzo al estudio de la acción del ACTH y corticoides sobre la función tiroidea. Tras la hipoglucemia está claramente demostrado el aumento de la secreción de ACTH y corticoides. Kraicer y Logethetopoulos (1963) encontraron en ratas que, la administración de 0,5 U de insulina producía una bajada de los niveles

de glucosa plasmática a valores tan bajos como 40 mg/100 ml a los 90 min, a la vez que detectaban un aumento de los niveles de corticoides en plasma, que pasaron de 18 $\mu\text{g}/100$ ml en el grupo basal a 60 $\mu\text{g}/100$ ml en el tiempo en que la bajada de glucosa en plasma fue más intensa. Si inyectaban la insulina junto con glucosa, no tenían ningún aumento de los niveles de corticosterona en plasma. Lo que demuestra que el efecto de la insulina no es directo sobre las adrenales sino a través de la hipoglucemia producida que induce secreción de ACTH y consecuentemente glucocorticoides.

II - EFECTO DE LA ADRENALECTOMIA (ALTOS NIVELES DE ACTH) SOBRE EL DESARROLLO DEL BOCIO INDUCIDO POR PTU δ ClO_4K .

Empleábamos ratas adrenalectomizadas ya que así descartábamos la posible influencia de los glucocorticoides, y por otra parte en esta situación conseguíamos que el animal pueda mantener unos niveles endógenos altos de ACTH de una forma continua dentro de los límites fisiológicos. Así evitábamos la administración exógena de ACTH ya que, debido a que tiene una vida media muy corta, hubiese sido prácticamente imposible mantener niveles igualmente altos a lo largo del periodo de experimentación.

A tiempo relativamente corto la adrenalectomía no afectó significativamente el peso corporal de los animales controles (Experimentos II y IV), pero a más largo tiempo, los animales adrenalectomizados presentaban un peso corporal significativamente menor que el de los intactos de la misma edad (Experimentos I y III). En ninguno de los dos casos afectó el peso relativo del tiroides, ni los habituales índices de la función tiroidea, como contenido de iodo en tiroides o los niveles de PBI o TSH en plasma.

Sin embargo, en los animales tratados con PTU (Experimentos I, II y III), los altos niveles de ACTH inducidos por la adrenalectomía o la carencia de glucocorticoides disminuyeron grandemente la respuesta ponderal del tiroides al tratamiento con este antitiroideo. Este hecho, también se pone de manifiesto en las ratas tratadas con ClO_4K (Experimento II), aunque menos intensamente. Estos resultados no serían de esperar si sólo se considerasen los índices habituales de la función tiroidea, cuyos valores tenían igual magnitud en las ratas intactas o adrenalectomizadas tratadas con cada uno de estos bociógenos.

Pensamos que estos hallazgos podían deberse a diferentes causas: A) Diferencias en los niveles de TSH en ratas intactas o adrenalectomizadas tratadas con antitiroideos. B) Que los altos niveles endógenos de ACTH disminuyan la respuesta ponderal del tiroides al estímulo del TSH. C) Que en ausencia de glucocorticoides la respuesta del tiroides al TSH esté disminuida.

Consideremos estas posibilidades. En el animal intacto tratado con antitiroideos está muy estimulada la síntesis y secreción de TSH. Sin embargo, en el animal adrenalectomizado y tratado con bociógenos están muy estimuladas tanto la función adrenocorticotropa como la tirotrópica de la hipófisis, y es posible que en esta situación, la hipófisis no pueda mantener un ritmo de síntesis y secreción de TSH tan intenso como en el animal intacto.

Un gran número de investigadores ha llegado a la con-

clusión que en el stress, donde la hipófisis está muy estimulada para sintetizar ACTH, simultáneamente disminuye la secreción de TSH (Brown-Grant, 1956; Harris y Woods, 1957; Kraicer y cols., 1963) encontrando que 15 min. después del stress se produjo una bajada de los niveles de TSH en plasma, al mismo tiempo que la secreción de ACTH estaba estimulada al máximo. Y este efecto se producía tanto en animales intactos como en adrenalectomizados.

Ninguna de estas observaciones pueden explicar el hecho de que en el stress haya una secreción hipofisaria preferente de ACTH a TSH, y si ello se debe a que el hipotálamo preferentemente sintetice CRH a TRH (hormonas hipotalámicas estimuladoras de ACTH y TSH, respectivamente) o ello es a nivel de hipófisis, como si las células adenohipofisarias no pudieran mantener una secreción elevada de ACTH y TSH simultáneamente cuando son estimuladas al mismo tiempo por cantidades crecientes de CRH y TRH.

Sakiz y Guillemin (1965) estudiaron la secreción de ACTH y TSH en respuesta al stress y a la inyección de TRH. Los resultados claramente demuestran que cuando la secreción de TSH está estimulada por TRH, concomitantemente hay menos secreción de ACTH en respuesta al stress. Y contrariamente, cuando la secreción de ACTH está inhibida pretratando a las ratas con dexametasona y nembutal la secreción hipofisaria de TSH en respuesta al TRH es más alta.

De estos resultados se dedujo la existencia de una re-

lación inversa entre la secreción de ACTH y TSH. Sin embargo, no siempre se ha encontrado dicha relación entre la secreción de ambas hormonas. Ducommun y cols. (1966) midieron los niveles de TSH y ACTH en ratas normales y en aquellas tratadas con dexametasona tras un stress mediano producido por la inyección de salino o por la exposición al frío. En ambos grupos de ratas normales y tratadas con dexametasona, el stress produjo una inhibición de la secreción de TSH, incluso en aquellos animales en los que se había inhibido la secreción de ACTH por dexametasona. Sin embargo, cuando ambos grupos de ratas fueron expuestas al frío, se produjo un aumento de los niveles de TSH en ambos, pero fue estadísticamente mayor en aquellas ratas en las que la secreción de ACTH estaba inhibida. Estos autores concluyen que la inhibición del TSH por el stress es una coincidencia más que una consecuencia de la secreción aumentada de ACTH, y sugieren que la secreción de TSH puede estar bajo la influencia de dos mecanismos diferentes de control. 1º. La inhibición de la secreción de TSH después del stress puede deberse a alguna acción del stress independientemente a la secreción de ACTH. 2º. El aumento de la secreción de TSH observada en la exposición al frío o la inyección de TRH depende, al menos en parte, de la simultánea secreción de ACTH, lo que apunta a nivel de hipófisis como el lugar de esta interacción. Esta interacción puede ser vislumbrada como una competición por un precursor o cofactor común. El problema de la interregulación entre TSH y ACTH es muy complejo y no hay base experimental en la actualidad para contestar a las preguntas planteadas.

En nuestra situación experimental, las ratas adrenalec-

tomizadas tratadas con ClO_4K o PTU + ClO_4K (Experimento IV) o PTU (Experimento III) mantienen niveles de TSH semejantes a los de los animales intactos al tiempo del sacrificio, a pesar de lo cual hay mucha diferencia en el peso del tiroides entre ambos grupos de animales.

Por otra parte, el tratamiento con TSH exógeno fue efectivo a nivel de peso de tiroides en los animales intactos a PTU, pero no en los adrenalectomizados a PTU. O sea que, debido a los altos niveles de ACTH o a la ausencia de glucocorticoides, la acción del TSH, endógeno o exógeno, sobre la función tiroidea está muy disminuido o es prácticamente nula. Sin embargo, la administración de corticosterona a ratas adrenalectomizadas tratadas con PTU permitió la respuesta ponderal del tiroides al estímulo del TSH, lo que hace pensar que los hechos anteriormente descritos encontrados en las ratas adrenalectomizadas se deben más a la carencia de glucocorticoides que a la presencia de altos niveles de ACTH. En resumen, el hecho de que: 1º. En las ratas adrenalectomizadas los bocios desarrollados con los distintos antitiroideos sean menores que en los animales intactos sometidos al mismo tratamiento, siendo los mismos niveles endógenos de TSH en plasma iguales. 2º. Que la administración de TSH exógeno en dosis que son activas en el animal intacto tratado con PTU, no lo sea en ratas adrenalectomizadas con igual tratamiento. 3º. Que la administración de corticosterona revierta el tamaño del bocio de los animales adrenalectomizados a PTU hacia el valor encontrado en ratas intactas con dicho tratamiento, hace pensar que la falta de la respuesta ponderal al tratamiento con bociógenos de los animales adrenalect-

tomizados, se deba más a la ausencia de glucocorticoides que a la presencia de altos niveles endógenos de ACTH.

Además, el hecho de que los bocios desarrollados por ClO_4K y $\text{PTU} \downarrow \text{ClO}_4\text{K}$ sean semejantes en los animales adrenalectomizados, en situaciones donde el contenido de iodo en tiroides en los niveles de PBI o TSH en plasma y el contenido de GH hipofisaria revelan igual grado de hipotiroidismo en los diferentes grupos, hace suponer que las adrenales, directa o indirectamente, están implicadas en el mecanismo por el que el ClO_4K reduce los grandes bocios inducidos por PTU (Fig. 15).



III - EFECTO DE LA INSULINA SOBRE EL PESO DEL TIROIDES DE RATAS INTACTAS Y ADRENALECTOMIZADAS TRATADAS CON ClO_4K o $\text{PTU} \dagger \text{ClO}_4\text{K}$.

