

NIVELES SÉRICOS DE TETRAYODOTIRONINA LIBRE (T₄ L), MEDIANTE EL MÉTODO DE ELECTROQUIMIOLUMINISCENCIA EN CANINOS.

**Free tetraiodothyronine (FT₄) serum levels by electrochemiluminescence
method in canines.**

Ginés Fernando Ramírez Benavides^{1*} y José Henry Osorio²

¹ Departamento de salud animal, Hospital Veterinario, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Caldas. Manizales. Colombia. *E-mail: gines.ramirez@ucaldas.edu.co. ² Departamento de Ciencias Básicas. Laboratorio de Enfermedades Metabólicas, Facultad de Ciencias para la Salud. Universidad de Caldas. Manizales. Colombia.

RESUMEN

El presente estudio establece valores de referencia para niveles séricos de tetrayodotironina libre (T₄L) en caninos mediante el método de electroquimioluminiscencia. Se utilizaron 180 caninos que fueron divididos en grupos según la edad y el sexo. Se encontraron diferencias altamente significativas (P<0,0001) relacionadas con la edad, sin encontrarse diferencias significativas con respecto al sexo para dicha hormona. Los resultados de este estudio sugieren que las concentraciones séricas de tetrayodotironina libre (ng/L) en caninos menores de 1 año, de 1 a 7 años y mayores de 7 años, oscilan entre 9,90-11,74 ng/L, 8,51-11,74 ng/L y 7,48-8,64 ng/L, respectivamente. La determinación de T₄L mediante electroquimioluminiscencia, puede considerarse útil como ayuda diagnóstica de posibles alteraciones tiroideas.

Palabras clave: Canino, electroquimioluminiscencia, hormonas tiroideas.

ABSTRACT

The present study establishes references values for free Tetraiodothyronine (FT₄) in canines using electrochemiluminescence method. Blood samples from 180 canines divided in six groups of age (males and females), 30 animals for each group were used. Significant differences (P<0.0001) was found between age groups but not between sex groups. The canine average values for FT₄ using this technique were as follow: younger than 1 year of age, 9.9 – 11.7 ng/L; from 1 to 7 years of age, 8.1 – 11.7 ng/L; older than 7 years of age 7.4- 8.6 ng/L. The electrochemilumines-

cence method for measuring FT₄ is valuable diagnostic tool in canine medicine.

Key words: Canine, electrochemiluminescence, thyroid hormones.

INTRODUCCIÓN

La glándula tiroidea fue descrita como entidad anatómica en 1656 por Wharton [1,3] y la denominó *glandulae thyroidae*; pero hasta 1915 no se aisló la sustancia activa, tiroxina, por Kendall [4,5, 18]. En 1926, Harrington estableció la estructura química de la tiroxina [7, 17]; a partir de entonces se han ido determinando los pasos sucesivos de su biogénesis, que comienza con la yodación del aminoácido tirosina y que termina en la tiroxina [7, 14]. El aumento de volumen de la tiroidea en animales con deficiencia de yodo ha servido durante largo tiempo como ejemplo clásico para el estudio de hipertrofia de un órgano para compensar deficiencias de un material nutritivo hasta el restablecimiento del equilibrio normal. Dicha hipertrofia compensadora (bocio ó struma) [8] ha sido reconocida desde tiempos remotos, pues se cita en el papiro de Ebers (cuando menos 1500 años antes de Jesucristo). El advenimiento del yodo radiactivo estimuló enormemente las investigaciones sobre la función tiroidea. Desde entonces, el número de trabajos dedicados a la glándula tiroidea iguala o supera a los llevados a cabo sobre cualquier otra glándula endocrina [23]. La función principal de la glándula tiroidea consiste en acumular yodo y fijarlo al aminoácido tirosina para formar las hormonas tiroideas bajo el control de la adenohipófisis mediante la secreción de tirotrófina u hormona estimulante de la tiroidea (TSH) [13]. La formación de dichas hormonas está regulada por un sistema de retroalimentación o *feed-back* negativo, a través

