

**ESTUDIO DE DOSIS CRECIENTES DE YODURO SOBRE FOLICULOS DE
TIROIDES *in vitro***

Mauren Andrea Ortiz Barbosa (0500330)

Anyela María González Rico (0500322)

Directores

Clara Spinel PhD

Universidad Nacional de Colombia

Alejandro Ondo PhD(C)

**Universidad Nacional de Colombia y Université de
Nice Sophia-Antipolis**

UNIVERSIDAD MILITAR NUEVA GRANADA

FACULTAD DE CIENCIAS

PROGRAMA DE BIOLOGÍA APLICADA

BOGOTA D. C.

2009

**ESTUDIO DE DOSIS CRECIENTES DE YODURO SOBRE FOLICULOS DE
TIROIDES *in vitro***

Mauren Andrea Ortiz Barbosa

Anyela María González Rico

TRABAJO DE PREGRADO

Presentado como requisito parcial

Para optar al título de

BIÓLOGO

UNIVERSIDAD MILITAR NUEVA GRANADA

FACULTAD DE CIENCIAS

PROGRAMA DE BIOLOGÍA APLICADA

BOGOTA D. C.

2009

AGRADECIMIENTOS

- A la línea de investigación de cultivos celulares y tridimensionales con y sin matriz extracelular, del grupo de investigación Biofísica y Biología de Membranas del Centro Internacional de Física - CIF y la Universidad Nacional de Colombia, por darnos el apoyo necesario en el desarrollo de nuestro trabajo.
- A la doctora Clara Spinel, por su apoyo incondicional, constante motivación y paciencia en el desarrollo del trabajo.
- A la doctora Marcela Camacho, por sus ideas y apoyo en la realización de este trabajo.
- A Magnolia Herrera, por enseñarnos con tanta dedicación y por su compañía durante todo el proceso.
- A Alejandro Ondo, por su paciencia e ideas para el desarrollo de este trabajo.
- A Frigoríficos Guadalupe, por facilitarnos la adquisición del material necesario.
- A la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia, FIDIC, por permitirnos utilizar sus instalaciones.
- A nuestras familias y amigos, por acompañarnos de forma constante.

TABLA DE CONTENIDO

| | |
|------------------------------------|----|
| LISTA DE FIGURAS..... | 5 |
| 1. INTRODUCCION..... | 6 |
| 2. MARCO TEORICO..... | 9 |
| 3. JUSTIFICACIÓN..... | 28 |
| 4. OBJETIVOS..... | 29 |
| 5. MATERIALES Y METODOS..... | 30 |
| 6. RESULTADOS..... | 39 |
| 7. DISCUSION..... | 52 |
| 8. CONCLUSIONES..... | 58 |
| 9. RECOMENDACIONES..... | 59 |
| 10.REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS..... | 60 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Estructura química de las hormonas tiroideas..... | 6 |
| Figura 2. Glándula Tiroidea..... | 9 |
| Figura 3. Corte histológico de tiroides normal de ratón..... | 11 |
| Figura 4. Esquema Tirocito..... | 12 |
| Figura 5. Efecto Wolff-Chaikoff..... | 17 |
| Figura 6. Cultivo en monocapa..... | 24 |
| Figura 7. Cultivo folículos en suspensión de rata sin TSH durante 3 días..... | 26 |
| Figura 8. Respuesta de folículos cerrados a la TSH..... | 27 |
| Figura 9. Cultivo de folículos de cerdo en suspensión sin TSH..... | 27 |
| Figura 10. Curva de calibración NaI^{125} | 34 |
| Figura 11. Cultivo de folículos de cerdo..... | 39 |
| Figura 12. Experimentos preliminares..... | 40 |
| Figura 13. Cultivo de folículos de cerdo en azul Tripán..... | 41 |
| Figura 14. Folículos en PBS después de medida de captación..... | 42 |
| Figura 15. Medida de Captación y organificación sin NaI | 43 |
| Figura 16. Captación y organificación a 10^{-7}M de NaI^{127} | 44 |
| Figura 17. Captación y organificación a 10^{-3}M de NaI^{127} | 46 |
| Figura 18. Captación de yoduro por los folículos en cultivo..... | 47 |
| Figura 19. Captación y organificación $30\ \mu\text{M}\ \text{ClO}_4^-$ | 48 |
| Figura 20. Captación y organificación 10^{-7}M de NaI^{127} y $30\ \mu\text{M}\ \text{ClO}_4^-$ | 49 |
| Figura 21. Captación y organificación 10^{-3}M de NaI^{127} y $30\ \mu\text{M}\ \text{ClO}_4^-$ | 50 |
| Figura 22. Captación de yoduro por los folículos en cultivo en presencia de $30\ \mu\text{M}$ de perclorato..... | 51 |
| Figura 23. Morfología tiroides de cerdo del Frigorífico Guadalupe..... | 52 |

1. INTRODUCCIÓN

La tiroides es una glándula endocrina, encargada de la síntesis de las hormonas tiroideas: 3,5,3'-triyodo L-tironina (T3) y ,3',5,5'-tetrayodo-L-tironina (T4) (Fig. 1), siendo el yodo inorgánico uno de sus principales componentes (Hapon *et al.*, 2005; Morton y Chaikoff, 1942). La glándula tiroides secreta estas hormonas al torrente sanguíneo donde son transportadas a los distintos tejidos (Wang *et al.*, 2009). Las hormonas tiroideas, en mamíferos, promueven la formación del sistema nervioso y óseo en el feto, y la toma de oxígeno, la regulación de la temperatura corporal y el metabolismo celular en el adulto (Berne y Levy, 1993);. El efecto de las hormonas tiroideas sobre el metabolismo de las proteínas y de los lípidos es de naturaleza bifásica, es decir, a bajas concentraciones fisiológicas son anabólicas y a altas concentraciones son catabólicas (Werner y Ingbar, 1971; Wollman, 1980).

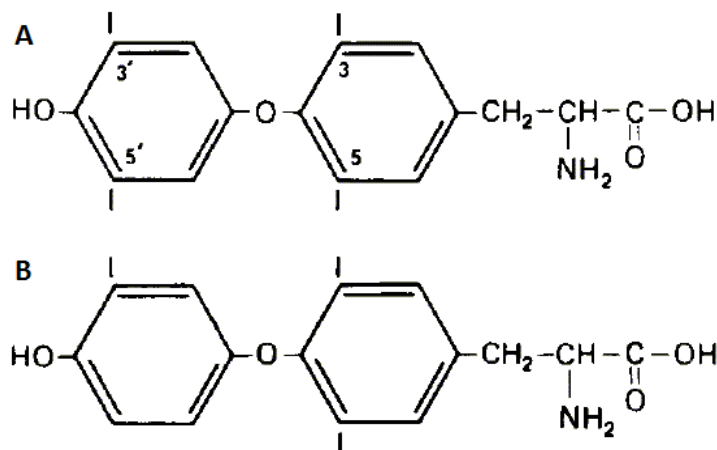


Figura 1. Estructura química de las hormonas tiroideas. A. ,3',5,5'-tetrayodo-L-tironina (T4) y 3,5,3'-triyodo L-tironina (T3).

Tomado de: <http://www.anaesthetist.com/icu/organs/endocr/thyroid/images/t3t4.gif>

La unidad morfológica y funcional de la tiroides es el folículo, estructura compuesta por un epitelio cúbico simple (células denominadas tirocitos) que rodea la cavidad central, donde se almacena el coloide rico en Tiroglobulina (Tg), secretado por los tirocitos (Gartner, 2002).

La función de la glándula tiroides, es regulada por el eje hipotálamo-adenohipófisis. El hipotálamo secreta el factor liberador (TRH) de la hormona tireotrópica (TSH) que estimula en la adenohipófisis la secreción de la TSH, y esta a su vez se une a sus receptores específicos (TSH-R) ubicados en la membrana basolateral de los tirocitos estimulando la secreción de hormonas tiroideas (Weiss *et al.*, 1997).

La síntesis de hormonas tiroideas se lleva a cabo en varias etapas: 1. Síntesis de la Tg en el retículo endoplasmático rugoso (RER), su maduración en el complejo de Golgi y secreción al coloide por vesículas de exocitosis; 2. Captación del yoduro por la membrana basolateral del tirocito; 3. En el coloide, fijación del yoduro sobre la Tg, proceso conocido como organificación del yoduro o PBI (*protein binding iodide*); 4. Endocitosis de la Tg y su degradación en el compartimento lisosomal; 5. la liberación de la T3 y T4 a circulación. La síntesis de las hormonas tiroideas está estrechamente relacionada con la estructura del folículo y la ultra-estructura de los tirocitos (Berne y Levi, 1993).

Una segunda regulación de la glándula depende de la concentración de yoduro en la sangre. A concentraciones altas de yoduro, la tiroides bloquea temporalmente la biosíntesis de hormonas tiroideas; una vez los niveles de yoduro en la sangre disminuyen (vía excretora), la glándula retoma su función normal (Wolff y Chaikoff, 1948).

En la mayoría de cultivos tiroideos se presenta disminución de los organelos implicados en la síntesis de proteínas y la pérdida de polaridad y de la estructura folicular, lo cual lleva a que las funciones de organificación y biosíntesis de hormonas tiroideas no se realicen (Fayet *et al.*, 1982).

Se reporta que folículos cerrados de rata, en cultivo tridimensional con y sin TSH, mantienen la estructura folicular y polaridad del tirocito, y la función de organificación (PBI) y la síntesis de hormonas tiroideas permanece durante 12 días (Spinel *et al.*, 1990). Este experimento fue el primero en demostrar que

folículos *in vitro* se comportan como los folículos de una glándula normal *in vivo* (Spinel *et al.*, 1990). Además demostraron que reproducen el efecto Wolff-Chaikoff de manera homóloga a *in vivo* (Spinel y Yildiz, 1991).

El cultivo tridimensional de folículos sin matriz extracelular, permite mantener la estructura folicular, la ultra-estructura de los tirocitos, la respuesta a la TSH, y conserva la función de captación y organificación durante 12 días (Herrera *et al.*, 2008 y Herrera, 2007).

En el presente trabajo se estudió el comportamiento funcional de folículos cerrados de cerdo, utilizando el modelo de cultivo tridimensional. Este modelo se escogió ya que permite homologar el comportamiento celular *in vivo*, en condiciones de cultivo *in vitro*. Siguiendo este modelo es posible analizar la respuesta fisiológica de los folículos de cerdo a distintas concentraciones de yoduro, la respuesta a la TSH, y determinar si reproduce el efecto Wolff-Chaikoff en cerdo, como fue demostrado *in vitro* e *in vivo* en ratas (Wolf y Chaikoff, 1948).

2. MARCO TEORICO

Morfología de la glándula tiroides.

En mamíferos, la tiroides se encuentra ubicada en la parte anterior del cuello, bajo la laringe por debajo del cartílago cricoides (Fig. 2. A.) con un peso aproximado entre 15 y 25 gramos en humanos adultos. Está conformada por dos lóbulos unidos cada uno en las regiones laterales de la laringe y tráquea respectivamente; un istmo de tejido tiroides une los dos lóbulos a nivel del segundo y tercer anillo cartilaginoso de la tráquea. Puede también darse una porción unilateral la cual se denomina lóbulo piramidal, que se extiende desde el istmo y proviene de una porción del conducto tirogloso (Sidney y Sidney, 1971; Mero, 2001).

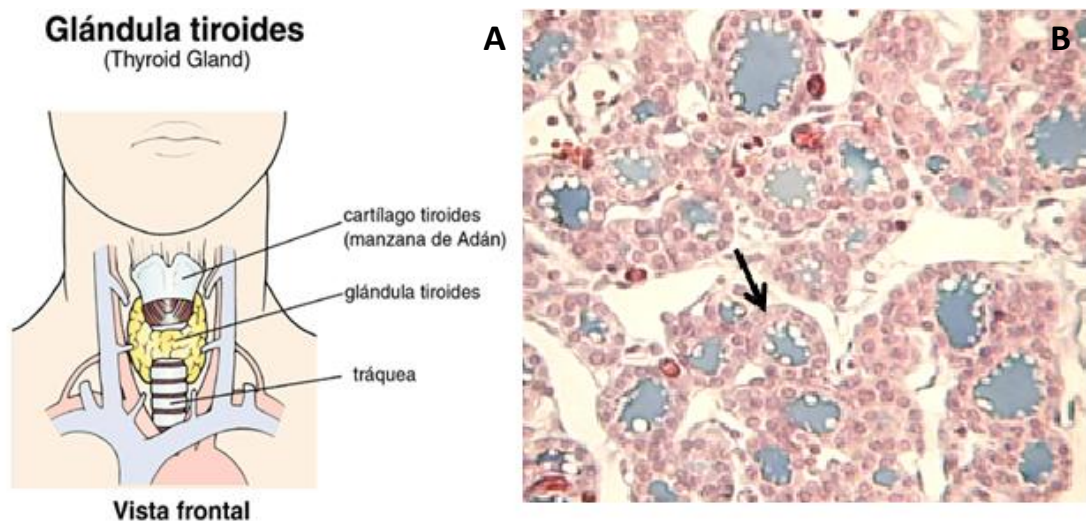


Figura 2. Glándula Tiroidea. A Imagen morfológica de la glándula tiroides en el hombre. Tomado de <http://www.deancare.com/crs/wha/sthyroid.gif> B. Microscopia Óptica de un corte transversal de Tiroides de perro. Aumento 20 X . Flecha indica un folículo cerrado.

La glándula tiroides se encuentra rodeada por dos capsulas, una externa que es una prolongación de la fascia prebranquial, y una interna discontinua (que debe considerarse como la verdadera cápsula de la glándula), formada por tejido conectivo que penetra al interior de la glándula a manera de tabiques incompletos (Werner y Ingbar, 1971) los que proporcionan apoyo y soporte a la gran vascularización e inervación que rodea a los folículos (Gartner y Hiatt, 2002). Con

los vasos sanguíneos corren las fibras simpáticas postganglionarias y vagales en la cápsula, y algunas terminaciones nerviosas llegan directamente a las células foliculares de la tiroides (Wollman, 1980; Mero, 2001).

Estructura folicular y ultraestructura de los tirocitos

El parénquima de la tiroides está constituido principalmente de estructuras ovoides o circulares con un líquido en el centro (0.2-0.9 μm de diámetro), denominados folículos (Fig. 2. B), siendo cada uno de estos la unidad funcional y estructural de la glándula tiroides (Wissig, 1960). Los folículos están rodeados por la membrana basal o lámina basal que se continúa con el tejido conectivo ricamente vascularizado; en la gran mayoría de folículos, la membrana basal está en contacto con la membrana basal de los capilares sanguíneos.

Los folículos que se encuentran en la parte central del lóbulo son más pequeños que los de la periferia en el humano y el ratón, en la rata, los más grandes se ubican cerca del istmo (Wollman 1980). El tamaño en el humano varía entre 50 y 500 μm de diámetro y se sabe que con la edad los folículos tienden a variar de tamaño (Sidney y Sidney, 1971).

El folículo está compuesto por un epitelio cúbico simple que encierra el coloide secretado por las células (tirocitos) (Gartner, 2002) (Fig. 3. A). Las células foliculares presentan una polaridad definida donde la membrana apical está erizada de microvellosidades y se encuentra en contacto con el coloide del folículo y la membrana basal con la lámina basal (Wissig, 1960) (Fig. 3B). La estructura folicular y la polaridad de los tirocitos juegan un papel esencial en el proceso de captación de yodo; y el coloide en su interior, es fundamental en la síntesis de hormonas tiroides (Nobuyuki *et al.*, 1992).