Repetidamente habíamos encontrado que la administración de PTU a animales intactos, inducía bocios de mayor tamaño que el de las ratas a ClO_4K o $\text{PTU} \dagger \text{ClO}_4\text{K}$. Cambios paralelos al del peso del tiroides de los animales tratados con los citados antitiroideos, se encontraron en los niveles de insulina plasmática. Así, los animales tratados con PTU tenían mayores bocios y más altos niveles de insulina en plasma que las ratas a ClO_4K o $\text{PTU} \dagger \text{ClO}_4\text{K}$. Si la insulina estaba implicada en el hecho de que los animales tratados con PTU desarrollen bocios mayores que los que recibían ClO_4K o $\text{PTU} \dagger \text{ClO}_4\text{K}$, era lógico pensar que la administración de insulina a ratas tratadas con estos antitiroideos, que producen bocios pequeños y mantienen niveles bajos de insulina, debería inducir un aumento en el peso del tiroides de estos animales. Este hecho que anteriormente fue demostrado por Escobar del Rey y cols. (1968) y Jolín y cols. (1970) fue de nuevo encontrado en el presente estudio.

La administración de insulina a ratas intactas tratadas con ClO_4K o $\text{PTU} \dagger \text{ClO}_4\text{K}$ indujo un aumento significativo en el peso del tiroides, que igualó al de los animales tratados sólo con PTU . Estos cambios tenían lugar sin que se produjeran variaciones en el contenido de iodo en tiroides o en los niveles plasmáticos de PBI o TSH . O sea, la administración de insulina hacía aumentar la respuesta ponderal del tiroides ante los mismos niveles de TSH (Experimento IV, Fig. 15).

Por otra parte se observó que la administración de insulina inducía un aumento significativo en el peso de las adrenales, por encima del peso de los animales tratados sólo con los antitiroideos (Tabla 11). Este hecho hizo suponer que esta glándula había estado sometida a un mayor estímulo producido por su hormona trófica, lo que sin duda produciría un aumento en la síntesis y secreción de corticoides. Y aunque nosotros no hemos medido niveles de corticoides en estos animales, en la literatura encontramos datos que apoyan fuertemente esta suposición. Así, Kraicer y Logothetopoulos (1963) han encontrado un aumento de los niveles de corticosterona tras la administración de insulina, y deducen que ello se debe a un aumento de ACTH inducido por la acción hipoglucémica de la hormona citada.

Estas consideraciones nos hicieron suponer que, si los glucocorticoides están implicados en el mecanismo por el que la insulina induce un aumento del peso del tiroides de ratas intactas tratadas con antitiroideos, la insulina no debería ejercerlo en el animal adrenalectomizado, por lo que el siguiente paso fue estudiar la acción de la insulina en el peso del tiroides de ratas adrenalectomizadas tratadas con antitiroideos.

El primer hecho con el que nos encontramos fue que las ratas adrenalectomizadas no podían soportar la dosis de insulina que eran perfectamente admitidas por los animales intactos. En los experimentos anteriormente realizados con ratas intactas, se administró a los animales 0,2 U de insulina/rata/día, pero cuando quisimos administrar esta dosis a ratas adrenalectomizadas,

la mayoría murieron, por lo que se tuvo que bajar la dosis de insulina a 0,05 U/rata/día, la cual era perfectamente admitida por estos animales.

Nuevamente se confirmó el hecho de que las ratas adrenalectomizadas tratadas con antitiroideos desarrollaban un peso de tiroides menor que el de los animales intactos, a pesar de que mantenían niveles de TSH en plasma muy semejantes.

La administración de insulina fue efectiva en ratas intactas, produciendo un aumento en el peso del tiroides sobre el desarrollado por las ratas tratadas sólo con bociógenos. Pero, sin embargo, la administración de insulina a animales adrenalectomizados tratados con antitiroideos, no afectó el peso del tiroides. O sea, en ausencia de adrenales, la administración de insulina no afecta la respuesta ponderal del tiroides a los niveles de TSH (Fig. 15).

Estos resultados nos indicaban claramente: a) que en ausencia de glucocorticoides la respuesta ponderal del tiroides a los niveles de TSH está muy disminuida, y b) que en ausencia de glucocorticoides la insulina no tiene acción sinérgica con el TSH a nivel de dicha respuesta ponderal.

Podía pensarse que la insulina no afecta el peso del tiroides de los animales adrenalectomizados tratados con antitiroideos, porque en estos animales no podían ejercerse los efectos permisivos de los glucocorticoides. Es sabido que para muchas de las reacciones bioquímicas y fisiológicas del organismo, es

necesaria la presencia de pequeñas cantidades de corticoides, a pesar de que al parecer no intervienen directamente en dichos procesos.

Experimentos realizados posteriormente en nuestro laboratorio, después de finalizada la parte experimental de la presente tesis, han demostrado que, aun tratando a los animales adrenalectomizados con corticosterona en cantidades consideradas como permisivas para la realización de otras reacciones bioquímicas (50 ó 100 μg de corticosterona/rata/día) la insulina no afectó el peso del tiroides de animales a ClO_4K . O sea, que, en ratas adrenalectomizadas mantenidas o no con dosis de corticosteronas consideradas como permisivas (Hodges y Vernikos-Dannellis, 1962), la administración de insulina no afectó el peso del tiroides de ratas tratadas con antitiroideos, al contrario de lo que habitualmente se observa en los animales intactos.

De estos resultados se concluyó que están implicados los corticoides en el mecanismo por el que la insulina aumenta la respuesta ponderal del tiroides a los niveles de TSH. Los corticoides podían actuar directamente o a través de otro (s) mecanismo (s) que ayudarían al tiroides a responder más intensamente a los altos niveles de TSH.

Para intentar dilucidar esto último, el paso siguiente fue el estudio de la acción de los corticoides sobre la función tiroidea.

IV- EFECTO DE LOS CORTICOIDES SOBRE LA FUNCIÓN TIROIDEA.

A la vista de los resultados y conclusiones hasta ahora expuestos, consideramos de interés el estudio de la acción de los glucocorticoides sobre la función tiroidea, tanto de animales controles como de los tratados con bociógenos.

En un experimento preliminar que sobre este punto realizamos, se estudia la acción de tres dosis de corticosterona sobre el peso del tiroides de ratas tratadas con PTU, a fin de comparar la acción de pequeñas dosis de corticoides con otras más altas, más parecidas a las habitualmente empleadas en la literatura. Las tres dosis de corticosterona usadas en el experimento V, produjeron prácticamente el mismo aumento en el peso del tiroides, expresado en valor absoluto. El que no se obtenga una respuesta creciente en el peso del tiroides al aumentar la dosis de corticosterona administrada, puede deberse a que las dosis más altas de glucocorticoides empleadas, producen una inhibición en la secreción de ACTH y concomitantemente de los niveles endógenos de corticoides. Esto está apoyado en la observación de que hay una disminución del peso de las adrenales de los grupos de ratas tratadas con las dos dosis más altas de corticoides (Tabla 13). La administración de 5 mg de corticosterona tuvo un mayor efecto sobre el peso del tiroides que las otras dosis. Esto probablemente se debe a que los animales de este grupo perdieron peso por el tratamiento con una dosis tan alta de corticoides.

El efecto de la corticosterona sobre el peso del tiroides de animales tratados con PTU, es extensible a ratas tratadas con otros antitiroideos. Además, la acción de la corticosterona puede ser reproducida por otro corticoides como la hidrocortisona. Así, la administración de pequeñas dosis de corticosterona aumentó el peso del tiroides de ratas tratadas con ClO_4K , y la hidrocortisona aumentó la respuesta ponderal del tiroides de los animales tratados con PTU, ClO_4K , SCNK o MMI.

Este efecto de los glucocorticoides tiene lugar sin que se produzcan cambios en el contenido de yodo en tiroides o en los niveles plasmáticos de PBI o TSH. O sea, que sin producir alteraciones en el grado de hipotiroidismo de los animales, la administración de corticoides induce un aumento en la respuesta ponderal del tiroides a los altos niveles endógenos de TSH que hay en los animales tratados con antitiroideos.

En estos experimentos se pone de manifiesto que la acción de la insulina sobre el peso del tiroides no es directa. Mientras la administración de corticoides a ratas tratadas con ClO_4K produjo un aumento en el peso del tiroides al mismo tiempo que elevó los niveles de insulina circulante, en los animales tratados con PTU aumentó el peso del tiroides por encima del valor observado en los animales tratados sólo con PTU, pero en este caso, dicho efecto no iba acompañado de cambios en los niveles de insulina.

Por otra parte, la administración de corticoides a ratas normales, no produjo efecto en el peso del tiroides, ni cambio en

los diferentes parámetros tiroideos.

La administración de corticosterona aumentó significativamente la proporción relativa de todos los iodoaminoácidos marcados intratiroideos, a la vez que disminuyó el contenido de radioiodo en forma de I^{-*} .

El cociente MIT^*/DIT^* disminuyó en los grupos tratados con corticoides, lo cual es índice de un mayor aumento de la ulterior iodación de la MIT^* a la DIT^* . Simultáneamente, la proporción de radioiodo transformado en hormona ($T_4^* + T_3^*$), aumentó significativamente con el tratamiento con corticoides. Estos resultados sobre la distribución intratiroidea de compuestos iodados marcados con I^{131} , indican que la corticosterona produce un aumento hacia la mayor formación intratiroidea de iodo-tironinas*.

Por otra parte, la electroforesis de los homogenados de hipófisis en gel de poliacrilamida mostró que, a medida que aumentaba la dosis de corticosterona administrada a los animales, la banda correspondiente a la GH aparecía con mayor intensidad, comparada con la correspondiente a la de los animales tratados sólo con PTU. En la hipófisis de éstos, prácticamente había desaparecido dicha banda por el tratamiento con antitiroideo. Con la dosis más baja de corticosterona este efecto no fue tan intenso, aunque también se visualizó un incremento con respecto a la de los animales tratados sólo con PTU. Además, en los animales tratados con SCNK y MMI el tratamiento con hidrocortisona resultó en una reaparición de la banda de proteínas asociadas a GH.