de la respuesta coordinada del eje hipotalámico-pituitario-tiroideo [9]. La hormona liberadora de TSH (HLT o TRH) se une a la célula tirotrófica de la hipófisis y estimula la secreción de tirotrópina (HET o TSH) que se une a la membrana celular folicular y estimula la síntesis y secreción de la hormona tiroidea. Cuando se producen aumentos séricos de las hormonas tiroideas, se disminuye la producción de TSH desde la glándula pituitaria [18]. Luego de ser transportado activamente hasta el interior de la tiroides, el yodo es oxidado e incorporado dentro de la molécula de tiroglobulina (660000 Da) la cual posteriormente sufre proteólisis para producir T_3 y T_4 [21], la tiroglobulina contiene aproximadamente 140 moléculas de tirosina [19]. Mediante un proceso oxidativo, el yodo es incorporado a la tirosina, después de que ésta se une a la tiroglobulina [9]; esta unión del yodo a la tirosina requiere la presencia de tiroperoxidasa (TPO) proteína que necesita peróxido de hidrógeno como agente oxidante y a la que Cunningham describe como una enzima clave en la biosíntesis de las hormonas tiroideas, ya que ésta cataliza la formación de las hormonas tiroideas [9]. Sin la presencia de la TPO, el yodo inorgánico no puede convertirse en yodo organificado y tampoco pueden producirse las hormonas tiroideas [1]. El acoplamiento de una o dos moléculas de yodo a la tirosina produce la monoiodotirosina (T_1) o diiodotirosina (T_2). La unión de dos moléculas de T_2 , dará origen a la tetrayodotironina (T_4) y el de una molécula de T_1 y otra de T_2 , formará la T_3 o triyodotironina [12]. La función tiroidea está regulada por la "hormona estimulante de la tiroides" TSH, una hormona glicoprotéica e hidrosoluble, con un peso molecular de 28.000 a 30.000 Daltons producida y secretada por las células tirotrópicas adenohipofisarias [16]. La principal función de la TSH es estimular el desarrollo de la glándula tiroidea, que aumenta su tamaño e incrementa su vascularización. La glándula tiroides produce entonces principalmente, la (T_3) triyodotironina, la (T_4) tetrayodotironina y la calcitonina [18]; las dos primeras hormonas según Bilezikian mantienen el normal funcionamiento de variados órganos y sistemas, entre los que se destacan el sistema nervioso central, el circulatorio, el digestivo y el hematopoyético [7]. También regulan la expresión génica, la diferenciación de los tejidos, el desarrollo general, también estimulan la oxidación de las grasas (lo que pone de manifiesto la pérdida de condición corporal), además de ser reconocidas por su importancia en la regulación general del metabolismo basal debido a la estimulación de la utilización del oxígeno [6, 18]. La T_4 es usualmente la única hormona evaluada ya que la medición de T_3 es menos confiable y no ofrece ventajas sobre la T_4 . [19]. En los últimos años, la evaluación de la función endocrina ha presentado un avance extraordinario. La introducción del radioinmunoensayo y técnicas relacionadas (Quimioluminiscencia y Electroquimioluminiscencia) han permitido medios altamente específicos y sensitivos para medir hormonas en suero, plasma, leche y otros líquidos corporales. Los inmunoensayos han ayudado a aumentar el conocimiento de eventos endocrinos y metabólicos que ocurren durante el estrés, enfermedades, ciclos reproductivos, crecimiento y desarrollo [11]. Grandes avances se han realizado en el diagnóstico veterinario desde la introducción del radioinmunoanálisis en 1959 [25]; hoy la electroquimioluminiscen-

cia provee la seguridad, sensibilidad, rapidez y menor costo requeridos [4]. La Quimioluminiscencia (QL) se define como la emisión de radiación electromagnética producida por una reacción química. Cuando esta emisión proviene de organismos vivos o sistemas derivados de ellos, se denomina bioluminiscencia. Ambos fenómenos son procesos luminiscentes que se han identificado tradicionalmente mediante un prefijo que identifica la fuente de energía responsable del inicio de la emisión de radiación electromagnética [7]. En estos procesos se generan especies muy reactivas a partir de precursores estables en la superficie de un electrodo. Las especies químicas altamente reactivas formadas, reaccionan entre sí produciendo luz. El desarrollo de inmunoensayos basados en ECL se fundamenta en el uso de un complejo de rutenio y de tripropilamina (TPA) [25].