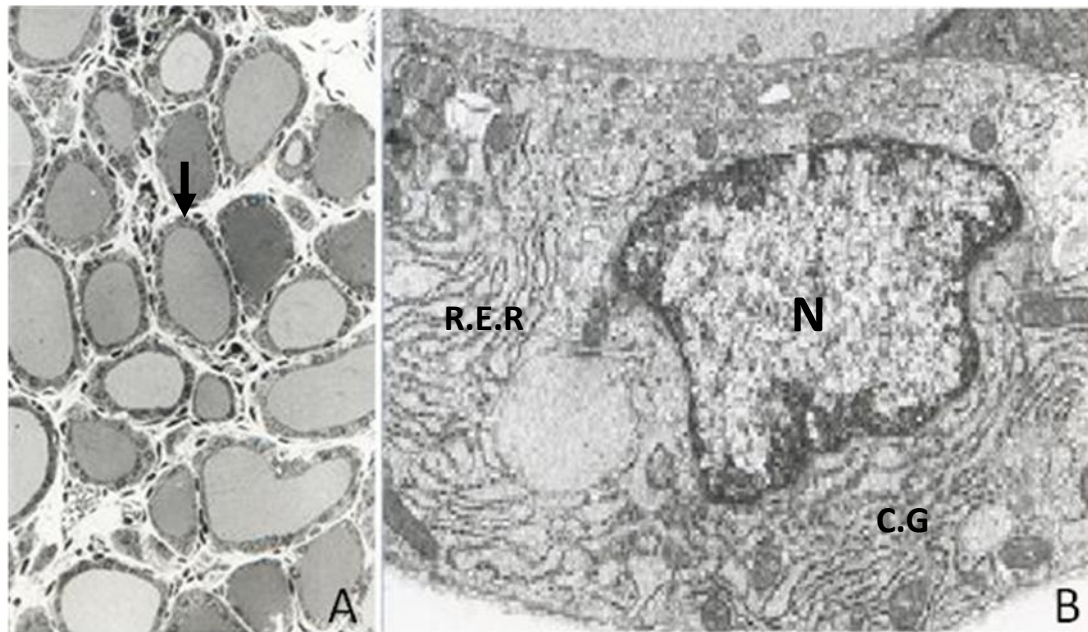


Figura 3. Corte histológico de tiroides normal de ratón **A.** Folículos cerrados (flecha) (MO: azul de Toluidina, 180X) (Many, 1980). **B.** Aspecto de los tirocitos en microscopio electrónico de los folículos de A. Se evidencia abundante retículo endoplasmático rugoso (R.E.R) alrededor del núcleo (N) y el complejo de Golgi (C.G), en la región supranuclear (ME: 17.000X) (Denef, 1980).

La distribución de los organelos en los tirocitos refuerza la polaridad morfológica normal de las células foliculares. El tirocito, en condiciones normales, presenta un retículo endoplasmático rugoso (RER) abundante alrededor del núcleo (Fig. 3. B); generalmente en la región basal de la célula se encuentran polirribosomas o ribosomas libres pero son muy difíciles de identificar por microscopía electrónica convencional. El complejo de Golgi supranuclear, recibe las proteínas sintetizadas en el RER, las proteínas maduras salen del complejo de Golgi en las vesículas de exocitosis que son más densas a los electrones que las vesículas de endocitosis. Las vesículas de exocitosis se fusionan con la membrana apical, exportando el contenido para ser almacenado en el coloide folicular. Los tirocitos poseen múltiples lisosomas y mitocondrias distribuidas en toda la célula (Sidney y Sidney, 1971; Gartner y Hiatt, 2002).

Las células parafoliculares o células claras, denominadas así por presentar una coloración más clara que los tirocitos, provienen de las crestas neurales y se

ubican en la región basal de los folículos y no entran en contacto con el coloide. Aunque son parte del parénquima de la tiroides representan menos del 0.1% del total celular. Estas células pertenecen al sistema neuroendocrino del cuerpo y su función es secretar calcitonina. (Sidney y Sidney, 1971; Gartner 2002 y Hiatt, 2002).

Biosíntesis de hormonas tiroideas

La síntesis y secreción de T3 y T4, son reflejo de la ultra-estructura del tirocito dentro del folículo (Fig. 4).

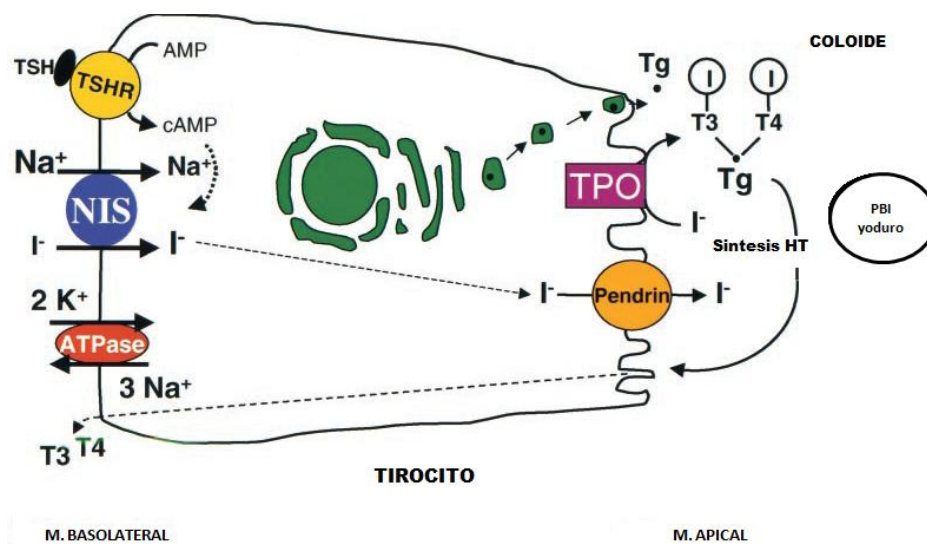


Figura 4. Esquema de un tirocito. Se observa la síntesis y secreción de la tiroglobulina (Tg) al coloide, y su posterior endocitosis del coloide para secretar la **T3** (3,5,3'-triyodo L-tironina) y **T4** (3',5,5'-tetrayodo-L-tironina) a la circulación. Además se ilustra claramente el transporte del yoduro: en la membrana basolateral a través de **NIS** (Cotransportador Sodio/Yoduro) y su posterior paso al coloide a través de la Pendrina, para finalmente ser incorporado a proteínas (organificación del yoduro = **PBI**). La incorporación del yoduro a la **Tg** (Tiroglobulina) es catalizada por la **TPO** (Tiroperoxidasa) mediante la formación de yodotirosinas sobre la Tg. **ATPasa** (bomba de Na^+/K^+), **TSHR** (receptor específico de la Tirotropina), **AMP** (adenosín monofosfato), **cAMP** (adenosín monofosfato cíclico) Modificado a partir de Spitzweg *et al.*, 2001.

Dado que el principal componente de las hormonas tiroideas (T3 y T4) es el yoduro (I^-), incrementos o deficiencias en la cantidad disponible de este en sangre, afecta la síntesis de hormonas tiroideas (Wang *et al.*, 2009). El yoduro es un componente

escaso en el ambiente, es por esto que la captación de éste por parte de la glándula tiroides requiere un mecanismo que permita una alta eficiencia, e igualmente permita conservar el I^- dentro del tejido para la biosíntesis de hormonas (Wang *et al.*, 2009).

Captación y translocación del yoduro (I^-) al coloide

La concentración de yoduro en la glándula tiroides fue reportado por primera vez por Marine y Feiss en 1915. La captación del yoduro en la glándula ocurre en la membrana basal de los tirocitos, por un cotransportador de membrana NIS (*Natrium Iodide Symporter*) (De la vieja *et al.*, 2000) (Fig. 4).

NIS es una glicoproteína de membrana (formada por 643 amino ácidos), con 13 dominios transmembranales y se encuentra ubicada en la membrana basal del tirocito, lo que facilita la concentración de yoduro en éste. La entrada del yoduro a través de NIS requiere la activación de la bomba Sodio – Potasio $3Na^+/2K^-$ ATPasa (presente en la membrana basal del tirocito); ya que los iones de sodio extracelulares que se generan, son utilizados por NIS como gradiente electroquímico para permitir la entrada del yoduro al tirocito en contra de su gradiente (Fig. 4) (Spitzweg *et al.*, 2001).

NIS también presenta afinidad a otras moléculas como es el caso del perclorato (ClO_4^-), el cual es un inhibidor competitivo capaz de bloquear la entrada de yoduro por NIS (Haiyan y Carayanniotis 2007, Tran *et al.*, 2008). Este compuesto es bien conocido, por su capacidad de bloquear la actividad de NIS en la tiroides ocasionando hipotiroidismo y bocio en las distintas poblaciones expuestas a este compuesto a nivel ambiental (Dohan *et al.*, 2007).

Una vez el I^- se encuentra en el citoplasma del tirocito, éste es translocado al coloide a través de la membrana apical por la proteína transportadora de membrana denominada Pendrina (Dohan *et al.*, 2003). El mecanismo de cómo esta proteína interviene en la salida del yoduro del citoplasma al coloide de la célula aún no es claro; sin embargo, se sugiere que la pendrina es una proteína de

membrana que actúa como una bomba de cloro/yodo (Cl^-/I^-) permitiendo el paso del I^- al coloide, a favor de su gradiente (Fig. 4) (Yoshida *et al.*, 2004).

Incorporación de yoduro a la tiroglobulina

La Tiroglobulina (Tg) es la molécula precursora de las hormonas tiroideas. Su síntesis se realiza en el RER, donde también inicia la N-glicosilación. La maduración y finalización de la glicosilación ocurre en el complejo de Golgi, y en vesículas secretoras que transportan la Tg al coloide (Gardas *et al.*, 1997), donde es almacenada como precursor de hormonas tiroideas (Spitzweg *et al.* 2001). El proceso de captación de yoduro y formación de hormonas tiroideas sobre la Tg toma un tiempo aproximado de 10 minutos en rata (Spitzweg *et al.*, 2001).

Cuando el yoduro llega al coloide, es necesario que se oxide a yodo para la incorporación a la Tg (Dohan *et al.*, 2003). La oxidación es catalizada por la enzima tiroperoxidasa (TPO), que en presencia de peróxido de hidrogeno (H_2O_2) oxida el yoduro a yodo y lo incorpora a la Tg formando yodotirosinas (Fig. 4). Cuando el yoduro es oxidado a yodo, e incorporado a residuos de tirosina se forma la monoyodotirosina (MIT), así mismo, cuando son dos yodos los que se unen a los residuos de tirosina se forma la diyodotirosina (DIT) (Gartner y Hiatt, 2002).

Este proceso puede ser determinado por métodos bioquímicos con ácido tricloacético, y se le denomina organificación o Incorporación de yodo a proteínas (PBI). La organificación es inhibida por mercaptomethylimidazol (MMI) (Kogai *et al.*, 2000), y al igual que la captación es regulado por la TSH (Susuki *et al.*, 1998).

Cuando la glándula es fuertemente estimulada por la TSH, ocurre una macroendocitosis, formando una gota de coloide 10 veces más grande que las vesículas de endocitosis. Una vez en el tirocito la Tg es degradada por proteólisis debido a la unión de lisosomas y pre-lisosomas. Finalmente las hormonas tiroideas son secretadas al torrente sanguíneo (Sidney y Sidney, 1971).

Regulación de la tiroides

La función de la glándula tiroides está regulada por el eje hipotálamo-adenohipófisis mediante la secreción de la hormona liberadora de la tirotropina (TRH) y la TSH, respectivamente. En mamíferos, en el hipotálamo se secreta la TRH por recepción de señales térmicas o por disminución de la T3 y T4 en circulación. La TRH regula la función de la adenohipófisis y estimula la producción y secreción de la TSH vía AMPc (Berne y Levy, 1993; Lally y Sassone, 1995).

La TSH al unirse a sus receptores (TSH-R) de la membrana basal de los tirocitos, estimula la síntesis de T3 y T4 y su secreción a la circulación. Cuando los niveles de T3 y T4 aumentan de 10 a 30% en circulación, se inicia un proceso de retroalimentación negativa para inhibir la síntesis de TSH y TRH. Esto es dado por acción de las hormonas tiroideas, específicamente la T3, la cual inhibe la secreción de la TRH en el hipotálamo, y así mismo, la de la TSH en la adenohipófisis (Berne y Levy, 1993).

Regulación de la tiroides por el yoduro en circulación

Las concentraciones de yoduro presentes en la circulación controlan también la síntesis y secreción de hormonas T3 y T4.

El primer experimento *in vitro* que mostró este efecto fue el realizado por Morton y colaboradores (1944) en organocultivos de glándula tiroides de oveja. En presencia de altas concentraciones de yodo en el medio se presentaba un efecto de bloqueo en la organificación. En 1948, Wolff y Chaikoff realizaron un experimento *in vivo* en ratas, lo cual permitió respaldar los resultados obtenidos por Morton y colaboradores, planteando el efecto de autorregulación de la glándula tiroides para la toma de yodo, además de darle el nombre de efecto Wolff-Chaikoff (Dayem *et al.*, 2006).

En ratas, en condiciones normales de yoduro de 10^{-7} M, la glándula tiroides presenta una organificación cercana al 90% con respecto a lo captado, mostrando

una relación directamente proporcional entre organificación y captación, esto se puede observar en los experimentos realizados *in vivo* por Wolff y Chaikoff (Fig. 5. A). Cuando se inyecta una alta concentración de yoduro (10^{-4} M), la captación de yoduro disminuye y se inhibe la organificación de este, produciendo así el efecto Wolff-Chaikoff (Fig. 5. B).

Es así como a altas concentraciones de I^{-} , la tiroides transporta el yoduro a la glándula pero deja temporalmente de organificarlo, y de sintetizar y secretar T3 y T4, regulación conocida como el efecto Wolff-Chaikoff (1948). Esta regulación permite mantener los niveles fisiológicos de hormonas tiroideas en el plasma, para asegurar el correcto funcionamiento de los tejidos en los organismos. En ratas, pasadas las 10 horas, el exceso de yoduro es eliminado por las diferentes vías excretoras, permitiendo la reanudación de las funciones de organificación del yoduro y síntesis de hormonas (Fig. 5. B). De esta manera, la glándula regula su función, evitando sintetizar cantidades excesivas de hormonas en presencia de fuertes concentraciones de yoduro en el plasma (Wolff-Chaikoff 1948).

Eng y colaboradores (1999) reportan que la reanudación de la función normal de la tiroides puede darse entre las 24 y 48 horas en cultivo de la línea celular FRTL-5 de células de tiroides de rata; incluso a pesar de que los niveles circulantes de yodo permanezcan elevados; esta situación es conocida como escape al efecto Wolff-Chaikoff (Eng *et al.*, 1999). El aumento de la concentración de yoduro en el plasma produciría una disminución en la expresión de NIS y, por lo tanto, una disminución en la captación intratiroidal del yoduro (por debajo de un umbral crítico) lo cual hace que la formación de hormonas disminuya permitiendo que la organificación de yoduro se reanude (Eng *et al.*, 1999; Pearce *et al.*, 2002; Haiyan y Carayanniotis, 2007).

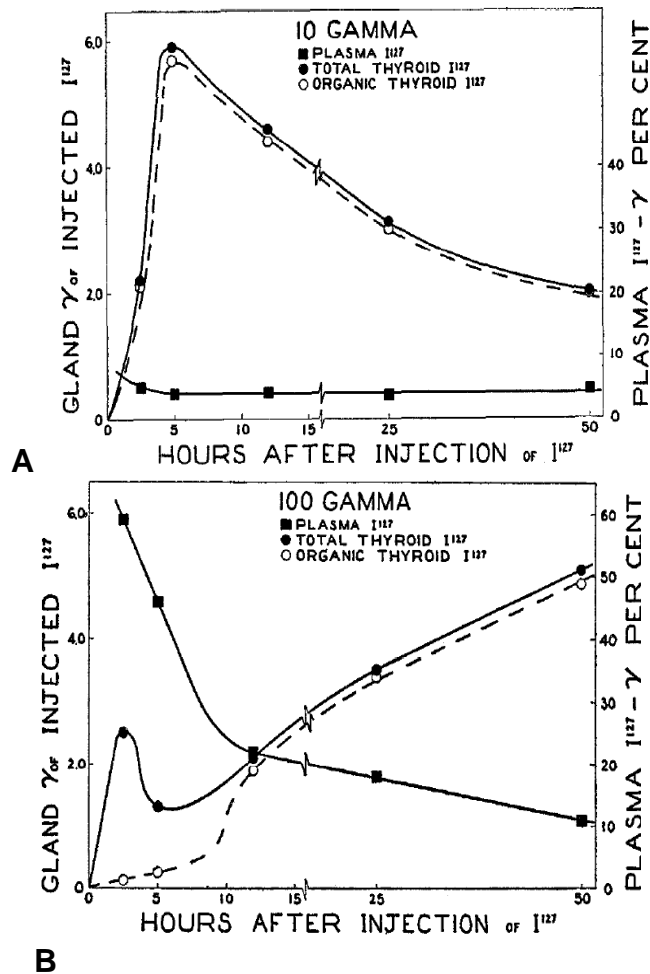


Figura 5. Efecto Wolff-Chaikoff. Experimento *in vivo* realizado en ratas inyectadas con diferentes concentraciones de yoduro. Línea continua con cuadros yoduro en el plasma, con círculos negros yodo unido a proteínas en tiroides y líneas discontinua con círculos blancos yodo captado por la glándula. **A.** Comportamiento normal del yoduro al inyectarse en ratas normales, a una concentración fisiológica de yoduro. **B.** Respuesta de la glándula tiroides *in vivo* al someterse a una concentración de 10^{-4} M de NaI (Tomado de Wolff y Chaikoff, 1948).