En los grupos de PTU y ClO_4K , aunque la banda de GH no está claramente definida, aparece en el lugar que le corresponde un mayor oscurecimiento que el que se observa en los geles de poliacrilamida de los animales que sólo reciben bociógenos. Por lo tanto la corticosterona y la hidrocortisona, administrada a animales tratados con diferentes bociógenos, retarda la desaparición del contenido de GH en hipófisis producido por los anti-tiroideos. Este hecho ha sido anteriormente demostrado por el grupo de Evans (1961) mediante estudios morfológicos y por el de Lewis (1965) por gel de poliacrilamida.

Los datos presentados demuestran claramente que, los corticoides juegan algún papel aumentando la respuesta ponderal del tiroides a los altos niveles de TSH, de los animales tratados con bociógenos. Sin embargo, es difícil concluir si este efecto es directo sobre la glándula tiroides, ya que son muchos los cambios de otras hormonas y metabolitos que se producen por la administración de los adrenocorticoides. Cualquiera de estos cambios, o quizás otros que no hemos medido, pudiera ser la causa directa de los cambios observados en el peso de los tiroides de las ratas tratadas con anti-tiroideos.

Para dar una idea de la complejidad del problema, vamos a considerar brevemente a continuación, y a título de sugerencia para investigaciones futuras, algunos de los posibles mecanismos por los cuales la administración de corticoides afecta el peso del tiroides de los animales tratados con bociógenos.

1) Posibles alteraciones en los niveles de TSH circulantes.

En aquellos casos en los que tenemos datos referentes a las concentraciones de TSH en plasma en nuestros grupos experimentales, no se ha encontrado que la administración de corticoides altere los niveles de esta hormona en plasma. En la literatura nos encontramos con situaciones en que se induce un aumento del peso del tiroides sin producirse cambios en los niveles de TSH. Así, el tratamiento de animales a bociógenos con insulina (Jolín, y cols., 1970) o pequeñas cantidades de T_4 (Escobar del Rey y cols., 1968), induce un aumento en el peso del tiroides sin que se produzcan cambios en los niveles de TSH detectables por la técnica empleada (Kirkham, 1962). Los datos de TSH incluidos en el presente trabajo han sido obtenidos usando una técnica, radioinmunoensayo, mucho más sensible que el bioensayo de Kirkham. En este caso tampoco hemos encontrado que la administración de insulina altere los niveles de TSH plasmático, aunque sí producía un aumento en el peso del tiroides de ratas tratadas con antitiroideos.

2) Posibles alteraciones en los niveles de GH.

La administración de corticoides a ratas tratadas con bociógenos, induce un aumento en el contenido de GH en hipófisis de los animales tratados sólo con bociógenos. Este hecho ha sido anteriormente demostrado por estudios morfológicos (Evans y cols., 1961) y por gel de poliacrilamida (Lewis y cols., 1965). De lo que ocurre en los niveles de GH en plasma por la admi-

nistración de corticoides no tenemos experiencia por no disponer de método de valoración de esta hormona en plasma, y tampoco hemos encontrado en la literatura datos que nos aclaren este punto. Es posible que la acción de los corticoides sobre el peso del tiroides de ratas tratadas con bociógenos sea a través de este aumento en el contenido de GH en hipófisis. Maayan (1966) ha manifestado que, la administración a ratas hipofisectomizadas de TSH ovino junto con GH porcino produce un efecto mayor sobre el peso del tiroides que la administración de TSH sólo.

3) Posible implicación de las hormonas tiroideas.

La administración de corticosterona a ratas tratadas con PTU, induce un aumento significativo en el contenido de iodoaminoácidos marcados con I^{131} del tiroides, a la vez que una disminución en el de I^{-*} . Esto indicaría que el tiroides de estos animales tiene un mejor aprovechamiento del iodo disponible. Varios autores han demostrado (Escobar del Rey y cols., 1968; Sellers y Schönbaum, 1962) que la administración de pequeñas cantidades de T_4 a animales intensamente hipotiroideos, produce un aumento en el peso del tiroides sin que aparentemente haya cambios en los niveles de TSH (Escobar del Rey y cols., 1968). Estas dosis de T_4 restituyen parte de la función adenohipofisaria, y como consecuencia, la de algunas glándulas dependientes de ella (Evans y cols., 1963). En la actualidad tenemos pocos datos de la acción de los corticoides sobre el metabolismo intratiroides de los iodoaminoácidos, pero es posible que este aumento en

la síntesis de los compuestos iodados del tiroides, con un posible aumento de T_4 disponible para el organismo, sea la causa más directa del efecto de los corticoides sobre el peso del tiroides de ratas tratadas con bociógenos.

4) Posible aumento de la respuesta del tiroides al estímulo del TSH.

Por último, puede pensarse que el efecto de los corticoides sobre el peso del tiroides de ratas tratadas con bociógenos puede deberse, a que en el animal hipotiroideo desprovisto (o con niveles muy bajos) de las hormonas trópicas hipofisarias y, consecuentemente, de las hormonas producidas por glándulas dependientes de ella, la administración de corticoides mejoraría en parte el estado endocrino del animal y posiblemente la síntesis de proteínas, con lo que el tiroides podrá responder más eficazmente a un mismo estímulo de TSH.

En la actualidad, creemos que el medio más eficaz para el estudio de posibles sinergismos entre TSH y otras hormonas como GH, ACTH y corticoides a nivel de respuesta ponderal del tiroides, sería el de usar ratas hipofisectomizadas y las hormonas purificadas, estudio que pensamos realizar en un futuro inmediato.

V - CAPTACION Y METABOLIZACION DEL I¹³¹ POR EL TIROIDES A DISTINTAS HORAS DEL DIA.

La acción de los glucocorticoides sobre la función tiroidea ha sido objeto de una intensa investigación. Pero debido a los distintos y aun contradictorios resultados encontrados, la acción de los corticoides sobre la glándula tiroidea y el mecanismo por el que lo realiza son aun desconocidos.

Los trabajos de Berson y Yalow (1952) y de Ingbar (1953) concluyen que la disminución de la función tiroidea, medida por la captación de I¹³¹, en animales tratados con corticoides, no parece depender de los niveles de TSH, ya que ratas hipofisectomizadas tratadas con TSH exógeno, acumulan menos I¹³¹ en sus tiroides por la administración de corticoides. Se ha sugerido que la acción de esta hormona disminuyendo la captación tiroidea de I¹³¹ puede explicarse por un aumento de la excreción renal del yodo (Ingbar, 1953).

Sin embargo esta explicación no excluye la posibilidad de que los corticoides ejerzan un efecto directo o quizás a través de otro (s) mecanismo (s) sobre la función tiroidea.

A pesar de los muchos trabajos realizados sobre este campo, no existe en la literatura demasiada información sobre los cambios inducidos por los corticoides sobre el metabolismo intratiroideo del yodo. Y por otra parte, la mayoría de ellos se han realizado administrando a los animales dosis farmacológicas

de corticoides, lo que parece absurdo, ya que el interés en el estudio de las interrelaciones entre las adrenales y tiroides, nació de las alteraciones observadas en los niveles plasmáticos de las hormonas producidas por dichas glándulas, en situaciones de frío o stres, en donde los niveles de corticoides en plasma alcanzan valores de 30 a 60 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ (Ducommun y cols., 1966).

Debido a esta última consideración fue por lo que creímos de interés estudiar la captación de I^{131} y su metabolismo a distintas horas del día, en donde es sabido hay diferencias en los niveles endógenos de corticosterona en ratas (Allen, 1967).

Al objeto de estimular la función tiroidea y poder evidenciar diferencias a corto tiempo en el metabolismo intratiroideo del iodo, los animales estuvieron previamente sometidos a una dieta de bajo contenido en iodo.

Nosotros hemos encontrado que en estos animales, la dosis de I^{131} inyectada a las 6 de la tarde es más rápidamente metabolizada que la inyectada a las 8 de la mañana. Encontramos diferencias estadísticamente significativas en la captación tiroidea a las 3 y 5 horas, y en su incorporación a iodotirosinas* y iodo-tironinas*, así como una disminución del I^{-*} , en los primeros tiempos estudiados después de la administración del I^{131} (Tabla 24).

El cociente $\text{MIT}^*/\text{DIT}^*$ es menor en los animales inyectados a las 6 de la tarde que en los de las 8 de la mañana, como consecuencia de una disminución y de un aumento en los por

cientos de MIT* y DIT*, respectivamente. Estos cambios en los por cientos de iodotirosinas* parecen indicar una estimulación del paso de éstas hacia la formación de iodotironinas*. El cociente T_3^*/T_4^* fue significativamente mayor a las 3 y 5 horas en los animales inyectados con I^{131} por la tarde que en los inyectados por la mañana, lo que significa que los tiroides de los animales del primer grupo están más intensamente estimulados que los del segundo.

Por otra parte, el PBI¹³¹ del plasma presenta valores significativamente más altos en los animales inyectados con I^{131} durante el periodo considerado como de mayor actividad en los roedores, por la tarde, que en los inyectados en el periodo de menor actividad, por la mañana.

Los datos presentados evidencian que el I^{131} es metabolizado más lentamente durante el periodo de luz que durante el de oscuridad. Estos datos en cierto modo concuerdan con los obtenidos por Puntriano y Meites (1951), aunque en una situación diferente. Ellos estudian el tamaño del bocio inducido por PTU y la captación tiroidea del I^{131} en ratones sometidos a luz o oscuridad durante un periodo de 28 días. Encuentran que los animales sometidos a luz continua, presentan una respuesta ponderal tiroidea al tratamiento con PTU y una captación del I^{131} menor que los ratones mantenidos a continua oscuridad, por el mismo periodo de tiempo.

Queda por explicar como la luz o oscuridad, o la diferencia de actividad entre ambos periodos, influyen la función

tiroidea de las ratas. Varias interpretaciones parecen posibles.

a) La luz, a través de la estimulación que produce en los ojos, envía impulsos nerviosos a la hipófisis anterior que podrían disminuir la secreción de tirotropina. En ausencia de luz, en la oscuridad, desaparecería esta acción inhibidora sobre la secreción de tirotropina.