El presente trabajo tuvo como objetivo, aportar valores de referencia para la determinación de T_4 en caninos mediante electroquimioluminiscencia, como herramienta diagnóstica de problemas tiroideos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolección de muestras

Se incluyeron en este estudio un total de 180 caninos (*Canis familiaris*) que se seleccionaron en forma aleatoria [15] y sin discriminación de tamaño, raza y alimentación. A cada paciente se le realizó un examen clínico y fueron seleccionados animales clínicamente sanos, los cuales no estuvieran recibiendo medicamentos que pudieran alterar la función tiroidea. Los pacientes fueron divididos en grupos conformados de acuerdo a la edad y al sexo de la siguiente manera: 30 machos menores de 1 año y 30 hembras menores de 1 año; 30 machos entre 1 y 7 años y 30 hembras entre 1 y 7 años; y 30 machos mayores de 7 años y 30 hembras mayores de 7 años.

Fueron obtenidas muestras de sangre (5 mL) por venopunción y se depositaron en tubos estériles sin anticoagulante debidamente rotulados. Posteriormente fueron centrifugadas las muestras a 3500 rpm, durante 5 minutos para la obtención de los sueros y se conservaron a -20°C hasta el momento del análisis.

Procesamiento de las muestras

Las concentraciones séricas de T_4 L en caninos fueron medidas mediante el kit comercial Elecsys® T_4 reagent (Roche, Bogotá), el equipo utilizado fue el Elecsys 2010 de la casa comercial BioVeris (EUA).

Análisis estadístico

Una vez obtenida la media, la mediana, la desviación estándar y el intervalo para cada uno de los grupos, se realizó la comparación estadística, mediante la prueba de Tukey para lograr establecer si había diferencia significativa en los niveles de la hormona en cuanto a edad y sexo [15].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el presente estudio fueron obtenidos valores de referencia para T₄L en sangre de caninos, utilizando la técnica de electroquimioluminiscencia (TABLA I). No se encontró diferencia significativa entre los sexos de los diferentes grupos, sin embargo fue observada diferencia significativa (P<0,0001) al comparar el grupo de perros mayores de 7 años con respecto a los otros grupos de edad.

El organismo no utiliza directamente las hormonas que la tiroides produce. Utiliza las hormonas que se producen en el fraccionamiento de la tiroglobulina; pasan por tanto a la sangre la T₄ y la T₃ y estas moléculas, que son hormonalmente activas, se unen a la proteína transportadora de compuestos yodados (PBI). En este caso, la mayor parte de la T₄ y la T₃ circulan en sangre en su forma ligada a la proteína (99%), y sólo una proporción muy pequeña en su forma libre (1%) [10]. En los perros, la cantidad de hormona libre que circula en el plasma es un poco menor del 1% para T₄ y ligeramente mayor del 1% para T₃, debiéndose esto a una menor afinidad entre las proteínas conjugadoras del plasma y las hormonas tiroideas en el plasma canino [9]. Las hormonas T₄ y T₃ que circulan sin ligar, se denominan T₄-Libre (T₄L) y T₃-Libre (T₃L). Esta fracción mínima constituye las auténticas hormonas activas [18]. La fracción de las hormonas tiroideas que circulan ligadas a proteínas sirve como reservorio y de esta manera cuando sea necesario, el organismo abastece de T₃ y T₄ a la circulación [19]. Existen 2 patrones ontogénicos distintos en las concentraciones circulantes de triyodotironina T₃ y tetrayodotironina T₄ entre los mamíferos. En los mamíferos precoces, las concentraciones circulantes de T₃ y T₄ se incrementan durante el desarrollo fetal, alcanzan el pico inmediatamente después del nacimiento, y declinan posteriormente. En contraste, en las demás especies, las concentraciones circulantes de T₃ y T₄, continúan incrementando durante el desarrollo postnatal y alcanzan el pico después del nacimiento [20, 22].

En el presente trabajo, el intervalo en los niveles de T₄ L para cada uno de los grupos fue calculado con base en la fórmula

la propuesta por Murray Spiegel [2,15]. Las concentraciones séricas de tetrayodotironina en los perros menores de 1 año fluctúan entre 9,90-11,74 ng/L; en perros entre 1 y 7 años los niveles fluctúan entre 8,51-11,74 ng/L; y en perros de 7 años en adelante, dichos niveles se encuentran entre 7,48-8,64 ng/L.