En ratas adaptadas a altas concentraciones de yoduro, se evidencia un escape o adaptación desde el tiempo 0 (Braverman e Ingbar, 1963). El efecto se debe a un sistema autorregulatorio intrínseco, que protege a la glándula tiroides de daños mientras que el fenómeno de escape permite la síntesis de hormonas durante una dieta de yoduro elevada y prolongada. El yoduro modula la sensibilidad de la glándula a la TSH y el yodo intratiroidal tiene un efecto inhibitorio sobre la función tiroidea (Dayem *et al.*, 2006).

Es sabido que el escape del efecto Wolff-Chaikoff ocurre gracias a una disminución intratiroidea de los niveles de yoduro (Eng *et al.*, 1999). Debido a que la concentración neta intratiroidea de yoduro depende del balance entre su captura, organificación y su reciclaje, y dado que el halógeno a fuertes concentraciones inhibe las dos deshalogenasas intratiroideas lo cual ayuda a que el escape del efecto Wolff-Chaikoff se dé. Para que ocurra el efecto Wolff-Chaikoff alguno de estos procesos o todos deben alterarse: el transporte activo de I^- en la membrana basal, la actividad de las deshidrasas que reciclan el yoduro intracelular, la formación de yodo inorgánico, y su oxidación y la unión a la Tg (Eng *et al.*, 1999).

Se ha postulado que el escape al efecto Wolff-Chaikoff se produce por un complejo de oxidación del yoduro en presencia de altas concentraciones de yoduro inorgánico: ión I_3^- , el cual podría ejercer una regulación intratiroidal, más que el yoduro sanguíneo. Esto puede ser evidenciado por experimentos en donde al disminuir el yoduro intratiroidal se restablece la formación de hormonas en presencia de altas concentraciones de yoduro en la sangre (Eng *et al.*, 1999).

Otro mecanismo que se ha postulado como responsable del efecto Wolff-Chaikoff es la formación de iodocomponentes orgánicos dentro de la tiroides, como el alfa-iodohexadecanal, un yodolípido inhibidor de la oxidasa dependiente de NADPH oxidasa o DUOX y la TPO, lo cual decrece la organificación. Después de un periodo de uno a dos días se da la adaptación o escape (Eng *et al.* 1999 y Eng *et al.*, 2001).

Recientemente se ha propuesto que el yoduro inhibe la generación de H_2O_2 , y por lo tanto, la síntesis de las hormonas tiroideas produciendo el efecto Wolff-Chaikoff (Morand *et al.*, 2003). Según Cardoso *et al.*, (2001) en humanos la NADPH oxidasa se inhibe por componentes yodados y probablemente está envuelta en el efecto Wolff-Chaikoff. La NADPH oxidasa tiroidea (DUOX, hay dos formas en la tiroides DUOX1 y DUOX2) es responsable de la producción de H_2O_2 necesario

para la síntesis de hormonas tiroideas. La DUOX es una flavoproteína dependiente de la actividad de calcio y es activada por el ATP. La DUOX es irreversiblemente inhibida *in vitro* por yoduro y 2-yodoheptadecanal, un compuesto yodado que probablemente media el efecto Wolff-Chaikoff. La autorregulación del yodo envuelve la inhibición de muchos pasos en el metabolismo tiroideo como el transporte de yodo, la secreción de hormonas y la actividad de la adenilato ciclasa. (Cardoso *et al.*, 2001).

Cuando hay altas concentraciones de yoduro en la sangre, una forma oxidada del yoduro inhibe la generación de H₂O₂ para reducir la disponibilidad de la proteína madura DUOX2 a nivel postransduccional, al igual que el decrecimiento en la expresión de la forma madura de DUOX2 (Riedel *et al.*, 2001; Morand *et al.*, 2003).

Es posible que durante las primeras horas, el decrecimiento de la expresión de los genes de TPO y NIS ocurra dando como resultado el efecto Wolff-Chaikoff, ya que se reduce la habilidad de las células para tomar y oxidar el yodo en acople con la inhibición de la DUOX. El decrecimiento en la formación de XI deberá permitir la recuperación de la capacidad de organificación normal del tirocito, produciendo de esta manera el escape (Morand *et al.*, 2003).

El efecto del yoduro podría proteger a la célula del estrés oxidativo resultante de la sobre-expresión y sobre-actividad del sistema H₂O₂/TPO bajo condiciones estimulantes (Morand *et al.*, 2003).

Los resultados de los experimentos de Eng *et al.* (1999 y 2001), de Uyttersprot *et al.* (1997) y de Morand *et al.* (2003) soportan la hipótesis de que el escape del efecto Wolff-Chaikoff es causado por una disminución en la expresión de NIS entre el día 1 y 6, posterior a la administración de yoduro, que implica una disminución en el transporte de yodo dentro de la glándula y de esta manera, se restablece la organificación de yodo y la síntesis de hormonas tiroideas, indicando

que una disminución de la reserva de ARNm de NIS conlleva al escape del efecto Wolff-Chaikoff.

Otros autores (Riedel *et al.*, 2001; Ferreira *et al.*, 2005) difieren sobre la hipótesis anteriormente descrita de esta proteína ya que la actividad de NIS normalmente se encuentra en la membrana plasmática; también se encuentra intracelularmente en vesículas lo que indica que el ARNm no precisamente es el perteneciente al que se encuentra en la membrana basal del tirocito. Por lo tanto, las alteraciones en el contenido de la proteína NIS no deben siempre correlacionarse con modificaciones en la actividad del transporte de yodo a través de la membrana basal del tirocito y viceversa.

Los datos de Vitale y colaboradores (2000) indican que el exceso de yoduro molecular, generado por la oxidación de los iones de yodo gracias a la TPO endógena, induce apoptosis en los tirocitos a través de un mecanismo de generación de radicales libres. Algunos efectos del yodo son especie-específicos (Vitale *et al.*, 2000).

Los experimentos realizados por Langer *et al.*, (2003) evidencian que el exceso de yodo causa apoptosis en los tirocitos no de manera directa, pero sí por derivados yodados como lo son: ácidos grasos poli-insaturados, especialmente yodolactonas. El estudio muestra la influencia de la apoptosis producida por el I^- y yodolactonas con y sin TSH. La estimulación con 2 y 20 μ M de I^- rápidamente induce una tasa de apoptosis entre el 4 y 6 % respectivamente. La adición de TSH (1mU/mL) causa un ligero pero no significativo incremento de incidencia de la apoptosis de los tirocitos.

La inducción de la apoptosis es un proceso muy rápido que toma lugar en las primeras horas de la exposición al yoduro o a las yodolactonas. Esta rápida inducción de apoptosis también se ha reportado *in vivo* (Burikhanov y Matsuzaki 2000) e *in vitro* debido al H_2O_2 (Riou *et al.*, 1998 y Langer *et al.*, 2003).

Enfermedades causadas por altas concentraciones de yoduro

Cuando constantemente hay una ingesta excesiva de yoduro, la concentración de yoduro total en el suero se incrementa y se produce bocio (aumento del tamaño de la glándula tiroides) con una morfología de hipotiroides, lo cual eleva los valores de TSH y anticuerpos anti-TPO en el suero. La prevalencia de todas estas anomalías decrece posterior a la remoción del exceso de yoduro. En algunos individuos el escape al efecto Wolff-Chaikoff no se presenta desarrollando hipotiroidismo reversible, cuyo mecanismo aún no es claro; se ha sugerido que el incremento en la infiltración linfocítica y un aumento en la TSH podrían ser responsables. En el año de 1998 en el oeste de África, se demostró que una alta tasa de disfunción tiroidea y bocio era consecuencia de un exceso de yoduro en el agua. Cuando se eliminó este exceso, se observó un incremento en la producción de hormonas tiroideas, disminución de los niveles de TSH y así mismo una disminución de los anticuerpos anti-TPO (Pearce *et al.*, 2002).

El exceso de yoduro causa daños ultra-estructurales en el tirocito, lo que produce bocio, tiroiditis autoinmune, e infiltración linfocítica en ratones NOD-H2h4 propensos a desarrollar enfermedades autoinmunes (Pearce *et al.*, 2002). Esto se evidenció en los estudios histológicos realizados por el grupo de Pearce y colaboradores (2002), donde se muestra infiltración linfocítica e hiperplasia folicular para pacientes que han estado expuestos a un exceso de yoduro en la dieta, los individuos que son propensos a adquirir enfermedades autoinmunes, tienen más complicaciones al ingerir altas cantidades de yoduro. Estudios desarrollados en animales por el mismo grupo han elucidado que el exceso de yoduro da predisposición al desarrollo de enfermedades autoinmunes tiroideas. Un claro ejemplo de esto se observa en Japón donde la dieta contiene grandes cantidades de yoduro, allí se presenta una mayor incidencia de tiroiditis Hashimoto a diferencia de áreas donde la dieta de yoduro es normal. Se podría sugerir que el exceso de yoduro puede inducir tiroiditis autoinmune en una población joven y sana (Pearce *et al.*, 2002).

Para Teng *et al.* (2009) el yoduro puede inducir hipotiroidismo en pacientes con tiroiditis autoinmune en una dosis dependiente. Sin embargo, según Haiyan y Carayanniotis (2007) el hipotiroidismo no parece tener bases autoinmunes, ni se ve reflejado sólo en individuos autoinmunemente propensos. La ingesta alta de yoduro induce el hipotiroidismo y por lo tanto altos niveles de TSH, una disminución de T₄ reflejado en la sangre y la formación de un bocio coloidal (Haiyan y Carayanniotis, 2007).

Antecedentes de cultivo de tejido de la tiroides

El estudio *in vitro* de la glándula tiroides ha sido una herramienta muy importante para analizar, y desarrollar muchos de los conocimientos que se tienen sobre los mecanismos morfológicos, funcionales y moleculares que gobiernan la glándula.

- **Cultivo organotípico**

Los primeros cultivos de células tiroideas fueron realizados en 1911 por Carrel y Burrows, quienes propusieron un modelo de cultivo *in vitro* denominado órgano-típico para el cual obtuvieron glándulas tiroideas de diferentes mamíferos (perros, gatos y cerdos). La técnica de cultivo organotípico consistía en extraer la glándula tiroidea de animales anestesiados, a partir de la glándula se tomaban fragmentos de tejido tiroideo y éstos eran colocados en plasma proveniente del mismo animal (Carrel y Burrows, 1911).

Utilizando este modelo se logró obtener series de 4 cultivos. Esto consistía en tomar fragmentos del cultivo primario y colocarlas en un nuevo medio de cultivo y de esta forma obtener una secuencia de cultivo. Este modelo mostró por primera vez que era posible mantener un cultivo celular *in vitro* de células tiroideas aunque con poca viabilidad (Carrel y Burrows, 1911).

Siguiendo éste modelo Morton y Chaikoff (1942) realizaron experimentos con fragmentos de tiroides de oveja, perro y rata en medio de cultivo Ringer con bicarbonato, e incubación de 2 a 3 horas con yodo radiactivo como indicador. Los

resultados demostraron la incorporación de yoduro a la tirosina y la formación de diyodotirosina durante un tiempo de 24 horas. En 1944 hicieron pruebas de funcionalidad con distintas dosis de yoduro, reportando por primera vez la inhibición de la incorporación de yodo radiactivo a proteínas (PBI), en dosis de 10^{-5} y 10^{-4} M de NaI^- (Morton *et al.*, 1944).

- **Cultivo en monocapa**

El desarrollo de cultivo de células aisladas por digestión enzimática con tripsina se realizó por primera vez en humano en 1951 (Pulvertaft *et al.*, 1959; en Herrera, 2008) En 1962 el grupo de Tong y Kerfof (1962) describió un cultivo de células en monocapa las cuales presentaron formas planas y poligonales, lo que hoy en día se conoce como cultivo primario en monocapa de células epiteliales de tirocitos (Tong *et al.*, 1962; Paul *et al.*, 1964; en Spinel 1987).

En 1982 se empezaron a realizar cultivos en monocapa, utilizando matriz extracelular flotante (colágeno), lo cual permitía que los tirocitos cultivados en monocapa mantuvieran una polaridad celular, y así mismo, tanto la membrana apical como basal quedaban en contacto con medios diferentes (Fig. 6). Este tipo de cultivo, permitió mantener la polaridad del tirocito y la incorporación de yoduro por la membrana basal; sin embargo, no presentó organificación del yoduro ni síntesis de hormonas tiroideas (Chambard *et al.*, 1982).

Otros modelos desarrollados de cultivo en monocapa presentan ciertas adaptaciones, como el uso de factores de crecimiento, cámaras (Gruffat *et al.*, 1992 y Postgard *et al.*, 2002) diseñadas con el fin de mantener la polaridad de las células y biomateriales (Chambard *et al.*, 1983).

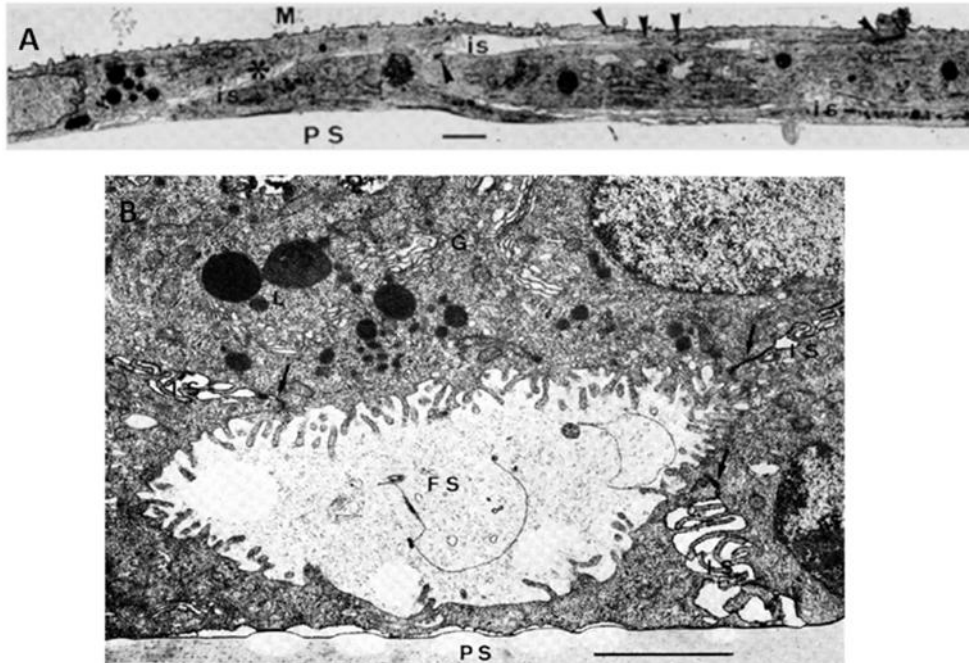


Figura 6. Cultivo en monocapa. Micrografía electrónica de un corte transversal de cultivo en monocapa en ausencia (A) y presencia de TSH (B) durante 7 días de cultivo. (IS) Espacio intercelular, (flechas) complejos de unión intercelular, (FS) Coloide, (G) Aparato de Golgi, (PS) Soporte plástico (M) Medio de cultivo. Barra 1 μ m (Chambard *et al.*, 1982).