Es sabido que la FSH (hormona estimulante del folículo) y el TSH se sintetizan en la adenohipófisis, por el mismo tipo de células, por las basófilas (Severinghaus, 1939). Si el primer efecto de la luz es aumentar la secreción de FSH por la adenohipófisis, el efecto secundario podría ser una disminución de la síntesis de TSH hipofisaria. Contrariamente en la oscuridad, la síntesis de FSH estaría reducida, lo que permitiría un mayor aumento en la síntesis de tirotropina (Puntriano y Meites, 1951).

Sin embargo, esta hipótesis de Puntriano y Meites no parece evidente. Bakke y Lawrence (1965) han estudiado las variaciones circadianas de TSH en plasma de ratas tratadas con tiouracilos, encontrando que los niveles de hormona tirotrópica en plasma son de 0,16 mU/ml a las 6 horas, y aumentan a partir de este momento hasta valores igualmente altos, no significativamente diferentes, entre las 9 y 18 horas. Dichos resultados parecen que se confirman en experimentos preliminares, realizados en nuestro laboratorio por la Dra. García por radioinmunometodo, sobre las variaciones de los niveles de TSH a lo largo del día.

b) Se sabe que el metabolismo del yodo en el tiroides, en gran parte está bajo control autónomo, independiente de los niveles de TSH, lo cual se ha demostrado en ratas hipofisectomizadas (Studer y Greer, 1965; Studer y Greer, 1968; VanderLaan y Caplan, 1954). Y se regula a través de un mecanismo desconocido, dependiendo de la concentración total de yodo en tiroides.

Sin embargo, ésta no parece que pueda ser la explicación al hecho encontrado por nosotros de que, el I^{131} inyectado por la tarde sea más rápidamente metabolizado por el tiroides de ratas que el inyectado por la mañana, ya que el contenido del yodo total intratiroideo no presenta diferencias entre los dos tiempos considerados, e incluso en un experimento posteriormente realizado, se ha encontrado que en los animales sacrificados por la tarde, tenían un contenido de yodo en tiroides superior al de los sacrificados por la mañana.

c) Nosotros encontramos en nuestros grupos experimentales, variaciones en los niveles plasmáticos de PBI a lo largo del día, de acuerdo con los encontrados en los de TSH por Bakke y Lawrence (1965). Los valores del PBI en plasma de los animales sacrificados entre las 17 y 21 horas, son significativamente inferiores a los de los restantes tiempos (Fig. 29). Y dado que el yodo total plasmático guarda una estrecha correlación con los valores del PBI, cabe suponer que el contenido total de yodo en plasma de los animales sacrificados por la tarde sea, igualmente que el PBI, menor que en aquellos sacrificados

por la mañana, con lo cual la dosis de I^{131} inyectada por la tarde tendría una dilución isotópica menor que el inyectado por la mañana. Entonces es posible que la diferencia en las actividades específicas del I^{131} entre los dos grupos, pueda justificar la diferencia encontrada entre las captaciones tiroideas.

Sin embargo, parece cuestionable que las diferencias en el por ciento de captación tiroidea encontrada entre ambos grupos, a las 3 y 5 horas, del 22 y 19 %, respectivamente, puedan ser justificadas por las variaciones en el PBI plasmático de $0,96 \pm 0,06$ y $0,80 \pm 0,9$ a las 8 de la mañana y 7 de la tarde, respectivamente (Fig. 29).

d) Por último hemos de considerar la posibilidad de que el aumento de los niveles plasmáticos de corticosterona en la oscuridad, periodo de máxima actividad en el que los roedores hacen más ejercicio y toman más comida, respecto al periodo de luz (Allen, 1967), estimulen la acción del TSH sobre el metabolismo intratiroideo del iodo. Kobayaski y Greer (1971) han encontrado que la administración de cortisona a ratas cuya función tiroidea había sido estimulada con PTU, en un tratamiento previo al periodo en que administraron el corticoides, estimuló significativamente la captación tiroidea de I^{131} , así como los cocientes MIT^k/DIT^k

y T_3^*/T_4^* . Análogos resultados han sido obtenidos por la administración de cortisona en ratas, sometidas a una dieta pobre en iodo durante 1 ó 2 semanas (Kajihara, 1967). Por otra parte Rosenberg (1970) ha encontrado que la administración de 800 μ g de cortisol a ratas hipofisectomizadas aumentó la captación tiroidea de I^{131} a las 24 horas, y McHugh y Yatvin (1969) similarmente han encontrado, que la administración de cortisona a ratas hipofisectomizadas, estimulaba la captación del I^{131} , expresada por mg de tejido tiroideo.

Experimentos posteriormente realizados a la finalización de la parte experimental de la presente tesis, han demostrado que la administración de 100 μ g de corticosterona a ratas hipofisectomizadas tratadas con una sólo dosis de TSH, no afectó la captación tiroidea a las 4 ó 9 horas, pero sí la estimuló a las 24 horas, produciendo un aumento, aunque no significativo, en los cocientes MIT^*/DIT^* y T_3^*/T_4^* , a los tres tiempos citados y un aumento muy significativo del PBI^{131} en plasma, cuya significatividad aumentó con el tiempo, siendo los valores de p entre dichos grupos: a las 4 horas $<0,05$; a las 9 horas $<0,01$ y a las 24 horas $<0,001$, lo que hace pensar que la acción de la corticosterona sea quizás a través de aumentar la vida media del TSH.

El conjunto de resultados y el hecho de que los animales adrenalectomizados tengan un metabolismo intratiroideo del iodo más bajo que el animal intacto, hace pensar en la importancia de los corticoides sobre la función tiroidea, y sugieren que esta acción de los glucocorticoides, al menos en parte, no está mediada

por cambios en la secreción hipofisaria de TSH o por el aumento que producen en la excreción renal del iodo. Nuestra hipótesis es que su acción quizás sea ejercida a través de aumentar la vida media del TSH. Yatvin (1966) ha sugerido que la acción de la cortisona sobre el contenido de proteínas del tiroides, de ratas tratadas con PTU, puede ser debido a que estos animales tienen un menor catabolismo proteico frente al de sus controles.

CONCLUSIONES:

CONCLUSIONES

A - Acción bociogénica del PTU frente al ClO_4K .

En la realización experimental de la presente tesis, confirmando los resultados de Alexander y Wolff (1966) y Jolín y cols. (1968), hemos encontrado que: Las ratas tratadas con PTU desarrollan bocios de mucho mayor tamaño que las de ClO_4K , mientras que los animales que reciben ambas drogas, desarrollan un bocio de tamaño intermedio al inducido por cada una de ellas aisladamente. Estas diferencias en la capacidad bociogénica del PTU, ClO_4K y PTU + ClO_4K no puede justificarse por los habituales índices de la función tiroidea, ya que los tres grupos de animales no presentan diferencias en el contenido de iodo en tiroides, o en los niveles plasmáticos de PBI ó TSH. Asimismo, el contenido de hormona de crecimiento en hipófisis, parámetro muy sensible a los niveles de hormonas tiroideas circulantes, no presenta diferencias entre los grupos de animales considerados. Este hecho, planteado por vez primera en la literatura por Alexander y Wolff, era muy extraño, pues existía la creencia de una proporcionalidad entre el tamaño de los bocios y los niveles de TSH en plasma, tanto que, en la literatura antigua, se tomaba como índice del nivel de TSH circulante el tamaño de los bocios.

B - Niveles de insulina en ratas tratadas con PTU ó ClO_4K .

De acuerdo con resultados anteriores (Jolín y cols.,

1970), de todos los parámetros medidos, sólo hemos encontrado diferencias en los niveles de insulina circulante de los grupos de animales a PTU con respecto a los tratados con ClO_4K . Es decir, las ratas tratadas con PTU, que desarrollan grandes bocios, mantienen niveles de insulina circulante estadísticamente superiores a los de los animales tratados con ClO_4K , que desarrollan bocios pequeños, existiendo, además, una correlación positiva entre el peso individual del tiroides frente a los niveles de insulina en el plasma de dichos animales.

Como era lógico esperar de estos resultados, la administración de insulina a ratas tratadas con drogas que producen bocios pequeños y mantienen niveles de insulina en plasma bajos, indujo un aumento en el peso del tiroides de estos animales. Este hecho tenía lugar sin que se produjeran alteraciones en los niveles de TSH circulante. Por tanto, la administración de insulina induce un aumento en la respuesta ponderal del tiroides a los altos niveles de TSH de las ratas tratadas con antitiroideos.

Experimentos realizados anteriormente (Jolín y cols., 1970) parecían indicar que esta acción de la insulina no era directa sobre el tiroides, sino que era ejercida a través de algún mecanismo indirecto. Esta suposición estaba basada en los siguientes hechos:

- 1) El efecto de la insulina es dependiente del grado de hipotiroidismo de los animales. Si el tratamiento con insulina se iniciaba en animales que estaban sólo ligeramente hipotiroideos, y que tenían un contenido de GH en hipófisis del 80 % del de los controles de su

misma edad, se obtenía un aumento en el peso del tiroides estadísticamente significativo. Si el tratamiento con insulina se iniciaba en ratas con un hipotiroidismo medio, y que tenían un contenido en GH en hipófisis del 50 % del de sus controles, se obtenía asimismo, un aumento en el peso del tiroides estadísticamente significativo, pero menor que en el caso anterior. Por último, si las ratas estaban intensamente hipotiroideas, con un contenido de GH hipofisario menor del 5 % del de sus controles, la administración de insulina no inducía ningún efecto en el peso del tiroides.

2) En ratas ligeramente hipotiroideas, la administración de glucosa isotónica junto con insulina, impidió el efecto de esta hormona sobre el peso del tiroides.