Nelson y Couto [24] afirmaron que, mediante el empleo de kits de radioinmunoanálisis, los valores de T₄ L superiores a 10ng/L son compatibles con eutiroidismo. Los resultados del presente estudio por electroquimioluminiscencia, muestran valores similares a los reportados por estos autores [24], observándose sin embargo, valores significativamente bajos en caninos mayores de siete años de edad, lo que puede explicarse de acuerdo al postulado de Ettinger y Feldman [10], quienes señalan la existencia de una ligera disminución de la hormona de casi 0,1 µg/dL al año. Debido a una reducción del contenido y secreción hipotalámica basales de TRH, cuya síntesis y liberación está modulada por las hormonas tiroideas y mediada por un mecanismo noradrenérgico (NA) a nivel del hipotálamo.

Con la vejez, se produce un descenso de la función NA y del transporte de T₃ a través de la barrera hematoencefálica, lo cual podría contribuir a la menor producción de TRH [2]. Los valores de tetrayodotironina libre, aportados por el presente trabajo se convierten en una ayuda útil para la clínica canina brindando así mayor precisión en los esquemas terapéuticos relacionados con alteraciones de la función tiroidea.

CONCLUSIONES

Es posible utilizar la técnica de electroquimioluminiscencia para la determinación de T₄L en caninos de diferentes edades. Los valores de referencia aquí aportados, son una herramienta valiosa, para el análisis de las posibles alteraciones relacionadas con el funcionamiento de la glándula tiroidea en caninos. A pesar de no encontrar diferencias significativas relacionadas con el sexo, si es notoria una disminución en los niveles de T₄L en caninos mayores de 7 años de edad.

TABLA I
VALORES OBTENIDOS PARA T₄L MEDIANTE LA TÉCNICA DE ELECTROQUIMOLUMINISCENCIA EN CANINOS (SEIS GRUPOS DE EDAD)/ VALUES OBTAINED FOR FT₄ BY ELECTROCHEMILUMINESCENCE IN CANINES (SIX GROUPS OF AGES)

Grupo	Min. ng / L	Max. ng / L	Media	Mediana	S.D	Intervalo
1	4,7	21,9	10,7	10,4	3,8	9,3 - 12,1
2	6,3	20,2	10,8	9,8	3,5	9,6 - 12,1
3	4,1	18,9	9,3	8,8	3,5	8,0 - 10,6
4	3,1	15,3	9,3	9,1	3,1	8,2 - 10,5
5	5,1	13,1	8,7	8,2	2,4	7,8 - 9,6
6	4,0	10,8	7,3	7,7	1,9	6,6 - 8,0