- **Cultivo tridimensional: Folículos abiertos y pseudofolículos**

A partir de los 80 se reporta un nuevo modelo de cultivo de tiroides de folículos de rata aislados en suspensión, los cuales fueron disociados con colagenasa tipo II, y posteriormente incubados en medio de cultivo DMEM modificado Hams 12 sobre una base de agarosa, la cual evita que los folículos se adhieran y se forme un cultivo en monocapa. Este tipo de cultivo describe el mantenimiento de folículos abiertos por 24 horas y conserva una morfología y función similar a estudios realizados *in vivo* (Denef *et al.*, 1980; Karlsson *et al.*, 1982).

Tirocitos cultivados en monocapa sin TSH pierden la capacidad de incorporar yoduro desde el primer día; con una estimulación de 40 mili-unidades/mililitro (mU/mL) de TSH, las células en monocapa se reorganizan adquiriendo forma tridimensional similar a folículos cerrados. Se observaron tres células alrededor de una cavidad pequeña denominados pseudofolículos, los cuales pierden su forma al tercer día aún en presencia de TSH (Fayet *et al.*, 1971). Al reconstruir folículos a

partir de tirocitos, éstos no presentan polaridad ya que no se observaron microvellosidades en la parte apical de la membrana; en los espacios intracelulares se observaba remanentes de membrana y microvellosidades (Delorme *et al.*, 2002).

El primer paso en intentar obtener la estructura folicular en cultivo fueron células aisladas disociadas en colagenasa tipo II y cultivadas a altas concentraciones de TSH (10mU/mL), lo cual generaba que las células aisladas se reagruparan y formaran estructuras similares a folículos cerrados con coloide pero sin lamina basal; dichas estructuras fueron denominadas pseudofolículos (Fayet *et al.*, 1982). Con este modelo se logró obtener estructuras similares a folículos, que concentran yoduro en su cavidad durante 4 días y mantienen su morfología durante 6 días (Fayet *et al.*, 1982).

Pero como ellos mismos lo indican, el cultivo de folículos de tiroides tiene como objetivo mantener la estructura folicular y la polaridad de los tirocitos, para mantener sus propiedades funcionales (Fayet *et al.*, 1982).

- **Cultivo tridimensional de folículos cerrados**

El cultivo tridimensional de folículos tiroideos de rata, fue propuesto por Spinel en 1987. Este modelo permite obtener folículos cerrados y aislados desde el inicio del cultivo, los cuales permanecen en suspensión; manteniendo la estructura y función similar a lo observado *in vivo*.

Se demostró por primera vez, que al obtener folículos cerrados (Fig. 7. A y B) de rata desde el inicio del cultivo, con y sin TSH, estos mantienen la polaridad del tirocito (Fig. 7. C.), la función normal de síntesis de tiroglobulina y de hormonas tiroides durante 12 días (Spinel *et al.*, 1990) y reproducen el efecto Wolff-Chaikoff más allá de las 24 horas (Spinel y Yildiz, 1991) y de manera homóloga a los resultados obtenidos de trabajos *in vivo* (Wolff y Chaikoff, 1948; Deneff, 1980; Many, 1982).

Se demostró también que el valor de la relación de captación sobre organización es del 85 al 95% con y sin TSH (Fig. 8) y que determina la proporción de folículos cerrados, logrando valores mayores a los descritos en la literatura (5 y 10%) (Spinel 1987).

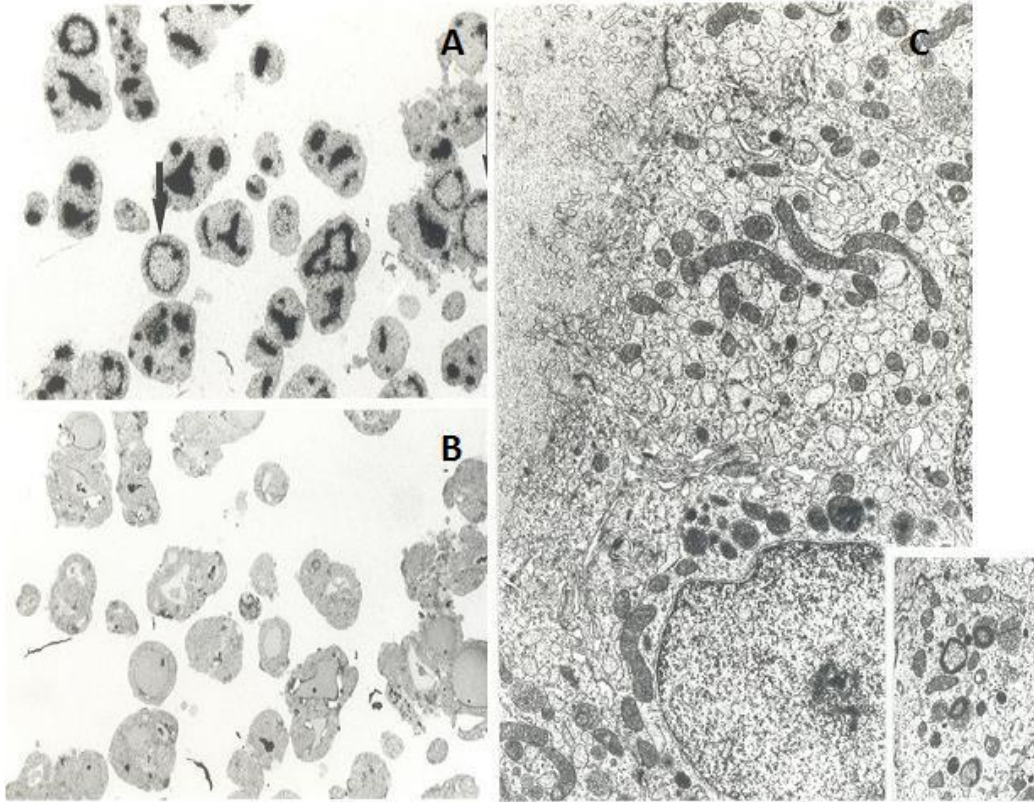


Figura 7. Cultivo de folículos en suspensión de rata sin TSH durante 3 días. A Folículos marcados por autoradiografía, se observa el yodo atrapado dentro del coloide lo que corrobora folículos cerrados y resellados. B. Folículos en suspensión antes de la autoradiografía mostrada en la figura A. Microscopio óptico (MO) 150X. C. Microscopio electrónico (ME), 7580X - 10720X. Tomado de Spinel 1987.

Este modelo actualmente se desarrolla en el grupo de: cultivos celulares y tridimensionales con y sin matriz extracelular del Centro Internacional de Física (CIF) de la Universidad Nacional de Colombia. En trabajos realizados utilizando este modelo se demostró que folículos cerrados de cerdo (Fig. 9. A), conservan su morfología y polaridad (Fig. 9. B) desde el primer día de cultivo y presentan respuesta a la TSH desde el tercer día de cultivo (Herrera *et al.*, 2008 y Herrera, 2008).

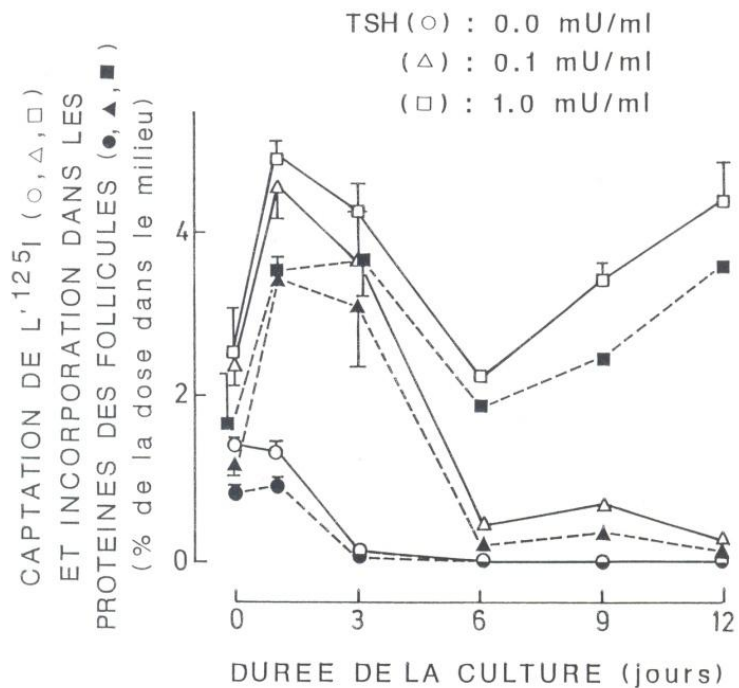


Figura 8. Respuesta de folículos cerrados a la TSH. Porcentaje de captación y organización de folículos cerrados cultivados por 12 días en presencia de TSH 0,1 y 1.0 mU/mL y en ausencia de esta. Tomado de Spinel, 1987.

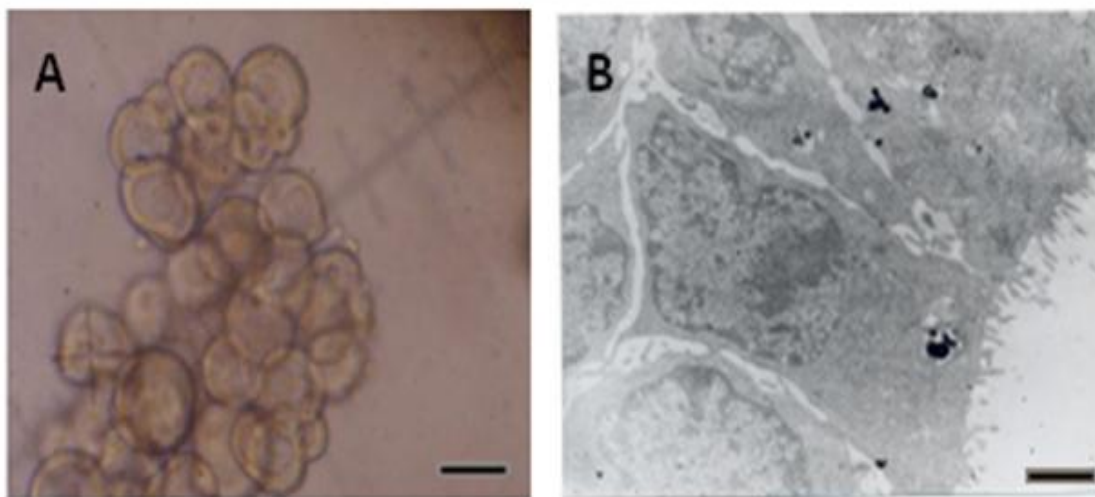


Figura 9. Cultivo de folículos de cerdo en suspensión sin TSH. **A.** Nótese la capa de tirocitos alrededor del coloide de aspecto hialino. En estos folículos también se evidencia un epitelio cúbico y una arquitectura típica de folículos de la tiroides (Microscopio Invertido (MI), Barra 40 μ m). **B.** Tirocitos de los folículos de A, note las abundantes y largas microvellosidades (Microscopia electrónica (ME), Ultra-fino, Barra 4 μ m). (Herrera *et al.*, 2008, Herrera, 2007).

3. JUSTIFICACIÓN

Las alteraciones en la función de la glándula tiroides producen patologías de gran importancia, razón por la cual se hace necesario su estudio para el buen entendimiento de su función y morfología. Para este efecto se requiere el desarrollo de un modelo *in vitro* que simule el comportamiento de la glándula *in vivo*. Como hemos visto, los diferentes modelos realizados hasta el momento tienen como inconvenientes que no se conserva la función y morfología mas alla de las 24 horas de cultivo. Al no mantener la polaridad celular, se reducen las posibilidades de realizar estudios de proteínas ubicadas en la parte apical del tirocito, además al no presentar la estructura folicular desde el inicio del cultivo, hace que no sean homologables con lo que ocurre *in vivo*.

Según Wang y colaboradores (2009) el mecanismo bajo el cual el efecto del exceso de yoduro sobre la glándula tiroides funciona es pobremente conocido, por lo tanto es necesario establecer un modelo de cultivo de células tiroideas *in vitro* y hacer una evaluación del impacto del exceso de yoduro para entender el significado y naturaleza del mismo.

El protocolo realizado por el grupo de: cultivos celulares y tridimensionales con y sin matriz extracelular del CIF, se escogió para el presente trabajo ya que permite estudiar folículos tiroideos de cerdo *in vitro*. Siendo muy importante porque propone un cultivo homologable a *in vivo*; así mismo se trabajó sobre tejido porcino, el cual es un modelo morfológica y funcionalmente cercano al humano, lo cual es evidenciado en medicina humana en estudios de enfermedades, trasplante de órganos y suministro de sustancias vitales a la vida del hombre (Roppa, 2008)

4. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Estudiar la respuesta de folículos de tiroides de cerdo (*Sus domesticus*) en presencia de dosis crecientes de yoduro y hormona tirotrópica (TSH).

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Determinar las condiciones del empleo de yoduro radiactivo para determinar la función de captación y organificación de yoduro por folículos de tiroides en cultivo.
- Estudiar la respuesta de los folículos con dosis crecientes de yoduro.
- Analizar las diferencias en presencia o ausencia de TSH sobre la función de folículos en cultivo.

5. MATERIALES Y METODOS

Obtención del Tejido tiroideo

Para este trabajo se seleccionó el tejido porcino, por ser un modelo morfológica y funcionalmente cercano al humano (Mussart y Coppo, 2006), y por su facilidad de obtención.

Las glándulas tiroides de cerdo fueron obtenidas del Frigorífico Guadalupe (Bogotá, Colombia), minutos después del sacrificio del animal. Se realizó la disección de los dos lóbulos utilizando tijeras estériles y se pasaron a alcohol al setenta por ciento (70%) durante (1) un minuto, con el fin de eliminar la contaminación obtenida del ambiente durante la extracción de la glándula (Herrera, 2008). Se utilizaron 3 ó 4 glándulas, dependiendo de la cantidad de material necesario para cada experimento. Posteriormente, las glándulas fueron pasadas a medio de cultivo (el cual denominaremos como COON en el texto) previamente filtrado y con antibiótico (penicilina 100µU/mL -estreptomicina 100µg/mL) y anfotericina (2,5µg/mL) y medio COON. De esta manera se transportaron para realizar la disección.

Aislamiento de folículos Tiroideos

Preparación del tejido

Este procedimiento se realizó en una cabina de flujo vertical utilizando pinzas de punta fina, bisturí y cuchillas Minora®. Se inició con la remoción del tejido capsular externo del lóbulo de la glándula tiroidea. Posteriormente se seleccionó y disecó una porción interna de la glándula, se eliminó el tejido muerto a causa del alcohol al 70%. La porción interna fue dispuesta en una tapa de caja Petri de 75 mm de diámetro con 3 mL de COON, para evitar el desecamiento del tejido mientras se realizaron los cortes. El tejido escogido fue cortado en fragmentos pequeños de aproximadamente 3mm³, intentando tomar la menor cantidad de tejido conjuntivo posible y finalmente se pasó a la disociación enzimática, para separar los folículos unidos por tejido conectivo (Herrera, 2007).

Disociación Enzimática y Mecánica

Los fragmentos de la disección se dispusieron en un frasco de base plana con 5 mL en solución de 400 mU/mL de Colagenasa tipo II (Sigma) en COON, a 37°C y una agitación de 160 oscilaciones por minuto (opm), durante 15 minutos (min); esta solución cubría completamente los cortes. La Colagenasa, al ser utilizada en la concentración adecuada, presenta una ventaja en la disociación de tejido epitelial al no disociar los complejos de unión entre las células, y de esta manera no altera la estructura folicular (Spinel, 1987).