De estos resultados se concluyó: a) para que la insulina aumente la respuesta ponderal del tiroides a los altos niveles de TSH, se requiere la presencia de una hipófisis funcionante, capaz de sintetizar y segregar también otras hormonas además del TSH; esta capacidad está muy reducida o prácticamente anulada al aumentar el grado de hipotiroidismo de los animales y bajar consecuentemente los niveles de hormonas tiroideas circulantes; b) que la acción de la insulina es ejercida a través de su efecto hipoglucémico, ya que se impide cuando se administra junto con glucosa.

En apoyo de las anteriores hipótesis, está el hecho de que no siempre los bocios mayores van acompañados de altos ni-

veles de insulina, ni a éstos les corresponden los mayores pesos del tiroides. Así por ejemplo, en el presente trabajo los animales adrenalectomizados que reciben PTU tienen los tiroides de mucho menor tamaño que los de los animales intactos al mismo bociógeno. Sin embargo, en los primeros los niveles de insulina son significativamente más altos que los de los segundos. Asimismo, la administración de corticoides aumenta los niveles de insulina y el peso de los tiroides en animales a ClO_4K , mientras que en ratas a PTU el aumento del peso del tiroides inducido por corticoides, no va acompañado de aumento de los niveles de insulina plasmática.

De todos estos resultados experimentales se concluyó (Jolín y cols., 1971) que la acción de la insulina aumentando la respuesta ponderal del tiroides a los altos niveles de TSH de ratas tratadas con antitiroideos estaba medida por alguna hormona (s) o factor (es) hipofisario, o por hormonas producidas por glándulas dependientes de la hipófisis. Las hormonas hipofisarias que más probablemente podían estar implicadas en el mecanismo por el que la insulina ejercía esta acción son la GH y el ACTH, bien directamente o a través del aumento que produce en los niveles plasmáticos de corticoides. Como es sabido, tras la hipoglucemia se produce una descarga de corticotropina (ACTH) y de hormona de crecimiento (GH), aunque esto no está claramente demostrado en roedores. Si tras la hipoglucemia hay un aumento de los niveles de ACTH, ello produciría un estímulo sobre las adrenales y como consecuencia un aumento de los niveles de corticoides. Por esta razón fue acometido el estudio de una posible acción del ACTH y corticoides sobre la función tiroidea.

C - Efecto de la adrenalectomía sobre el bocio inducido por PTU ó ClO_4K .

Estudiamos la acción de varios bociógenos en animales adrenalectomizados, ya que en esta situación conseguíamos por una parte evitar la posible participación de los glucocorticoides en la bociogénesis, y por otra mantener niveles endógenos de ACTH elevados a lo largo de todo el periodo de experimentación, ya que siendo este relativamente corto, de unos 12 días, el hipotiroidismo no sería tan intenso como para afectar a los niveles endógenos de ACTH (Eisenberg y cols., 1972).

Encontramos que, las ratas adrenalectomizadas mantenidas con una dieta de bajo contenido en iodo y tratadas con anti-tiroideos como PTU, ClO_4K ó PTU + ClO_4K , desarrollan un bocio de tamaño significativamente menor que en el de los animales intactos que reciben las mismas drogas. Es decir, la acción bociogénica de estas drogas anti-tiroideas está disminuida en animales adrenalectomizados. Sin embargo, ambos grupos de animales, intactos y adrenalectomizados, no presentan diferencias en el contenido de iodo en tiroides, en los niveles plasmáticos de PBI o TSH, ni el contenido de GH en hipófisis, que pudiera justificar las diferencias encontradas en el peso del tiroides entre animales adrenalectomizados e intactos. Parecía, pues, que podría deberse a los altos niveles de ACTH, o a la ausencia de corticoides.

La administración de 3 U de TSH a ratas intactas tratadas con PTU indujo un aumento del peso del tiroides de es-

tos animales. Sin embargo, esta misma dosis de TSH no tuvo efecto sobre el peso del tiroides de ratas adrenalectomizadas tratadas con el mismo antitiroideo. Resumiendo estos resultados podemos decir que, bien en presencia de elevados niveles de ACTH bien en ausencia de glucocorticoides, la respuesta ponderal del tiroides a niveles altos de TSH está disminuida.

Por otra parte, la administración de 500 μ g de corticosterona/rata/día a ratas adrenalectomizadas tratadas con PTU revirtió el peso del tiroides hacia el valor encontrado en animales intactos que recibían dicho antitiroideo. De lo que se deduce que, la administración de 500 μ g de corticosterona/rata/día a ratas adrenalectomizadas, permite que éstas respondan al TSH con igual intensidad de acción que los animales intactos.

Esto parece señalar la necesidad, más que de la existencia de altos niveles de ACTH, de la presencia de glucocorticoides para que la respuesta ponderal del tiroides a altos niveles de TSH, endógeno o exógeno, sea máxima.

El hecho repetidamente observado de que la administración de ClO_4K disminuye la capacidad bociogénica del PTU en ratas intactas (Alexander y Wolff, 1966; Jolín y cols., 1968, 1970), no se observó en animales adrenalectomizados. Las ratas adrenalectomizadas tratadas con PTU, ClO_4K o PTU + ClO_4K , con igual grado de hipotiroidismo, desarrollan bocios de igual tamaño. La adrenalectomía, por tanto, iguala la capacidad bociogénica del PTU ClO_4K y PTU + ClO_4K .

D - Efecto de la insulina sobre el peso del tiroides de ratas adrenalectomizadas tratadas con antitiroideos.

La administración de insulina a ratas intactas tratadas con antitiroideos produce un aumento en el peso del tiroides de estos animales. Este hecho, es importante señalarlo, tenía lugar sin que se produjeran cambios en los niveles de TSH.

Cuando quisimos estudiar la acción de la insulina sobre el peso del tiroides de animales adrenalectomizados encontramos:

1) Las ratas adrenalectomizadas no soportaban la dosis de 0,2 U de insulina/rata/día, que era perfectamente soportable en los animales intactos, por lo cual tuvimos que realizar este experimento administrando 0,05 U de insulina/rata/día, tanto a animales adrenalectomizados como a los intactos.

2) La administración de insulina a ratas adrenalectomizadas tratadas con antitiroideos, no tuvo ningún efecto sobre el peso del tiroides de estos animales.

Experimentos posteriores a la realización de la parte experimental de la presente tesis, han demostrado que la administración de insulina tampoco tenía efecto en animales adrenalectomizados tratados con 100 μ g de corticosterona/rata/día. Por otra parte, animales intactos que recibieron 100 μ g de dexametasona, 5 ó 10 minutos antes de la administración de insulina, ésta no tuvo efecto sobre el tamaño del bocio inducido por ClO_4K .

De estos hechos concluimos que: en ratas adrenalectomizadas o intactas tratadas con dexametasona, al haberse impedido la descarga de glucocorticoides tras la acción hipoglucémica de la insulina, ésta no tiene efecto sobre el peso del tiroides de animales tratados con antitiroideos.

Estos experimentos parecen indicar que el mecanismo por el que la insulina aumenta la respuesta ponderal del tiroides a los niveles de TSH puede ser: la insulina por su acción hipoglucémica baja los niveles de glucosa, lo que induce un aumento en la secreción de ACTH y consecuentemente un aumento de los niveles de glucocorticoides circulantes, y estos ser responsables de la aumentada respuesta ponderal del tiroides a los niveles de TSH.

Para comprobar experimentalmente ésto, era importante estudiar la acción de los glucocorticoides sobre el peso del tiroides de ratas tratadas con antitiroideos.

E - Efecto de los glucocorticoides sobre el peso del tiroides de ratas tratadas con antitiroideos.

El estudio de la acción de los glucocorticoides sobre la función tiroidea presentaba un doble interés. Por una parte, investigar si ellos podían ser un paso en el mecanismo por el que la insulina estimula la respuesta ponderal del tiroides a los altos niveles de TSH de las ratas tratadas con antitiroideos, y por otra, intentar aclarar la acción de estas hormonas sobre la función ti-

roidea. Este problema se ha planteado en la literatura, en la que se han descrito resultados muy distintos e incluso contradictorios, debido principalmente a que se han usado muy distintas situaciones experimentales. De estas las que más llaman la atención es que apenas se han realizado trabajos con corticosterona, que es el corticoides con más importancia fisiológica en roedores, y que se han empleado dosis muy altas, muy por encima de los posibles niveles fisiológicos.

La administración de corticosterona, en dosis de 200 $\mu\text{g}/\text{rata}/\text{día}$, aumentó el peso del tiroides inducido por el tratamiento con PTU o ClO_4K . Es de mucho interés señalar, que esta acción de la corticosterona, análogamente a la de la insulina, tiene lugar sin que se produzcan alteraciones en el contenido de iodo en tiroides, o en los niveles plasmáticos de PBI o TSH. Este hecho parece indicar que la acción de la corticosterona es aumentar la respuesta ponderal del tiroides al TSH.

Otro glucocorticoides, la hidrocortisona, es asimismo, capaz de inducir análogos resultados. La administración de 150 μg de hidrocortisona a ratas tratadas con PTU, ClO_4K , MMI o SCNK indujo bocios más grandes que los observados con cada uno de estos bociógenos aisladamente. O sea, la acción de la corticosterona sobre el peso del tiroides de animales tratados con antitiroideos puede extenderse a la hidrocortisona, y no es dependiente de la acción de un determinado bociógeno, sino que es extensible a los antitiroideos citados.

Los datos presentados demuestran claramente que los

corticoides juegan un papel importante en el peso del tiroides de ratas a bociógenos. Sin embargo, nos encontramos ante la imposibilidad de concluir si se trata de un efecto directo de los corticoides sobre el peso del tiroides, o están implicados otras hormonas o metabolitos. Como se ve en el presente trabajo, tanto la administración de corticoides como la adrenalectomía, van acompañadas de alteraciones de otras hormonas y metabolitos en plasma y tejido. Cualquiera de estos cambios, u otros que no hemos medido, podría ser la causa directa de los cambios observados en el peso del tiroides.