Abreviaturas: T₄L: tetrayodotironina Libre;1: hembras menores de un año; 2: machos menores de un año; 3: hembras entre uno y siete años; 4: machos entre uno y siete años; 5.: hembras mayores de siete años; 6: machos mayores de siete años; Min: valor mínimo; Max.: valor máximo; ng/L: nanogramos por litro; S,D: desviación estándar.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ADAMS, H. R. Thyroid Drugs and Antithyroid Drugs. **Veterinary Pharmacology and Therapeutics**. 7th Ed. Iowa: H. Richard Adams. 599-64pp. 1995.
- [2] ANANTH, C.V.; KLEINBAUM, D.G. Regression models for ordinal responses: a review of methods and applications. **Int. J. Epidemiol.** 26(6):1323-33. 1997.
- [3] ALVAREZ, A.; FRANCO, A, CACABELOS, R. Sistema Psiconeuroendocrino y envejecimiento. **Anal de Psicol.** 6 (2): 115-146. 1990.
- [4] AVILEZ, R. J. Validación y rangos de referencia de análisis hormonales por electroquimioluminiscencia: testosterona en ovinos – progesterona en ovinos triyodotironina y tiroxina en caninos. Universidad Católica de Temuco. Facultad de Acuicultura y Ciencias Veterinarias. Escuela de Medicina Veterinaria. Chile, 33pp. 2003.
- [5] BAEYENS, W. R.; GARCÍA, A.M. Miniaturización en Quimioluminiscencia: Una interesante alternativa para la determinación analítica de fármacos y compuestos de interés biomédico. 2004. Universidad de Granada. En línea. <http://www.raf.es/pdf/sesiones/sesion>. 29 enero 2004.
- [6] BILEZIKIAN, J.P.; LOEB, J. The influence of hyperthyroidism and hypothyroidism on alpha and beta adrenergic receptor systems and adrenergic responsiveness. **Endocr. Rev.** 4: 378-88. 1983.
- [7] BOOTH, N. H.; MC DONALD, L. E. Farmacología del sistema endocrino. **Farmacología y Terapéutica Veterinaria**: Zaragoza: Acribia, 589-629pp. 1988.
- [8] BUDRAS, K. D; FRICKE, W; SALAZAR, I. Contribución a la Anatomía Funcional y Clínica. **Atlas de Anatomía del Perro**: Madrid: Mc Graw Hill Interamericana, 73-74pp. 1989.
- [9] CUNNINGHAM, J. G. Glándulas Endocrinas y su Función. **Fisiología Veterinaria**. Mc Graw Hill Interamericana, 458-464pp. 1999.
- [10] ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. Enfermedades Hipotiroideas. **Tratado de Medicina Interna Veterinaria**: 4th Ed. Buenos Aires: Interamericana, 1794-1813pp. 1997.
- [11] FELDMAN, E.C.; NELSON, R.W. The thyroid gland. **Canine and feline endocrinology and reproduction**. 2th Ed. Philadelphia, W.B.Saunders. 67-185pp 1996.
- [12] GREENSPÁN, F.S. The Thyroid Gland. **Basic and Clinical Endocrinology, Norwalk**. 160-266pp. 1994.
- [13] GRIFFIN, J. E.; OJEDA, S. R. Endocrine Physiology. **The Thyroid**. 2nd Ed. Oxford: Oxford University Press, 61-74pp. 1992.
- [14] KALLFELZ, F.A. Thyroid function in the dog. **Vet. Clin. North Am.** 7(3):497-512. 1977.
- [15] KLEINBAUM, D.G.; KUPPER, L.L.; MULLER, K.E. Applied regression analysis and other multivariable methods. 2nd Ed. Boston. PWS-Kent. 98-267pp. 1987.
- [16] KUROSUMI, K. Ultrastructural immunocytochemistry of the adenohypophysis in the rat. **J. Electron. Microsc. Tech.** R.19: 42-56. 1991.
- [17] LACOURREYE, O.; WERNER, A. The history of the thyroid gland: diseases and eponyms. **J. Chir. (Paris)**. 144(3):256-7. 2007.
- [18] LEOUTSAKOS, V.A. Short history of the thyroid gland (Athens) **Hormon.** 3(4):268-71. 2004.
- [19] LEIB, M. S.; MONROE, W. E. Diseases of Thyroid Gland. **Practical Small Animal Internal Medicine**. Chap. 47. 2nd Ed. Philadelphia: Saunders Company. 1028-1041pp. 1997.
- [20] MALINOWSKI, K. Age and breed differences in thyroid hormones, Insulin-Like Growth Factor (IGF)-I and IGF Binding Proteins in Female Horses. **J. of Anim Sci.** 74(8):1936-1942. 1996.
- [21] MATAMOROS, R; GOMEZ, C; ANDAUR, M. Hormonas de Utilidad Diagnóstica en Medicina Veterinaria. **Arch. Med. Vet.** 34(2): 167-182. 2002.
- [22] MC DONALD, LD. Glándula tiroides. **Reproducción y Endocrinología Veterinarias**: Cap 3. Interamericana, 38-51pp. 1971.
- [23] MC DONALD, LD. Glándula tiroides. **Reproducción y Endocrinología Veterinarias**. Cap. 3. 4th Ed. Interamericana, 56-71pp. 1991.
- [24] NELSON, R. W.; COUTO, C. Enfermedades de la Glándula Tiroides **Manual de Medicina Interna de Pequeños Animales**. Cap 51. Madrid: Harcourt, 437-454pp. 2000.
- [25] PACINI, F.; PINCHERA, A. Serum and tissue thyroglobulin measurement: clinical applications in thyroid disease. **Biochimie.** 81(5):463-7. 1999.