Posterior a la disociación enzimática, se realizó una disociación mecánica en la misma solución. Para la disociación mecánica, se utilizaron pipetas de vidrio de 20 mL, con un diámetro de 4 mm en su extremo. Los fragmentos de tejido se resuspendieron 10 veces con suaves agitaciones, evitando la aparición de burbujas y turbulencia que puedan afectar la estructura folicular, logrando una disociación suave que no dañe o abra los folículos. (Spinel, 1987). Pasada esta primera disociación enzimática y mecánica, los fragmentos de tejido se dejaron decantar y el sobrenadante fue eliminado, ya que la cantidad de folículos presentes no era significativa, y porque presentaba residuos celulares y tejido conjuntivo amorfo.

Los fragmentos de tejido precipitados fueron sometidos nuevamente a disociación enzimática durante 30 min en baño María a 37°C y a 160 opm, y posteriormente se realizó una disociación mecánica como ya fue descrita. El sobrenadante obtenido con los folículos de interés, fue sometido a 3 lavados con medio de cultivo COON con suero fetal bovino (SFB) al 2% centrifugando a 50 g durante 5 min; para eliminar los residuos de Colagenasa, y de esta manera prevenir la pérdida estructural de los folículos. Se realizó una tercera etapa de disociación enzimática y mecánica con los fragmentos de tejido tiroideos, a los cuales se les realizó el mismo procedimiento descrito anteriormente.

Una vez fueron realizados los lavados se reunió todo el material disociado y se filtró por medio de una malla metálica con poros de 300µm de diámetro, con el fin de eliminar el tejido no disociado.

En el último lavado, se resuspendieron los folículos en COON con 0,5% de SFB para su cultivo (Herrera, 2007).

Cultivo de Folículos

El cultivo de folículos en suspensión se realizó en cajas Petri de 75mm con COON y SFB 0.5%, previamente recubiertas con agarosa tipo II al 1%. La agarosa cumple la función de evitar que los folículos viables se adhieran al fondo de la caja, permaneciendo en suspensión. Finalmente el cultivo se dejó bajo las siguientes condiciones: temperatura de 37 °C, atmósfera de 95% de aire, 5% de dióxido de carbono y humedad saturada. Los folículos se preincubaron por 8 horas, pasadas las cuales se realizó cambio de medio, centrifugando a 50 g durante 5 minutos, eliminando el sobrenadante y resuspendiendo los folículos en COON con SFB al 0.5%.

Prueba de viabilidad

Antes de iniciar el cultivo se realizó sistemáticamente el examen de exclusión con azul Tripán 5%. La prueba de azul Tripán, además, de indicar la viabilidad celular que siempre fue positiva para el epitelio folicular, permite distinguir entre los folículos que conservan su estructura de los que no, ya que al perder la estructura folicular, el azul Tripán se observa dentro de las cavidades foliculares mostrando una coloración azul, a diferencia de los folículos que permanecen con su estructura definida, los cuales no presentan coloración en su interior.

Ajuste de condiciones

El ajuste de condiciones para trabajar con I⁻¹²⁵ y las medidas de captación y organificación se realizaron en la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia (FIDIC), ya que allí se tienen las medidas de seguridad necesarias para trabajar con yodo radiactivo.

Posterior al cambio de medio, los folículos fueron transportados a la FIDIC en tubos de 15 mL. Cada tubo tenía folículos en 500µL de COON con SFB 0,5%. Se hicieron los siguientes grupos experimentales que muestra la tabla 1.

| Grupos Experimentales | Tiempo de cultivo | | | |
|--|-------------------|-----|------|------|
| | 0,5 h | 6 h | 24 h | 48 h |
| Sin Nal sin TSH | 2 | 2 | 2 | 2 |
| Sin Nal + 1 mU/mL de TSH | 2 | 2 | 2 | 2 |
| Nal 10^{-7} M sin TSH | 4 | 4 | 4 | 4 |
| Nal 10^{-7} M + 1 mU/mL de TSH | 4 | 4 | 4 | 4 |
| Nal 10^{-3} M sin TSH | 4 | 4 | 4 | 4 |
| Nal 10^{-3} M + 1 mU/mL de TSH | 4 | 4 | 4 | 4 |
| Sin Nal + ClO_4^- 30µM sin TSH | 2 | 2 | 2 | 2 |
| Sin Nal + ClO_4^- 30µM + 1 mU/mL de TSH | 2 | 2 | 2 | 2 |
| Nal 10^{-7} M + ClO_4^- 30µM sin TSH | 2 | 2 | 2 | 2 |
| Nal 10^{-7} M + ClO_4^- 30µM + 1 mU/mL de TSH | 2 | 2 | 2 | 2 |
| Nal 10^{-3} M + ClO_4^- 30µM sin TSH | 2 | 2 | 2 | 2 |
| Nal 10^{-3} M + ClO_4^- 30µM + 1 mU/mL de TSH | 2 | 2 | 2 | 2 |

Tabla 1. Indica las condiciones de los experimentos realizados. Los números en las columnas indican las réplicas por cada tratamiento. En cada experimento se determinó la radiactividad en un contador gamma de pozo utilizando NaI^{125} . TSH: Hormona tireotrópica; Nal: yoduro 127 de sodio; M: Molar; ClO_4^- : perclorato.

Para las medidas de captación y organificación se utilizó yodo radiactivo (NaI^{125}) como trazador (Tabla 2), teniendo en cuenta la concentración de yodo frío (NaI^{127}) adicionado, de esta manera se estableció una proporción adecuada entre estos (Spinel, 1987).

| CONCENTRACIONES YODURO RADIATIVO PARA CADA TRATAMIENTO | | | | | |
|--|-------------------------------|-------------------------------|---------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| Sin TSH | | | TSH 1mU/mL | | |
| Sin I^{-127} | 10^{-7} M I^{-127} | 10^{-3} M I^{-127} | Sin I^{-127} | 10^{-7} M I^{-127} | 10^{-3} M I^{-127} |
| 2.5 µCi I^{-125} | 2.5 µCi I^{-125} | 25 µCi I^{-125} | 2.5 µCi I^{-125} | 2.5 µCi I^{-125} | 25 µCi I^{-125} |

Tabla 2. Concentración de yoduro frío (127) y radiactivo (125) empleado en los diferentes grupos experimentales de la tabla 1.

Prueba de funcionalidad

Blancos de yodo 125 (NaI¹²⁵).

Se realizaron 3 blancos de NaI¹²⁵ con 2 repeticiones de cada uno para un total de 6 blancos. Los blancos utilizados fueron de 0.125, 1.25 y 2.5 µci de NaI¹²⁵ en 100µL de COON cada uno. Estos blancos fueron colocados en incubación el mismo tiempo que las muestras con folículos. Para cada medida de captación y organificación los blancos fueron medidos (Fig 10), para determinar la cantidad total de radioactividad real disponible para cada día.

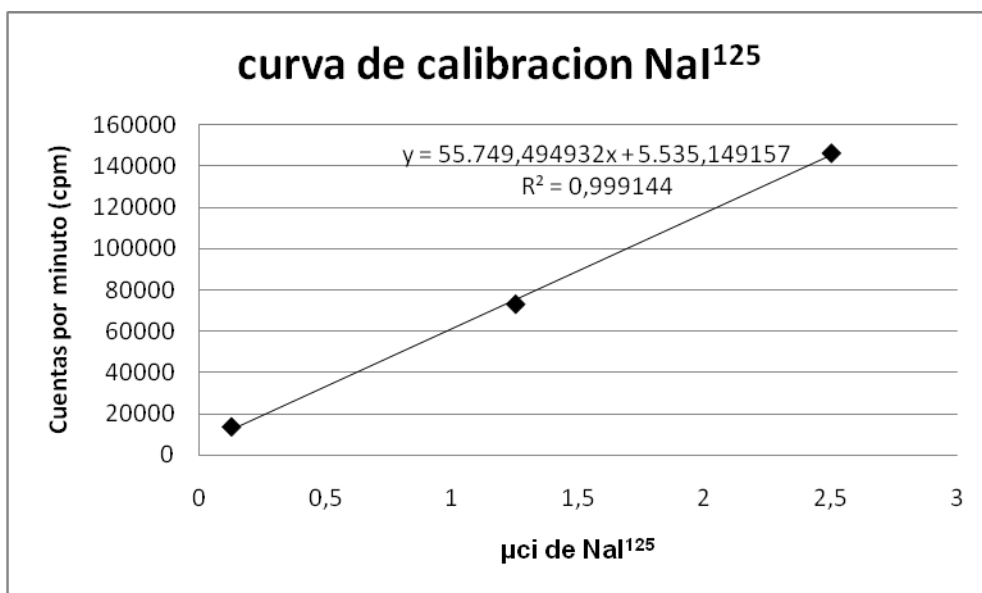


Figura 10. Curva de calibración NaI¹²⁵. En la grafica se observa un incremento de Cuentas por minuto (cpm), al aumentar la concentración de NaI¹²⁵. Esta curva es la base de los blancos y de poder utilizar las concentraciones de radioactividad mencionadas en el texto.

Medida de yodo 125 (NaI¹²⁵)

La medida de yodo 125, se realizó en un contador gamma de pozo en seco (Packard Cobra. Auto Gamma II), obteniendo medidas en cuentas por minutos (cpm). Para eliminar el ruido proveniente del contador gamma, se realizaron medidas de tubos vacíos antes de realizar cualquier medida, de esta manera se restó este valor a las muestras y blancos medidos.

Medida de captación de yodo

Pasado el tiempo de incubación las muestras fueron sometidas a 3 lavados con tampón fosfato salino (PBS) suplementado con NaI^{127} (100 veces más concentrado con respecto a la concentración inicial de yodo frío de cada muestra), y centrifugadas a 50 gravedades durante 5 min tres veces, evitando que los folículos se abrieran durante este procedimiento. La adición del yoduro al PBS se hizo con el fin de eliminar el yodo radiactivo que no está unido a los folículos (Spinel *et al.*, 1991). Una vez realizados los 3 lavados con PBS se procedió a realizar las mediciones de las muestras en el contador gamma.

Posterior a la medición de captación, a las muestras se les adicionó 1mL de PBS, 100 μL de albumina al 0.5% y 1mL de Acido tricloroacetico al 20% (TCA) en tampón fosfato salino (PBS), con el fin de romper los folículos y precipitar proteínas (Spinel *et al.*, 1991). Finalmente las muestras fueron colocadas a -4°C , durante 24 horas, para continuar con la medida de organificación

Medida de la incorporación de yodo a proteínas (organificación)

Una vez se realizó la medida de captación, el siguiente paso fue medir cuánto de ese yodo captado había sido incorporado a proteínas. Luego de medir la radiactividad de captación, se adicionó 1 mL de PBS, 100 μL de albumina fracción V y 1 mL de ácido tricloroacético (TCA) al 20% durante 12 h a 4°C . . Pasado este tiempo, se lavó 3 veces con TCA al 10% (100 veces más concentrado de NaI^{127} con respecto a la muestra) centrifugándolas a 141 g durante 10 minutos con el fin de precipitar las proteínas. Terminado el último lavado, se extrajo el sobrenadante y se realizó la medida de radiactividad del precipitado en el contador gamma de pozo (Spinel, 1987).

Extracción de ADN y ARN

A las muestras sometidas a pruebas de funcionalidad, se les realizó el procedimiento de extracción y cuantificación de ADN, con el fin de normalizar los datos. La técnica utilizada para la cuantificación de ADN es una prueba colorimétrica de Burton (1955) y Schneider (1945). Esta prueba se basa en la

reacción de la difenilamina con las pentosas que hacen parte de la composición del ácido desoxirribonucleico, permitiendo determinar la concentración de los ácidos nucleicos.

Todas las muestras fueron centrifugadas durante 5 min a 140 gravedades, eliminando el sobrenadante y el pellet fue resuspendido en 600µL de etanol al 95% a 4°C, y fueron transferidas a tubos Eppendorf de 1,2mL. Luego se centrifugaron durante 10 min a 180 gravedades, posterior a esto se eliminó el sobrenadante y se adicionó nuevamente etanol. Las muestras se dejaron durante 20 min a 70°C y se centrifugaron por 10 min a 189 gravedades. El etanol se utilizó con el fin de remover componentes lipoidales (Schneider, 1945).

El precipitado obtenido fue resuspendido con 600µL de éter a 30°C durante 10 min y se centrifugo a 180 gravedades durante 10 min. Luego se procedió a eliminar el sobrenadante y se dejó secar el precipitado en el horno (30 minutos aproximadamente) a 50°C. Al añadir alcohol etílico y éter se tuvo precaución de cerrar inmediatamente la capsula para de esta manera evitar la evaporación del éter, debido a que es muy volátil.

Al precipitado obtenido se le adicionó 400µL de ácido perclórico (HClO₄) 0,5N durante 20 min a 70°C. Según Burton (1955), el uso del ácido perclórico 0,5 N antes de la reacción de la difenilamina permite que el color obtenido sea el máximo, ya que el ácido perclórico al calentarse permite que el ADN se solubilice y de esta manera se separe por centrifugación.

Para determinar la concentración de ADN de las muestras obtenidas, se realizó una curva de calibración utilizando soluciones de ADN de concentración conocida. Para la realización de la curva se hizo una solución *stock* de ADN, con una concentración de 100µg de ADN/mL de solución, diluyendo 10 µg de ADN (de un vial concentrado a 10mg/mL de ADN de esperma de salmón (Invitrogen)) en 50 mL de NaOH. Una vez preparada la solución *stock* de ADN, ésta se diluyó en una relación vol/vol en HClO₄ 0.5 M para obtener concentraciones de 0, 2, 4, 6, 8, 10 y 12µg de ADN/400µL de solución. Posterior a esto, las muestras fueron colocadas

en baño María a una temperatura de 70°C por 15 min; pasado este tiempo, se le adicionó a los tubos para la curva de calibración y a las muestras obtenidas de ADN, 600 µL del reactivo de difenilamina, el cual estaba mezclado con acetaldehído, pues según Burton (1955), en presencia de este reactivo la densidad óptica es proporcional a la concentración de ADN.

La preparación y adición del reactivo difenilamina se realizó en oscuridad. Las muestras y blancos se dejaron a 4°C en ausencia de luz durante un tiempo mínimo de 18h. Las lecturas se realizaron 48 h después, en un espectrofotómetro utilizando una longitud de onda de 600 nm λ . Primero se realizó la lectura de los blancos para establecer la curva patrón, y después se hicieron las lecturas de las muestras. La concentración de ADN de las muestras se calculó por extrapolación sobre la recta patrón de las densidades ópticas de las soluciones problema.

Procesamiento de datos

Para determinar la cantidad de yodo captado y organificado por las muestras de folículos se utilizó yodo radiactivo (I^{125}) como trazador. Los datos de las pruebas funcionales fueron obtenidos en cuentas por minuto (cpm). La cantidad total de yodo captado y organificado en cada muestra se calculó a partir de la proporción entre el yodo radiactivo incorporado y la concentración de yodo frío que se adicionó en cada muestra (Tabla 3). El valor en nanogramos (ng) del contenido de yodo radiactivo de las muestras se calculó a partir de la radiactividad medida en cpm de la muestra. La radiactividad medida en cpm del blanco de 2.5 µCi y el valor de radiactividad específica para el I^{125} . Para evitar un efecto del decaimiento del yodo radiactivo en los cálculos, el valor en cpm de la radiactividad del blanco de 2.5 µCi fue medido al mismo tiempo que cada muestra, en los diferentes tiempos de los experimentos. Posterior a esto los datos fueron normalizados sobre microgramos de ADN para obtener una medida final de yodo total en ng/ µg de ADN.

| Cantidad de NaI por 500μL muestra | | | |
|-----------------------------------|-------------|------------|------------|
| | $10^{-10}M$ | $10^{-7}M$ | $10^{-3}M$ |
| Yodo frio (ng) | 0,00635 | 6,35 | 63500 |
| Yodo caliente (ng) | 0,03525 | 0,03525 | 0,3525 |
| Yodo Total (ng) | 0,0416 | 6,38525 | 63500,3525 |

Tabla 3. Medida total de yodo caliente y frio, por concentración en 500uL de medio de cultivo.