Para intentar aclarar el mecanismo por el que los glucocorticoides estimulan la respuesta ponderal del tiroides al TSH, estudio que pensamos realizar en un futuro inmediato, usaremos ratas hipofisectomizadas tratadas con TSH y corticoides aislada o conjuntamente.

F - Efecto de la adrenalectomía y de la corticosterona sobre el metabolismo intratiroideo de I¹³¹.

La adrenalectomía y la administración de corticosterona tienen efectos opuestos sobre el metabolismo intratiroideo del I¹³¹.

En los animales adrenalectomizados, tanto la captación del I¹³¹ como su organificación es más lenta que en el intacto. Esto puede deberse a la carencia de glucocorticoides directamente, o ser consecuencia de que en ausencia de estas hormonas el metabolismo energético está disminuido.

Por el contrario, la administración de corticosterona

a animales tratados con PTU aumentó significativamente la proporción relativa de todos los iodoaminoácidos tiroideos, a la vez que disminuyó el contenido de radioiodo en forma de I^- . El cociente MIT^*/DIT^* disminuyó en los grupos tratados con corticoides, índice de aumento de la ulterior iodación de la MIT^* a DIT^* . Simultáneamente, la proporción de radioiodo transformado en hormona ($T_4^* \downarrow T_3^*$) aumentó ligera pero significativamente en el tratamiento con corticosterona. Estos hechos nos hacen concluir que la administración de corticosterona aumenta tanto la captación tiroidea del I^{131} como su metabolización.

G - Metabolización del I^{131} por el tiroides a distintas horas del día.

En un intento de estudiar la acción de la corticosterona, dentro de los niveles fisiológicos sobre el metabolismo intratiroideo del I^{131} , se investigó este problema a distintas horas de un mismo día, en las cuales es conocido (Allen y Kendall, 1967), hay cambios en los niveles fisiológicos de estas hormonas. Encontramos que el I^{131} inyectado a las 8 de la mañana se metaboliza más lentamente que el inyectado a las 5 de la tarde, observándose diferencias significativas tanto en la captación tiroidea de I^{131} , en su organificación, como en la secreción de los iodoaminoácidos marcados.

Estas diferencias en el metabolismo intratiroideo del I^{131} entre los periodos de luz y oscuridad, no puede explicarse por diferencias en los niveles de TSH, que eran iguales.

Nuestro parecer es que, el aumento de los niveles endógenos de corticoides que ocurre alrededor de las 6 de la tarde en roedores, sea la causa de la activación del tejido tiroideo en cuanto al metabolismo del iodo.

Aunque este supuesto no se puede tomar como conclusión, si podemos decir que: el aumento de los niveles endógenos de corticoides durante las horas de oscuridad, periodo de máxima actividad en roedores, no impide el mayor metabolismo intra-tiroideo del iodo observado en este tiempo.

Resumiendo, creemos que los glucocorticoides, directa o indirectamente, juegan un importante papel en la mayor o menor respuesta ponderal del tiroides a altos niveles de TSH.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

- Adams, D.D. y Purves, H.D. "Thyrotrophin assay by plasma I¹³¹ measurements". *Canad. J. Biochem.* 35, 993, 1957.
- Albert, A., Tenney, A. y Ford, E. "The effect of cortisone and corticotropin on the biologic decay of thyroïdal radioiodine". *Endocrinology* 50, 324, 1952.
- Alexander, W.D. y Wolff, J. "Thyroidal iodine transport.VIII. Relation between transport, goitrogenic and antigoitrogenic properties of certain anion". *Endocrinology* 78, 481, 1966.
- Allen, C. y Kendall, J.W. "Maduration of the circadian rhythm of plasma corticosterone in the rat". *Endocrinology* 80, 926, 1967.
- Anbar, M., Guttman, S. y Lewitus, Z. "Effect of several anions on the iodide uptake by the thyroid gland". *Nature* 183, 1517, 1959, a.
- Anbar, M., Guttman, S. y Lewitus, Z. "The mode of action of perchlorate ions on the iodine uptake of the thyroid gland". *Inst.J. Appl. Radiation* 7, 87, 1959, b.
- Arkin, H. y Colton, R.R. "Statistical Methods". Barnes y Noble, Inc. New York, 1967
- Aron, M., Cauelaert, C., van y Stahl, J. "L'equilibre entre l'hormone préhypophysaire et l'hormone thyroïdienne dans le milieu interieur a l'etat normal et a l'etat pathologique". *C.R. Soc. Biol. (Paris)* 107, 64, 1931.

- Astwood, E.B. "Mechanism of action of antithyroid compounds"
J. Pharmacol. 78, 79, 1943.
- Bakke, J. y Lawrence, N. "Circadian periodicity in thyroid stimulating hormone titer in the rat hypophysis and serum".
Metabolism 14, 841, 1965.
- Benotti, J. y Benotti, N. "Protein bound iodine, total iodine and butanol extractable iodine by partial automation". Clin. Chem. 9, 408, 1963.
- Berson, S.A. y Yalow, R.S. "The effect of cortisone on the iodine accumulating function of the thyroid in euthyroid subjects".
J. Clin. Endocr. & Metab. 12, 407, 1952.
- Bondy, P.K. y Hagewood, M.D. "Effect of stress and cortisone on plasma protein bound iodine and thyroxine metabolism in rats". Proc. Soc. Exp. Biol. & Med. 81, 328, 1952.
- Brown-Grant, K. "The effect of ACTH and adrenal-steroids on thyroid activity with observations on the adrenal-thyroid relationship". J. Physiol., London 131, 58, 1956.
- Brown-Grant, K. "Extrathyroidal iodide concentrating mechanism".
Physiol. Rev. 41, 189, 1961.
- Catz, B., El-Rawi, I., Geiger, E. y Starr, P. "Differences in the effect of cortisone, compound F, and ACTH on the thyroid as revealed by microhistometry". J. Clin. Endocr. & Metab. 13, 878, 1953.
- Clarke, J.T. "Simplified "disc" (polyacrylamide gel) electrophoresis". Ann. N.Y. Acad. Sci. 121, 428, 1964.
- Contopoulos, A.N. y Koneff, A.A. "Pituitary hormone production

- and release in the thyroidectomized rat after thyroxine administration". *Acta endocrinologica (Kobenhavn)* 42, 275, 1963.
- Cheymol, J., Delsol, M. y Pazin, M. "Actions ponderables et histologiques de la cortisone et d'un antithyroidien au niveau de l'hypophyse et de la thyroïde chez de rat blanc". *Compt. Rend. Soc. Biol.* 146, 985, 1952.
 - DiAngelo, S.A., Stevens, C.E., Paschkis, K.E. y Cantarow, A. "Influence of cortisone on thyroid-pituitary interaction in normal and goitrous rats". *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.* 83, 181, 1953.
 - Davis, B.J. "Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum protein". *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 121, 404, 1964.
 - Dobyns, B.M. and Steelman, S.L. "The thyroid stimulating hormone of the anterior pituitary as distinct from the exophthalmos producing substance". *Endocrinology* 52, 705, 1953.
 - Ducommun, P., Sakiz, E. y Guillemin, R. "Dissociation of the acute secretions of thyrotropin and adrenocorticotropin". *Am. J. Physiol.* 6, 1257, 1966.
 - Duyk, C. "Lack of correlation between body weight and corticosterone secretion in the rat". *Endocrinology*, 75, 822, 1964.
 - * - Escobar del Rey, F., Morreale de Escobar, G., Jolín, T. y López-Quijada, C. "Effects of small doses of thyroid hormones on thyroid weight in hypothyroid rats". *Endocrinology*, 83, 41, 1968.
 - Evans, E.S., Simpson, M.E. y Evans, H.M. "The role of
.....

* Eisenberg y cols. (1972). Ver final Bibliografía.

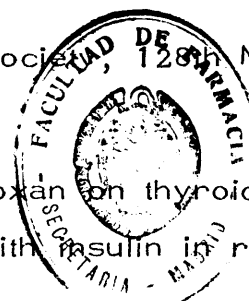
- growth hormone in calorigenesis and thyroid function". *Endocrinology* 63, 836, 1958.
- Evans, E.S., Rosemberg, L.L. y Simpson, M.E. "Relative sensitivity of different biological response to thyrosine". *Endocrinology* 66, 433, 1960.
 - Evans, E.S., Rosemberg, L.L., Evans A.B. y Koneff, A.A. "Relative sensitivity of different biological response to small quantities of thyroxine and thriiodothyronine". *Endocrinology* 74, 770, 1963.
 - Evans, E.S., Rosemberg, L.L., Evans, A.B. y Koneff, A.A. "Relative sensitive of different biological response to small quantities of thyroxine and triiodo-thyronine". *Endocrinology* 74, 770, 1964.
 - Fawcett, D.M. y Kirkwood, S. "The mechanism of the antithyroid action of iodide ion and of the aromatic thyroid inhibitors". *J. Biol. Chem.* 204, 787, 1953.
 - Fregly, M.J., Baker, M.I. y Gennaro, J.F. "Comparison of effects of thyroidectomy with propylthiouracil treatment on renal hypertension in rats". *American J. Physiol.* 198, 4, 1960.
 - Fregly, M.J. y Tailor, R.E. "Effect of thyroxine on intake and loss sodium by propylthiouracil-treated rats". *Endocrinology* 75, 27, 1964.
 - Freinkel, N. e Ingbar, S. "Effect of metabolism inhibitors upon iodide transport in sheep thyroid slices". *J. Clin. Endocr.* 15, 598, 1955.
 - Gabrilove, J.L., Dorrance, W. R. y Soffer, L.J. "Effect of corticotropin, cortisone and desoxicorticosterone on thyroid weight of the

- goitrogen-treated rat". *Am. J. Physiol.* 169, 565, 1952.
- García, M.D. y Morreale de Escobar, G. "Essai radioimmunologique et essai de McKenzie pour TSH de rats". *Abst. 6th International Thyroid Conference, Vienna, 1970.*
 - García, M.D., Cacicedo, L. y Morreale de Escobar, G. "Radioimmunoassays for rat TSH". *Abstracts of the 4th Meeting of the European Thyroid Association, Berna, 1971.*
 - Glick, S.M. "In Ganong, W.F. and L. Martini (Eds.), *Frontiers in Neuroendocrinology*, Oxford University Press, 1969, p. 141.
 - Green, J.D. and Harris, G.W. "The neurovascular link between the neurohypophysis and adenohypophysis". *J. Endocr.* 5, 136, 1947.
 - Greenwood, A.C. y Hunter, W.M. "The preparation of ¹³¹I-labelled human growth hormone of high specific radioactivity". *Biochem. J.* 89, 114, 1963.
 - Greer, M.A. "Evidence of hypothalamic control of the pituitary release of thyrotropin". *Proc. Soc. Exp. Biol. (N.Y.)* 77, 603, 1951.
 - Greer, M.A. "The role of the hypothalamus in the control of thyroid function". *J. Clin. Endocr. & Metab.* 12, 1259, 1952.
 - Greer, M.A. y Erwin, H. "The location of the hypothalamic area controlling the secretion of thyrotropin by the pituitary". *J. Clin. Invest.* 33, 983, 1954.
 - Greer, M.A. "The influence of the central nervous system on the control of thyrotropin secretion". In *Ciba Foundation Colloquia of Endocrinology* 10, 34, 1956, Londres.

- Griesbach, W.E. y Purves, H.D. "The significance of the basophil changes in the pituitary accompanying various forms of thyroxine deficiency". Brit. J. Exp. Pathol. 26, 13, 1945.
- Gorbman, A. y Bern, A.A. "A textbook of comparative Endocrinology". John Wiley & sons, New York, 1962, 160.
- Gudernatsch, J.F. "Feeding experiments on tadpoles. II. A further contribution to the knowledge of organs with internal secretions". Amer J. Anat. 15, 431, 1913.
- Hales, C.N. y Randle, P.J. "Immunoassay of insulin with insulin-antibody precipitate". Biochem. J. 88, 137, 1963.
- Halmi, N.S. y Barker, S.B. "Histological effects of cortisone on rat pituitary and thyroid". Endocrinology 51, 127, 1952.
- Halmi, N.S., Bogdanove, E. M., Spirtos, B.N. y Lipner, H.J. "The influence of cortisone on the iodide concentrating mechanism of the rat thyroid". Endocrinology 52, 233, 1953.
- Halmi, N.S. y Spirtos, B.N. "Analysis of the action of propylthiouracil on the pituitary-thyroid axis of rats". Endocrinology, 55, 613, 1955.
- Halmi, N.S., Stuelke, R.G. y Schenell, M.D. "Radioiodide in the thyroid and in other organs of rats treated with large doses of perchlorate". Endocrinology 58, 634, 1956.
- Halmi, N.S. "Thyroidal iodide transport". Vitam. and Horm. 19, 133, 1961.
- Harris, G.W. "Neural control of the pituitary gland". Physiol. Rev. 28, 139, 1948.
- Harris, G.W. y Woods, J.W. "Hypothalamus-pituitary-thyroid rela-

- tionships". Ciba Found. Collq. Endocrinol. 10, 3, 1957.
- Hill, S.R., Reis, R.S. Forsman, P.H. y Thorn, G.W. "The effect of adrenocorticotropin and cortisone on thyroid function: thyroid-adrenocortical interrelationships". J. Clin. Endocr. 10, 1375, 1950.
 - Hodges, J.R. y Vernikos-Danellis. "Pituitary and blood corticotropin changes in adrenalectomized rats maintained on physiological doses of corticosteroids". Acta Endocrinologica 39, 79, 1962.
 - Hoskins, R.G. "The thyroid-pituitary apparatus as a servo(feed-back) mechanism". J. Clin. Endocr. 49, 1429, 1949.
 - Houssay, B.A. "The hypophyseal growth hormone nature and action". Smith R.W., Jr., Grabler, O.H. and Long, C.N.H. eds. Blakiston Division, McGraw, Hill, New York, 1955, p. 300.
 - Hugget, A.St.G. y Nixon, D.A. "Use of glucose, peroxidase and o-dianisidine in determination of blood and urinary glucose". Lancet 2, 368, 1957.
 - Ingbar, S.H. "The effect of cortisone on the thyroidal and renal metabolism of iodine". Endocrinology 53, 171, 1953.
 - Ingbar, S.H. y Freinkel, N. "ACTH, cortisone and the metabolism of iodine". Metabolism 5, 652, 1956.
 - Johnson, T.B. y Tewsburry, Jr. L.B. "The oxidation of 3-5 diiodo-tyrosine to thyroxine". Proc. Anat. Acad. Sci. (Wash) 28, 73, 1942.
 - Jolín, T., Morreale de Escobar, G., y Escobar del Rey, F. "6-propyl-2-thiouracil vs. KClO_4 induced goiters". Endocrinology 83, 620, 1968.

- Jolín, T., Morreale de Escobar, G. y Escobar del Rey, F.
"Differential effects in the rat of thyroidectomy, propyl-thiouracil and other goitrogens on plasma insulin and thyroid weight". *Endocrinology* 87, 99, 1970.
- Jones, A.E., Fisher, J.N., Lewis, V.J. y Vanderlaan, W.P.
"Electrophoretic comparison of pituitary gland from male and female rats". *Endocrinology* 76, 578, 1965.
- Kajihara, A. "Program of the regional Meeting of the West Loast Division of comparative endocrinology, 1967, (Abstract).
- Katz, S.H., Dhariwal, A.P.S. y McCann, S.M. "Effect of hypoglycemia on the content of pituitary growth hormone (GH) and hypothalamic growth hormone-releasing factor (GHRF) in the rat". *Endocrinology* 81, 233, 1967.
- Keston, A.S. Abstracts American Chemical Society, 128th Meeting, 31C, 1956.
- Kimaresan, P. y Turner, C.W. "Effect of alloxan on thyroid hormone secretion rate and replacement therapy with insulin in rat" *Endocrinology* 79, 828, 1966.
- Kirschner, L., Krintz, L., Merrill, P. y Rawson, R.W. "Effects of adrenal and gonadal products on the weight and radioiodine uptake of the thyroid gland in the rat". *J. Clin. Endocrinol.* 10, 1282, 1950.
- Kobayashki, I. y Greer, M.A. "Paradoxical stimulation of thyroid function by cortisone in the rat". *Endocrinology* 89, 1499, 1971.
- Kraicer, J. y Logethetopoulos, J. "Adrenal cortical response to insulin-induced hypoglycemia in rats". *Acta Endocrinologica (Kobenhavn)* 44, 282, 1963.



- Krulich, L. y McCann, S.M. "Effect of alterations in blood sugar on pituitary growth hormone content in the rat". *Endocrinology* 78, 759, 1966, a.
- Krulich, L. y McCann, S.N. "Influence of stress on the growth hormone (GH) content of the pituitary of the rat". *Proc. Soc. Exp. Biol. Med. (N.Y.)* 122, 612, 1966, b.
- Lazo-Wasen, E.A. "Pituitary ACTH levels during adrenal involution following thiouracil". *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 103, 300, 1960.
- Lederer, J. "Influence de la cortisone sur la fonction thyreotrope de la hypophyse du rat éthyroïdé". *Ann. Endocrinol.* 13, 58, 1952.
- Lemarchand-Beraud, Th. y Vannotti, A. "Radioimmunoassay of human plasma TSH". In Cassano, C. y M. Andreoli (eds) "Current Topics in Thyroid Research" Academic Press, New York, p.527, 1965, a.
- Lemarchand-Beraud, Th. y Vannotti, A. "A radioimmunoassay for the determination of thyroid stimulating hormone". *Experientia* 21, 353, 1965, b.
- Levit, T. "The thyroid", E. and S. Livingstone, Ltd. Edimburgh and London, p, 35, 1954.
- Lewis, V.J., Cheever, E.V. y VanderLaan, W.P. "Alteration of the protein of the pituitary gland by estradiol and cortisol". *Endocrinology* 76, 362, 1965.
- Ljunggren, J.G. "On the action of peroxidase on 3-5-diiodothyrosine". *Acta Chem. Scand.* 11, 1072, 1957.
- Maayan, M.L. "Effect of growth hormone and thyrotropin upon deio-

- dination of diiodothyronine by hypophysectomized rat thyroid and liver". *Endocrinology* 78, 471, 1966.
- McKenzie, C.G. "Differentiation of the anti-thyroid action of thiouracil, thiourea and PABA from sulfonamides by iodide administration". *Endocrinology* 40, 127, 1947.
 - Mayberry, W.E. y Astwood, E.B. "The effect of propyl-thiouracil on the intrathyroid metabolism of iodine in rat". *J. Biol. Chem.* 275, 2977, 1960.
 - McHugh, W.B. y Yatvin, M.B. "Effects of cortisone on thyroidal iodine uptake in hypophysectomized, nephrectomized rats". *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 131, 1417, 1969.
 - Migeon, C.J., Gardner, L.I., Crigler, J.F. y Wilkins, L. "Effects of cortisone treatment for 28 days on radio-iodine metabolism in normal and adrenalectomized rats maintained with desoxicorticosterone". *Endocrinology* 5, 117, 1952.
 - Money, W.L., Kraitsz, L., Fager, J., Kirschner, L. y Rawson, R.W. "The effect of various steroids on the collection of radioactive iodine by the thyroid gland of the rat". *Endocrinology* 48, 682, 1951.
 - Moore, F.J., Cramer, F.B. y Knowels, R.C. "Statistics for Medical Students". The Blakiston Co. New York, 1951.
 - Morreale de Escobar, G., Llorente, P., Jolin, T. y Escobar del Rey, F. "The transient instability of thyroxine and its biochemical applications". *Biochem. J.* 88, 526, 1963.
 - Müller, E.E., D. Miedico, Giustina, G. and Pecile, A. "Growth hormone immunological and biological assays in pituitary of rat under different experimental conditions". *Experientia* 25, 1146, 1969.