Manejo material radiactivo

Una vez leída la radioactividad de las muestras, están deben ser dispuestas de acuerdo al manual de protección radiológica. Las muestras se consideran material biológico, solido, no compactable de baja actividad. De tal forma que se almacenan en nevera, en empaques plásticos y a su vez en vial de plomo durante el tiempo necesario (número de vidas medias) para que su actividad sea mínima; teniendo en cuenta que la vida media del I^{125} es de 60 días. Luego del decaimiento, el material podrá ser desechado como material biológico para ser incinerado (Torres, 2002 y Martin *et al.* 2002).

6. RESULTADOS

Estandarización protocolo de cultivo y radiactividad.

En la realización de los experimentos preliminares, se encontró que una de las dificultades para obtener una proporción importante de folículos cerrados, es la forma en que se realiza la disociación mecánica. Una disociación muy fuerte rompe los folículos dando como resultado folículos abiertos y agregados celulares (Fig 11), hecho que se evidenció en la primera serie de experimentos (preliminares), en los que se observaron principalmente agregados celulares y una mínima proporción de folículos cerrados, lo cual se vio reflejado en los resultados de funcionalidad (Fig 12).

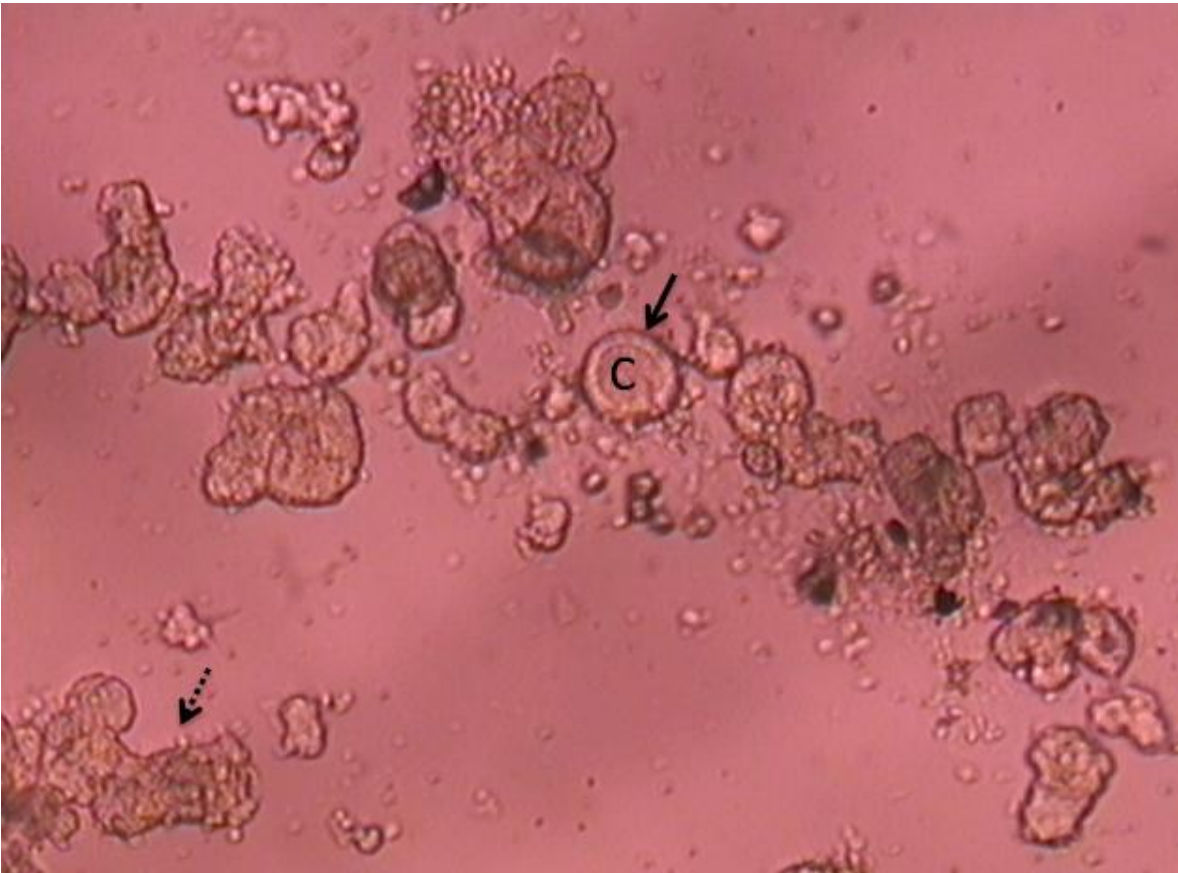


Figura 11. Cultivo de folículos de cerdo. Se observan principalmente agregados celulares (Flecha discontinua), y en la parte central un folículo cerrado (flecha continua) con coloide (C). (Microscopio Invertido, 40X)

Las pruebas funcionales se realizaron para las concentraciones de 10^{-7} y 10^{-3} M de NaI^{125} en experimentos preliminares, utilizando el yodo radiactivo como marcador, lo cual permitió medir la incorporación del yoduro al tirocito, y su unión a proteínas. Aunque en los experimentos preliminares se mostraron valores de captación y organificación (Grafica 1), los datos no pudieron ser normalizados sobre μg de ADN, ya que la cantidad de ADN presente en cada muestra fue insuficiente para ser detectado por el espectrofotómetro, lo cual corrobora los agregados celulares desde el inicio y la pérdida de éstos en los diferentes lavados.

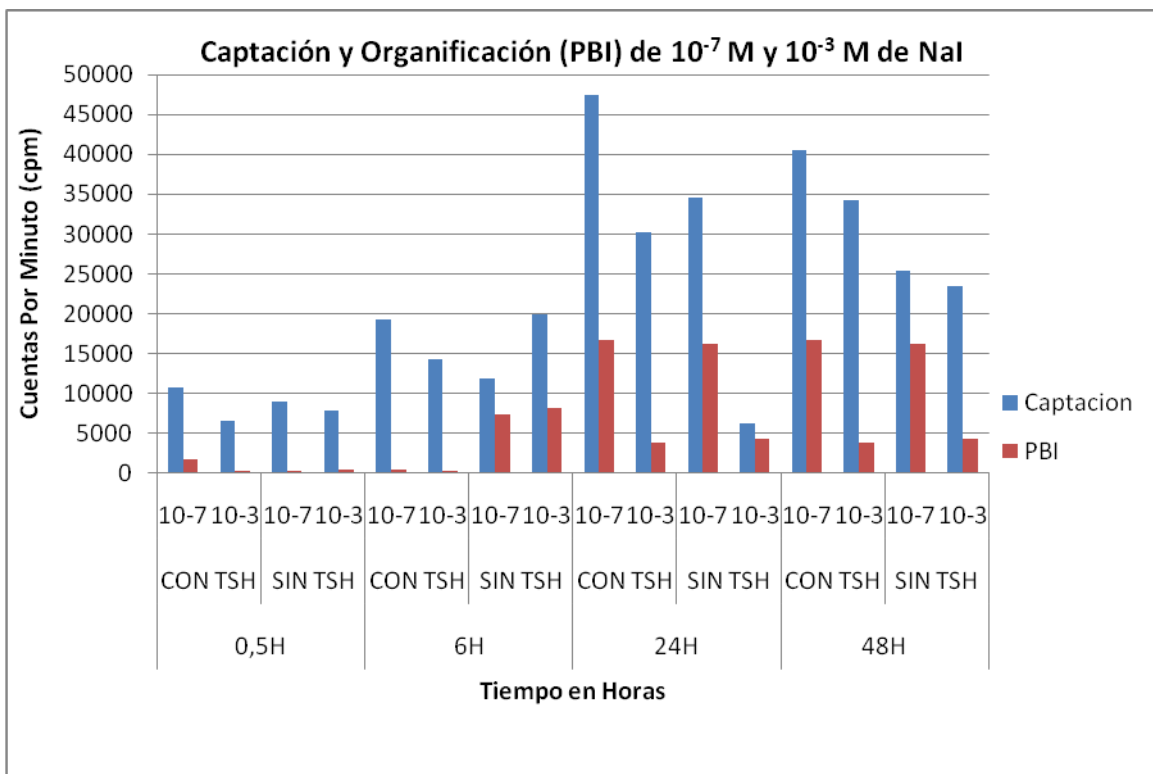


Figura 12. Experimentos preliminares. Captación y organificación del yoduro en experimentos preliminares para dosis de 10^{-3} y 10^{-7} M de NaI en presencia (1,0mU/mL) o ausencia de TSH, durante 48 horas (H). Los datos mostrados son graficados en cpm (cuentas por minuto).

Teniendo en cuenta los primeros resultados, la disociación mecánica se realizó con especial cuidado de forma lenta y ocasionando la menor turbulencia posible en el medio con folículos, así mismo se implementó la prueba de viabilidad con azul Tripán (Fig 13), la cual permitió distinguir entre folículos cerrados (Fig 13. A, B, y C) y desechos celulares (Fig 13. D).

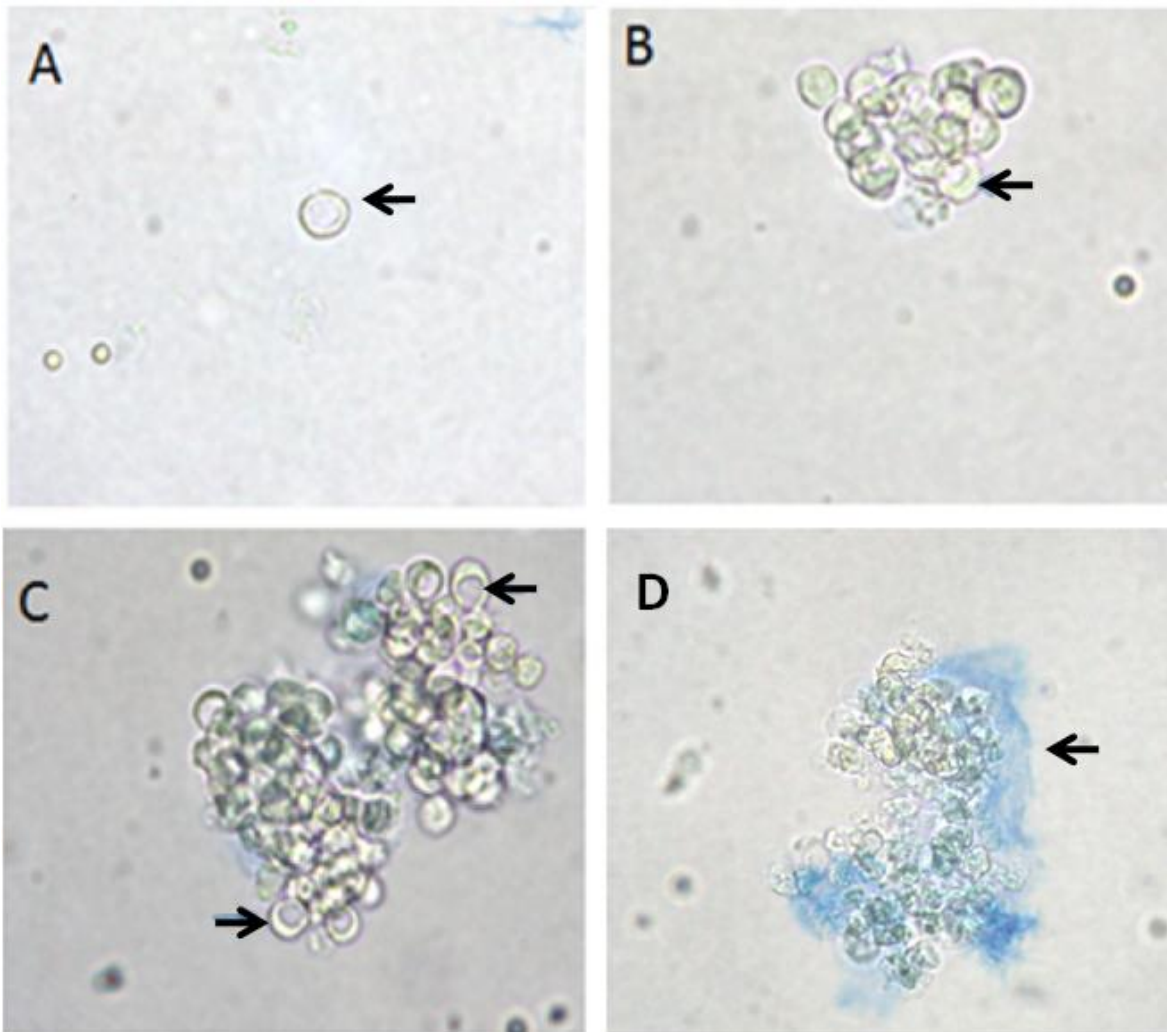


Figura 13. Cultivo de folículos de cerdo en azul Tripán. A, B, C y D. Planos diferentes de un cultivo de folículos cerrados y aislados de cerdo., después de 8 h de preincubación, observados en MI y en presencia de azul Tripán. Se observan folículos cerrados sin teñir (Flechas A, B y C). D. Tejido teñido de azul Tripán el cual no fue viable (Flecha). Microscopio Invertido.

Así mismo se implementó la observación de folículos en microscopio óptico una vez realizada la medida de captación, como se observa en la Fig 14.

Los cambios realizados en la disociación permitieron la obtención de folículos cerrados y viables, los cuales presentaron medidas de captación y organificación. Estos datos fueron normalizados sobre μg de ADN.



Figura 14. Folículos en PBS después de medida de captación. Flecha: folículo cerrado. Microscopio Óptico, 40X.

Medidas de Captación y Organificación

Cada uno de los grupos experimentales (10^{-7} y 10^{-3}M de NaI) con y sin TSH presentan 4 replicas (Tabla. 1) provenientes de 2 experimentos realizados días diferentes, teniendo así 2 replicas por experimento. Para cada grupo experimental, Los datos obtenidos de cada experimento presentaron valores muy alejados el uno del otro, pero con un comportamiento similar, por lo cual se realizaron graficas separadas de cada experimento.

En los folículos cultivados sin NaI , no se agregó yodo frío por lo cual los folículos solo tenían trazas de yoduro y yodo radiactivo (Tablas 1 y 2). Este tratamiento

mostró niveles mínimos de captación y organificación, lo cual era esperado por el poco nivel de yoduro en el medio. No se observó una respuesta a la TSH (Fig 15).

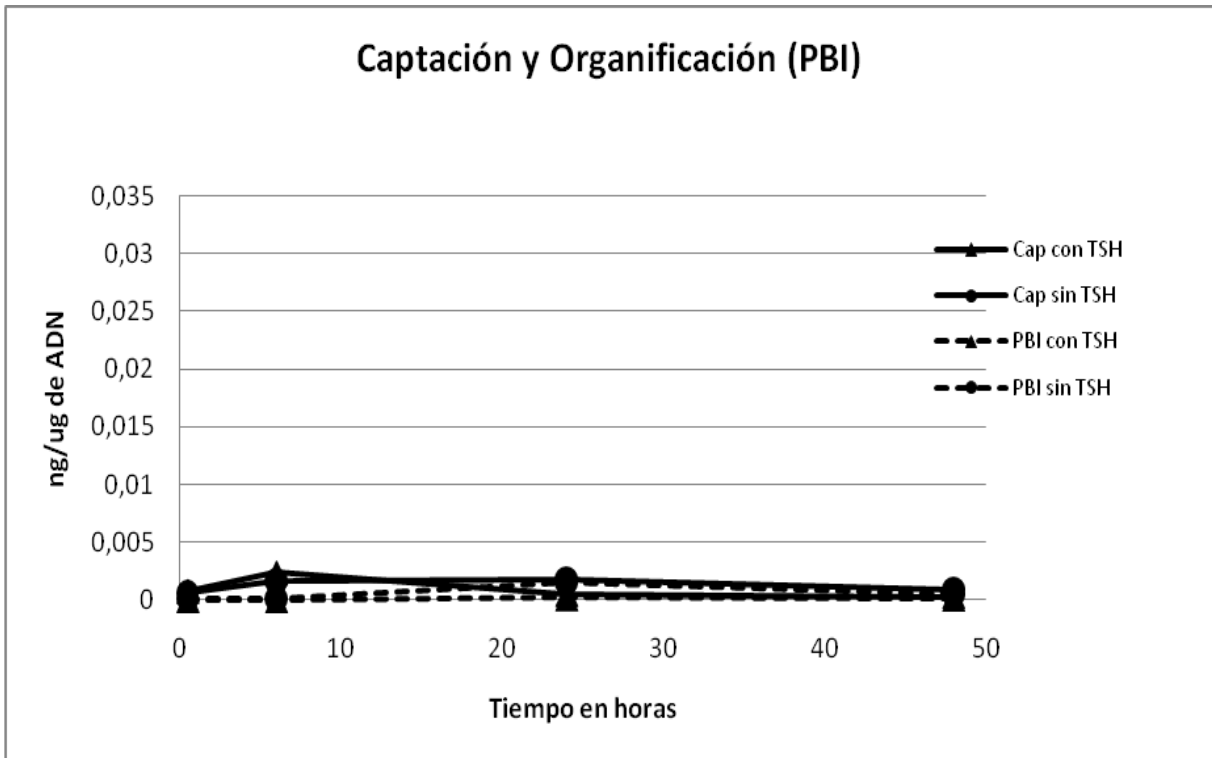


Figura 15. Medida de Captación y organificación sin NaI en presencia y ausencia de TSH, utilizando 2,5 μCi de NaI^{125} en tiempos de 0,5, 6, 24, y 48h.