- Nataff, B.M., Rivera, E.N. y Chaikoff, I.L. "Role of thyrotropic hormone in iodine metabolism of embryonic rat thyroid glands in organ cultures". *Endocrinology* 76, 35, 1965.
- Nataff, B.M. "Fetal rat thyroid gland in organ culture". *Gen. Comp. Endocr.* 10, 159, 1968.
- O'Neal, L.W. y Heinbeker, P. "Failure of cortisone to influence thyroid function". *Endocrinology* 53, 239, 1953.
- Pastan, I. "Certain functions of isolated thyroid cells". *Endocrinology* 68, 924, 1963.
- Perry, W.F. "The action of cortisone and ACTH on thyroid function". *Endocrinology* 49, 284, 1951.
- Pitt-Rivers, R. "Some factors that affect thyroid hormones synthesis". *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 86, 362, 1960.
- Puntriano, G. y Meites, J. "The effect of continuous light or darkness on thyroid function in mice". *Endocrinology* 48, 217, 1951.
- Purves, H.D. "Control of the thyroid function". In *The thyroid gland*, vol. 2, 1964 (ed. R. Pitt-Rivers and W.R. Trotter).
- Purves, H.D. en "The Thyroid Gland", R. Pitt-Rivers y W.D. Trotter (eds), Butterworths, London, vol. 2, p. 1, 1964
- Rawson, M.S. y Money, W. L. "Physiologic reactions of the thyroid stimulating hormone". *Recent Progr. Hormone Res.* 4, 397, 1949.
- Remington, R.E. y H. Levine. "Studies on the relation of diet to goiter". *The J. Nutrition* 11, 343, 1936.
- Remington, R.E. "Improved growth in rats on iodine deficient diets". *J. Nutrition* 13, 223, 1937.

- Rose, S. y Nelson, J. "Goitrogenic action of propylthiouracil". Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci. 34, 105, 1956.
- Rosemberg, I.N. "The antithyroid activity of some compounds that inhibit peroxidase". Science 116, 503, 1952.
- Rosemberg, L.L., Golman, M. y Laroche, G. "Possible sources of serious error in determining I^{131} distribution in iodoamino acids of thyroidal protein". Federation Proc. vol. 23, nº 2, 239, 1964.
- Rosemberg, L.L. "Program of the Sixth International Thyroid Conference" p. 120, 1970.
- Sakiz, E. y Guillemin, R. "Inverse effects of purified hypothalamic TRF on the acute secretion of TSH and ACTH". Endocrinology 77, 797, 1965.
- Screebny, L.M., Kraus, B.S. y Wanamaker, B. "The effect of propylthiouracil on exocrine glands". Endocrinology 70, 24, 1962.
- Schachner, H., Franklin, A.L. y Chaikoff, L.L. "On the in vitro accumulation of inorganic iodide by surviving thyroid tissue with radioactive iodine as indicator". Endocrinology 34, 159, 1944.
- Schalch, D.S. y Reichlin, S. "Plasma growth hormone concentration in the rat determined by radioimmunoassay: Influence of sex, pregnancy, lactation, anesthesia, hypophysectomy and extrasellar pituitary transplants". Endocrinology 79, 275, 1966.
- Schooley, R.A., Fiedkin, S. y Evans, E.S. "Re-examination of the discrepancy between acidophil numbers and growth hormone concentration in the anterior pituitary gland following thyroidectomy". Endocrinology 79, 1053, 1966.

- Sellers, E.A. y Schönbaum, E. "Goitrogenic action of thyroxine administered with propylthiouracil". *Acta Endocrinologica* (Kobenhavn) 40, 39, 1962.
- Sellers, E.A. y Schönbaum, E. "Further studies on the goitrogenic action of thyroxine administered with propylthiouracil, methimazole or perchlorate". *Acta Endocrinologica* (Kobenhavn) 49, 319, 1965.
- Serif, G.S. y Sihotang, K. "Thyroid iodine metabolism in the alloxanized rat". *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 109, 950, 1962.
- Severinghaus, A.E. Cap. XIX in Allen, *Sex and Internal secretions*. Williams and Wilkins Co., Baltimore, 1939.
- Slingerland, D.W. "The influence of various factors on the uptake of iodine by the thyroid". *J. Clin. Endocr.* 15, 131, 1955.
- Smith, P.E. y Smith, I.P. "The repair and activation of the thyroid in the hypophysectomized tadpole by the parenteral administration of fresh anterior lobe of bovine hypophysis". *J. Med. Res.* 43, 267, 1922.
- Smith, P.E. "Ablation and transplantation of hypophysis in the rat". *Anat. Rec.* 32, 221, 1926.
- Snedecor, G.W. "Statistical Methods". Applies to experiment in Agriculture and Biology. The Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA, p. 65, 1956.
- Snedecor, G.W. "Statistical Methods". Applied to experiments in Agriculture and Biology. The Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA, p. 122, 1956.
- Sols, A. y de la Fuente, G. "Glucosa oxidasa en análisis". Re-

- vista Española de Fisiología 13, 231, 1957.
- Somogyi, M. "Determination of blood sugar". J. Biol. Chem. 160, 69, 1936.
 - Steinetz, B.G. y Beach, V.L. "Some influences of thyroid on the pituitary-adrenal axis". Endocrinology, 72, 45, 1963.
 - Studer, H. y Greer, M.A. "A study of the mechanism involved in the production of iodine-deficiency goiter". Acta Endocrinologica 49, 610, 1965.
 - Studer, H. y Greer, M.A. "The regulation of thyroid function in iodine deficiency". Second (English) edition, Hans Huber, Bern y Stuttgart, 1968.
 - Taurog, A., Chaikoff, I.L. y Feller, D.D. "The mechanism of iodine concentration by the thyroid gland. Its non-organic iodine-binding capacity in the normal and propyl-thiouracil treated rats". J. Biol. Chem. 171, 189, 1947.
 - Toi, K., Salvatore, G. y Cahman, J. "Non-enzymatic synthesis of thyroxine residues in the thyroglobulin". Biochim. Biophys. Acta (Amst.) 78, 805, 1963.
 - Tong, W. y Chaikoff, I.L. "Hydrolysis of I¹³¹-thyroprotein by pancreatic enzymes". J. Biol. Chem. 232, 939, 1958.
 - Tong, W., Kerkof, P. and Chaikoff, I.L. "Utilization of I¹³¹ by isolated thyroid cells". Abstract, 60, Proc. 44th Meet. Endocr. Soc. Chicago, Illinois, June 21, 23, 1962.
 - Tong, W., Raghupathy, E. y Chaikoff, I.L. "Recovery from thyroid protein hydrolyzed with pancreatic and bacterial proteases". Endocrinology 72, 931, 1963.

- Vanderlaan, W.P. y Caplan, R. "Observations on a relationship between total thyroid iodine content and the iodide-concentrating mechanism of the thyroid gland of the rat". *Endocrinology* 54, 437, 1954.
- Van Middlesworth, L y Berry, M.M. "Iodine metabolism during anoxia, nephrectomy, trauma, avitaminoses and starvation in the rat". *Am. J. Physiol.* 167, 576, 1951.
- Wilber, J.F. y Utiger, R. "Immunoassay studies of thyrotropin in rat, pituitary gland and serum". *Endocrinology* 81, 145, 1967.
- Wolff, J., Chaikoff, I.L., Taurog, A. y Rubin, L. "The disturbance in iodine metabolism produced by thiocyanate: the mechanism of its goitrogenic action with radioactive iodine as indicator". *Endocrinology* 39, 140, 1946.
- Wolfson, W.A., Beierwaltes, W.H., Robison, W.P., Duff, I.F., Jones, J.R. Knorpp, C.T. y Eya, M. "Corticogenic hypothyroidism: Its regular occurrence and clinical significance during prolonged therapeutic administration of ACTH and cortisone". *J. Lab. & Clin. Med.* 36, 1005, 1950.
- Wollman, S. H. "Nature of the inhibition by thiocyanate of the iodide concentration mechanism of the thyroid gland". *Amer. J. Physiol.* 186, 453, 1956.
- Woodburry, D.M., Ghosh, B.N. y Sayers, G. "Modification of TSH action by ACTH and cortisone in hypophysectomized rat". *J. Clin. Endocr. & Metab.* 11, 761, 1951.
- Wyngaarden, J.B., Wright, B.M. y Ways, P. "The effect of certain anion upon the accumulation and retention of iodide by the thyroid gland". *Endocrinology* 50, 537, 1952.

- Yatvin, M.B. y Wannemacher, R.W. "Action of adrenal corticoid on protein metabolism in the thiouracil-treated rats". *Endocrinology* 76, 418, 1965.
- Yatvin, M.B., Wannemacher, R.W. y Brown, N.V. "Effect of cortisone on thyroid protein metabolism in euthyroid and thiouracil-treated rats". *Endocrinology* 79, 1079, 1966.
- * - Eisenberg, R.M., Sorrentino, S., Jr., y Knigge, K.M. "Effects of cold exposure on plasma growth hormone in the adrenalectomized and thyroparathyroidectomized rat". *Neuroendocrinology* 9, 58, 1972.