En los folículos cultivados con 10^{-7} M de NaI se observó un nivel de captación que varía en el tiempo (Figs. 16. A. B). Una medida alta de captación se observó en los folículos cultivados en presencia de TSH, a las 6 horas (Fig. 16. A) y a las 48 horas (Fig. 16. B). En ausencia de TSH las medidas de captación fueron inferiores a los folículos que se encontraba en presencia de TSH, excepto a las 24 horas (Fig. 16. A), a diferencia de la Fig. 16. B, donde no se observan diferencias notorias en las medidas de captación en presencia y ausencia de TSH exceptuando la hora 48.

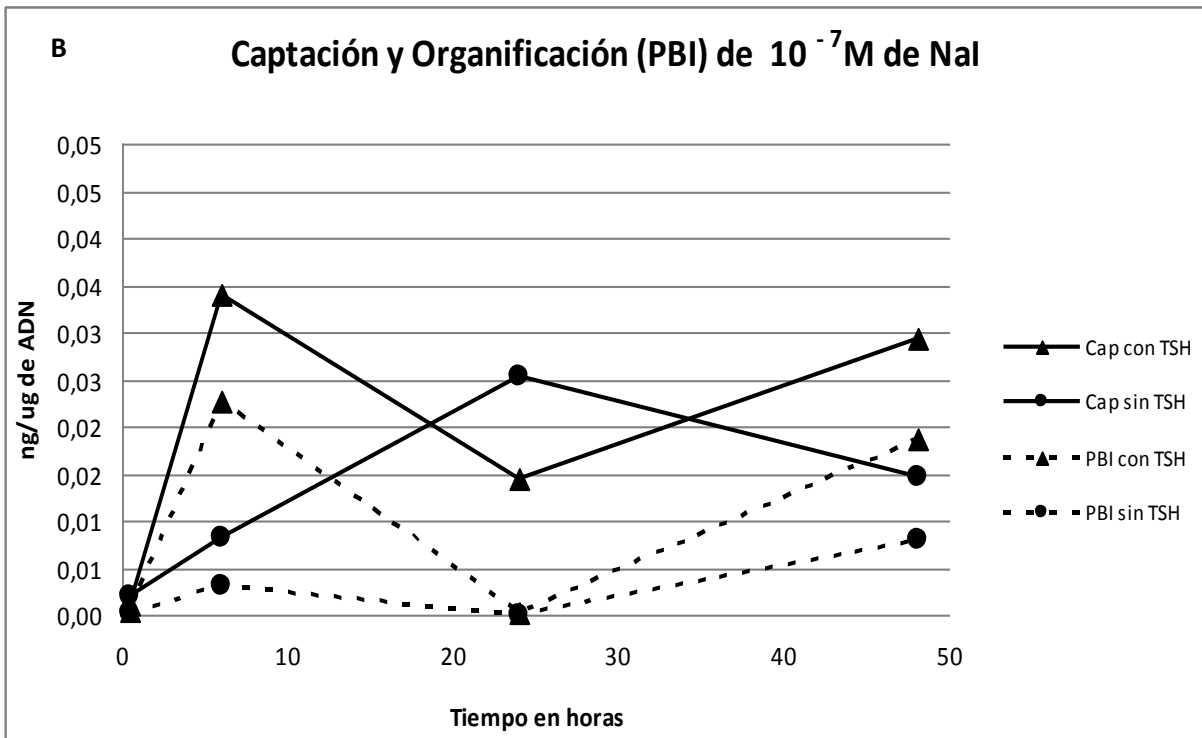
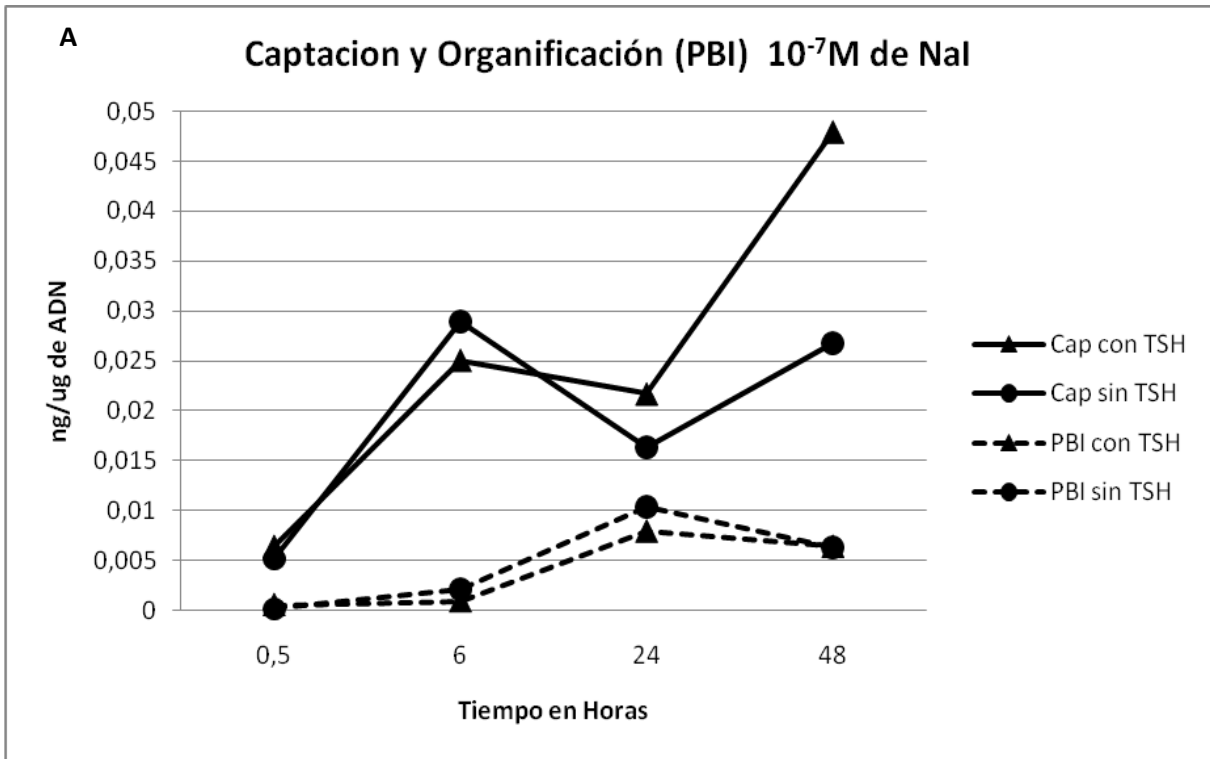


Figura 16. Captación y organificación a 10^{-7} M de NaI¹²⁷ en ausencia y presencia de 1mU/mL de TSH, utilizando como trazador 2,5 μ ci de NaI¹²⁵ en tiempos de 0,5, 6, 24, y 48h.

La organificación se mantuvo baja con respecto a los valores de captación (Figs. 16. A.B.), y sin presentar una diferencia marcada entre los tratamientos con y sin TSH.

En los experimentos realizados con 10^{-3} M de NaI (Figs. 17. A. B) se observan valores de captación mayores a los obtenidos para 10^{-7} M de NaI (Figs. 16. A. B), lo que sugiere que la captación en los folículos es proporcional a la concentración de NaI ¹²⁷. La mayor captación se presentó en los tratamientos en presencia de TSH exceptuando la hora 48 (Fig. 17. A).

La organificación para los dos experimentos de 10^{-3} M de NaI mostró valores mínimos en los distintos tiempos de medida sin presentarse diferencia entre tratamientos con y sin TSH (Figs. 17. A. B). En los dos experimentos de 10^{-3} M de NaI se mantiene una proporción del yoduro organificado con respecto al yoduro captado (Figs. 17. .A. B). Este comportamiento responde a la descripción del efecto Wolff - Chaikoff.

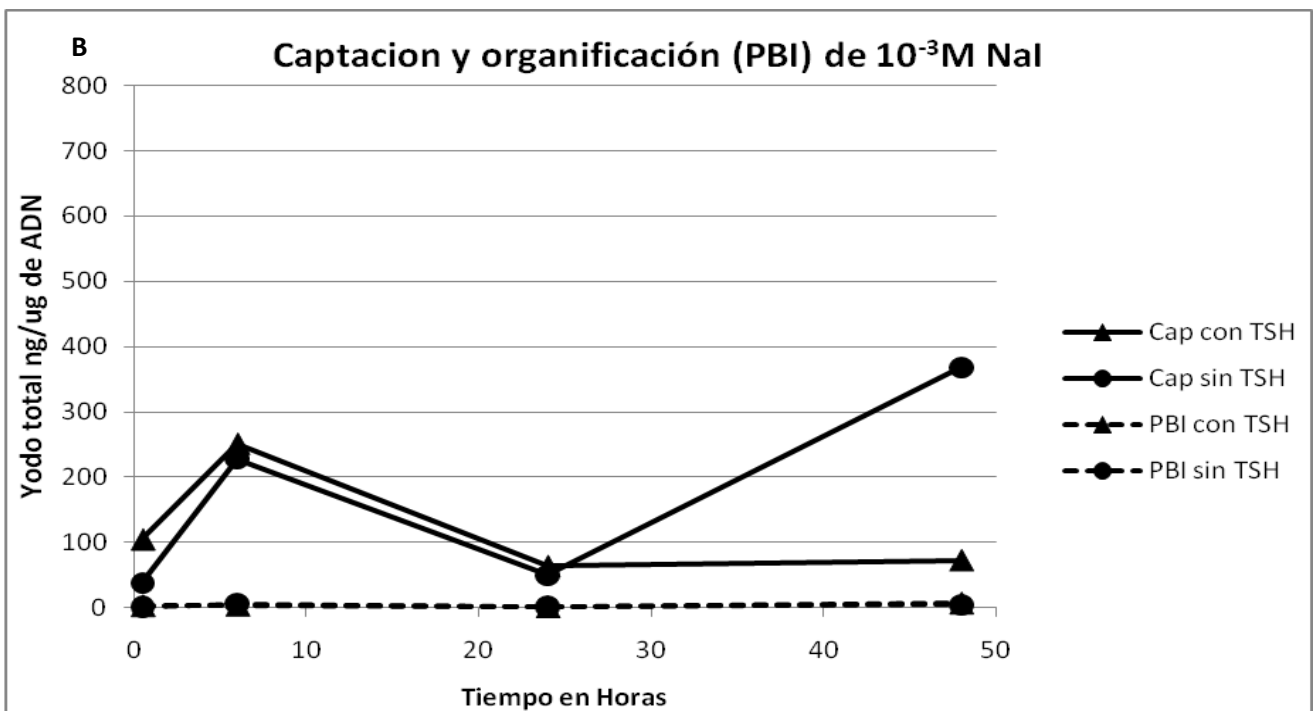
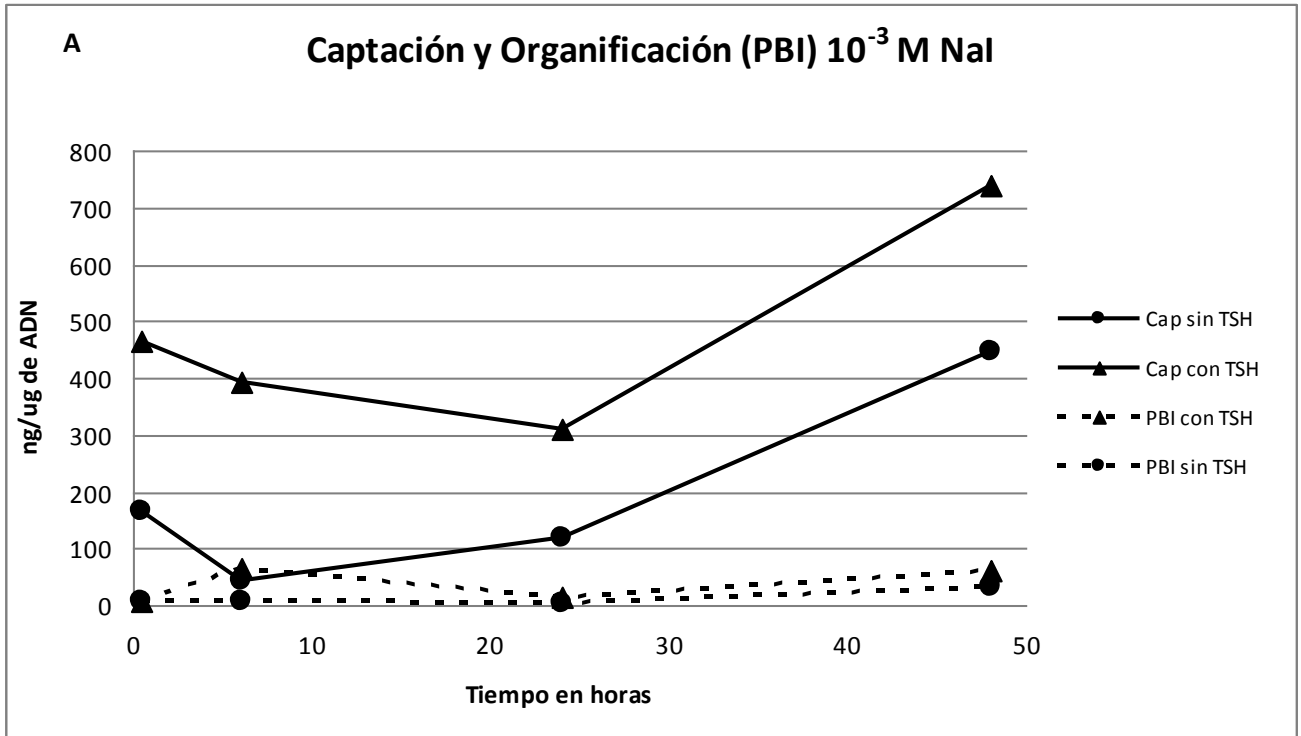


Figura 17. A. B. Captación y organificación a 10^{-3} M de NaI^{127} en presencia y ausencia de 1mU/mL de TSH, utilizando como trazador 25 μci de NaI^{125} en tiempos de 0,5, 6, 24, y 48h.

Comparando los distintos resultados para captación, se observó que los valores fueron incrementando a medida que se aumentaba la dosis de yoduro evidenciando que la captación va en proporción a la dosis (Fig. 18).

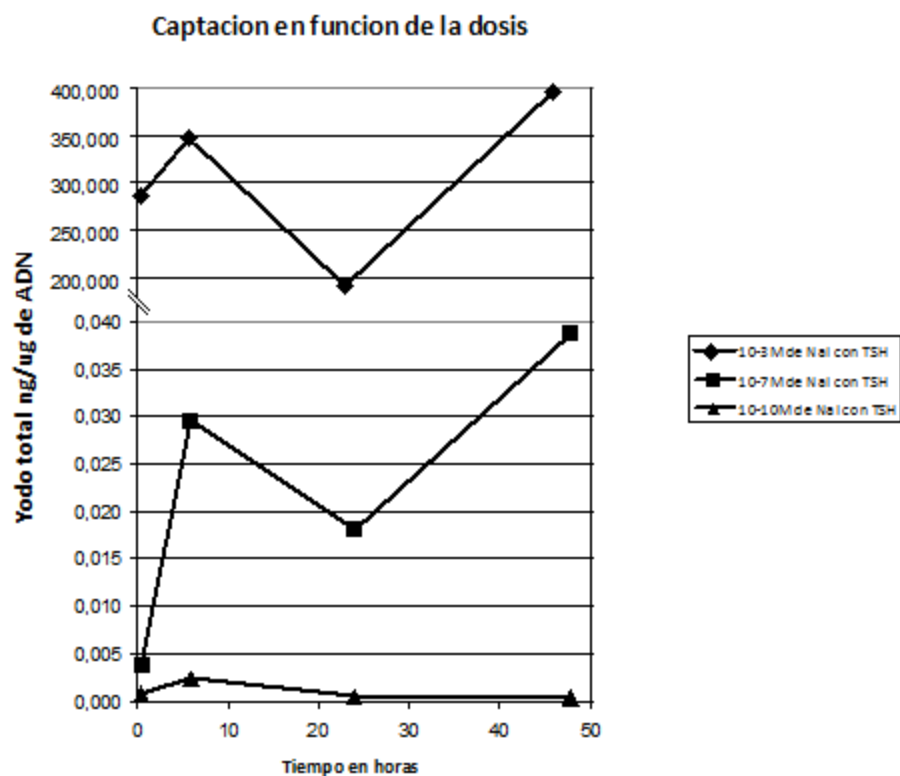


Figura 18. Captación de yoduro por los folículos en cultivo. Nótese que la función de captación es directamente proporcional a la concentración de yoduro frío en el medio de cultivo.

Tratamientos con Perclorato (ClO_4^-)

Para comprobar si el yoduro captado, en los experimentos anteriormente mencionados, es dado por actividad fisiológica del folículo mediante el cotransportador de membrana (NIS) o por difusión facilitada debido a las distintas concentraciones de yoduro utilizadas, se realizó una serie de experimentos donde a folículos cerrados en cultivo a concentraciones de 10^{-7} , 10^{-3} M de NaI y en ausencia de NaI se les adicionó $30\mu\text{M}$ de perclorato (inhibidor competitivo de NIS), tomándose medidas de captación y organificación en los siguientes tiempos 0.5, 6, 24, y 48 horas.

En el grupo experimental donde se adiciono 30 μ M de ClO₄⁻ sin NaI¹²⁷ (Fig. 19) no se observan valores de captación y organificación en ningún punto, de forma similar a los resultados obtenidos en la Fig 15 sin yoduro frío.

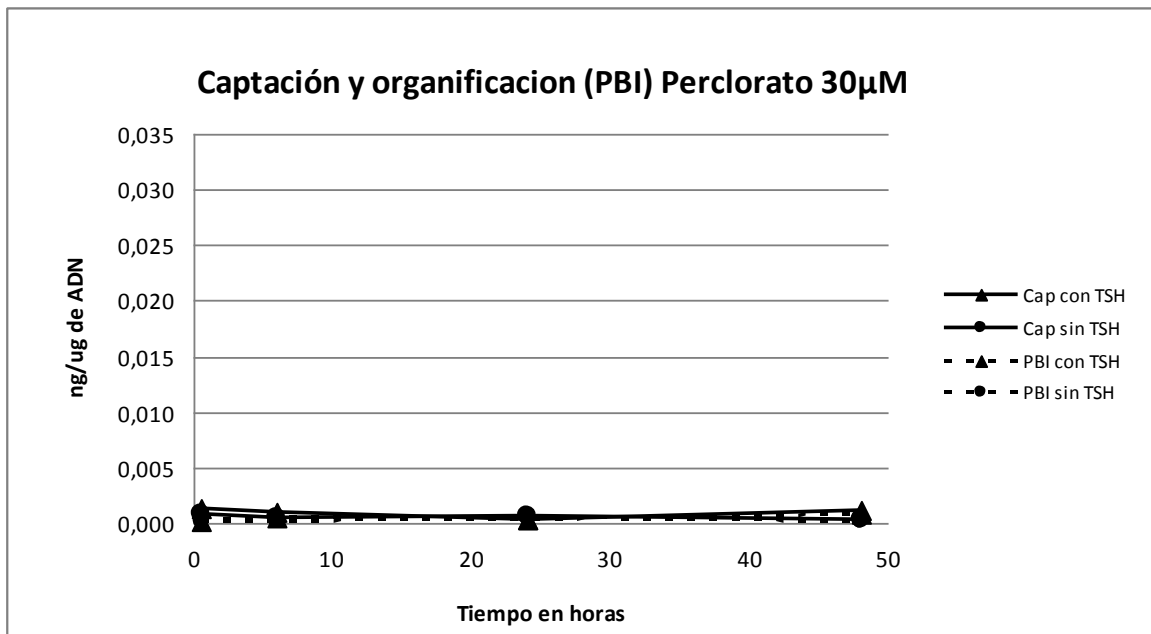


Figura 19. Captación y organificación sin NaI¹²⁷ en presencia y ausencia de TSH, utilizando 30 μ M de ácido perclórico y como trazador 2,5 μ ci de NaI¹²⁵ en tiempos de 0,5, 6, 24, y 48h.

En cultivo con 10⁻⁷M de NaI y 30 μ M de ClO₄⁻ (Fig 20), se observaron valores de captación y organificación hasta la hora 6 para los tratamientos con TSH y para los tratamientos sin TSH hasta la hora 24 (Fig 20), presentando valores mayores con TSH mostrando que una gran parte de lo captado se organificado y el perclorato logra inhibir la captación del yoduro a partir de 8 horas sin TSH y a las 24 horas con TSH (Fig 20).

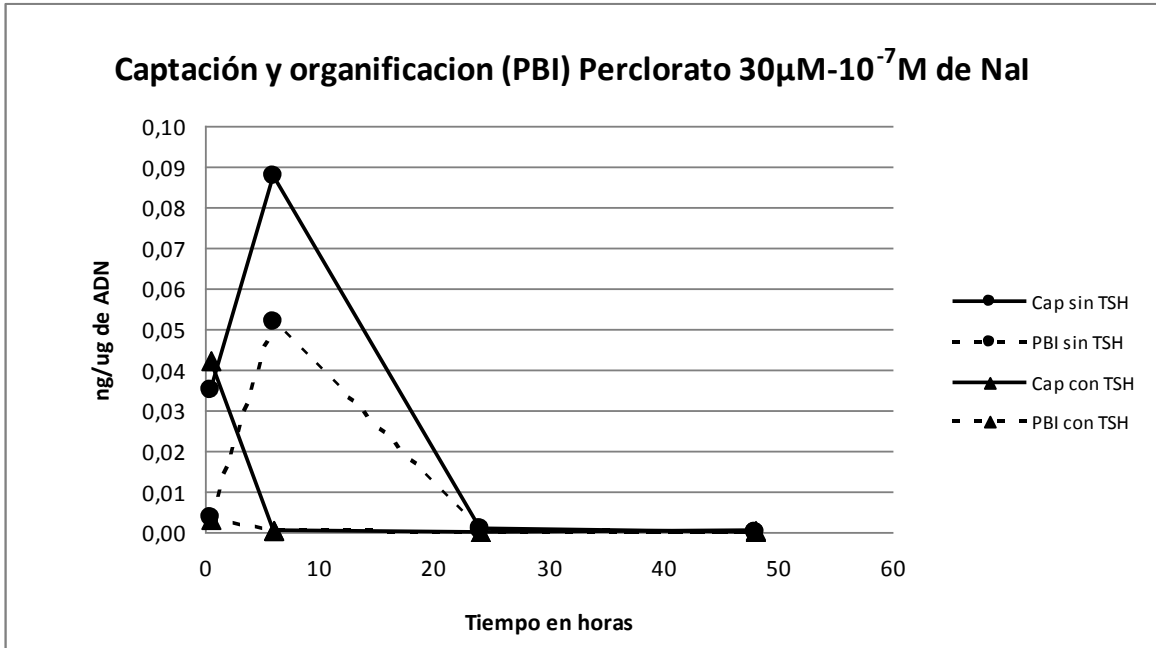


Figura 20. Captación y organificación a 10^{-7} M de NaI^{127} en presencia y ausencia de TSH, utilizando $30 \mu\text{M}$ de ácido perclórico y como trazador $2,5 \mu\text{ci}$ de NaI^{125} en tiempos de 0.5, 6, 24, y 48h.

En los cultivos donde se trabajó con 10^{-3} M de NaI mas $30\mu\text{M}$ de ClO_4^- (Fig 21), se observó una mayor captación de yoduro en comparación al experimento con 10^{-7} M de NaI . Así mismo se presentó un bloqueo de la captación entre la hora 0.5 y 6 para los tratamientos con TSH, y para los tratamientos sin TSH se presentó el bloqueo entre la hora 6 y 24 (Fig 21). La organificación con respecto a la captación es mínima desde la hora 0.5.

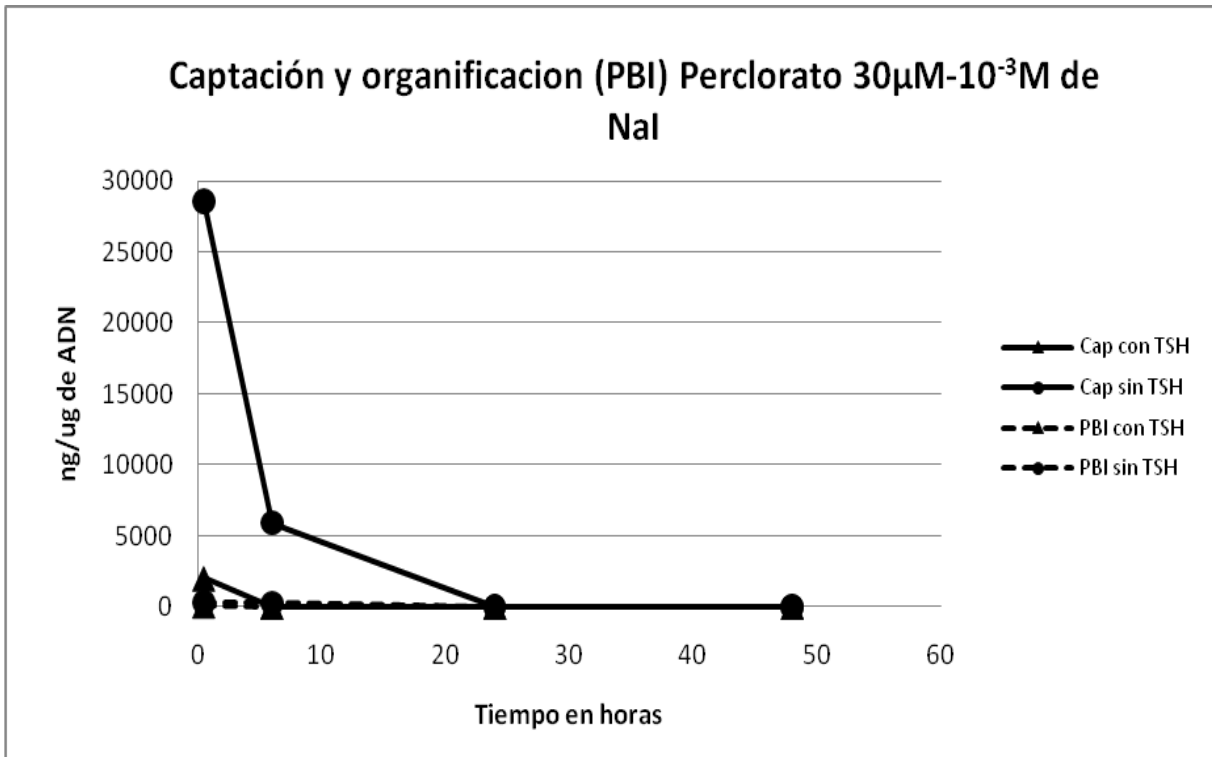


Figura 21. Captación y organificación a 10^{-3} M de NaI^{127} en presencia y ausencia de TSH, utilizando $30 \mu\text{M}$ de ácido perclórico y como trazador $25 \mu\text{Ci}$ de NaI^{125} en tiempos de 0,5, 6, 24, y 48h.

Los valores de captación en presencia de perclorato fueron incrementando directamente proporcional a la dosis de yoduro frío utilizados (Fig 22), de forma similar a los experimentos donde no se utilizó perclorato (Fig 18).

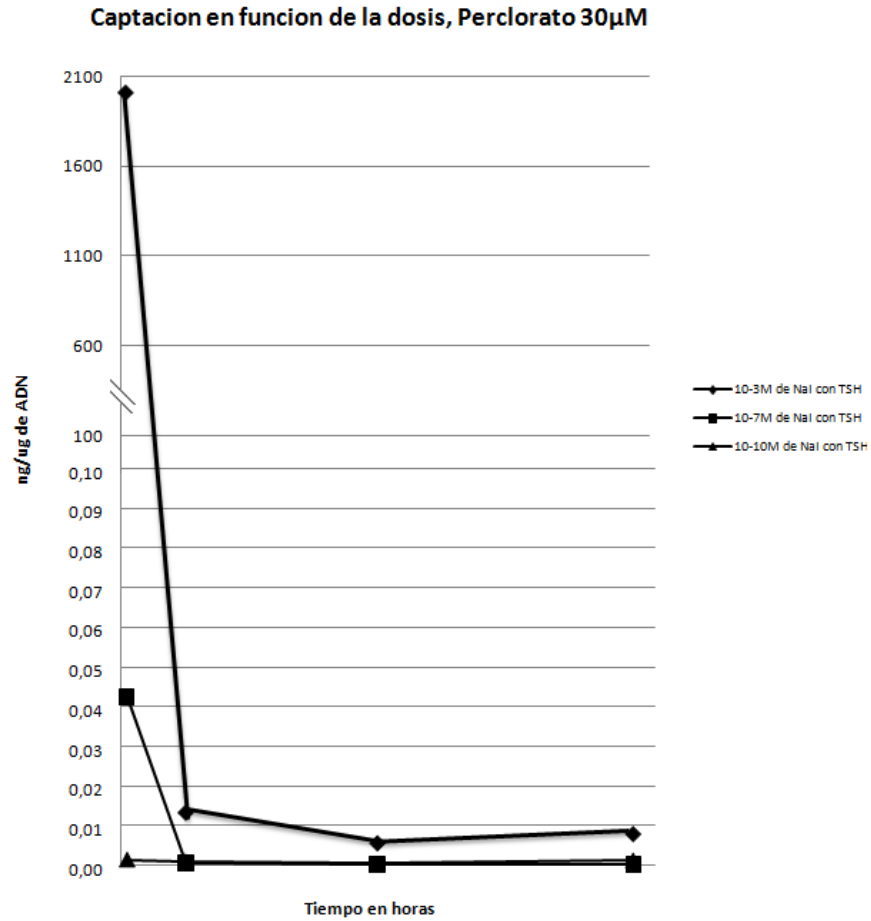


Figura 22. Captación de yoduro por los folículos en cultivo en presencia de 30uM de perclorato. La función de captación en presencia de perclorato es directamente proporcional a la concentración de yoduro frío en el medio de cultivo.

7. DISCUSION

Antes de iniciar la discusión de nuestros resultados, es conveniente mencionar los resultados obtenidos en los trabajos precedentes del grupo con las tiroides obtenidas en el Frigorífico Guadalupe, siendo este el lugar donde se adquirieron las glándulas que se emplearon en este trabajo. En la Fig 23. A, se aprecia el epitelio casi plano de los folículos de la tiroides de cerdo aspecto muy similar a una tiroides hipotiroidea, a diferencia de folículos normales donde se observa un epitelio cubico (Fig. 23. C) (Many, 1982). Lo cual se corrobora en la ultra-estructura de los tirocitos de estos folículos, (Fig. 23. B. C), donde se aprecia que presentan un retículo endoplasmático rugosa (RER), y un complejo de Golgi conspicuo, pocas microvellosidades, reforzando que son células hipofuncionales (Denef, 1980; Many, 1980).

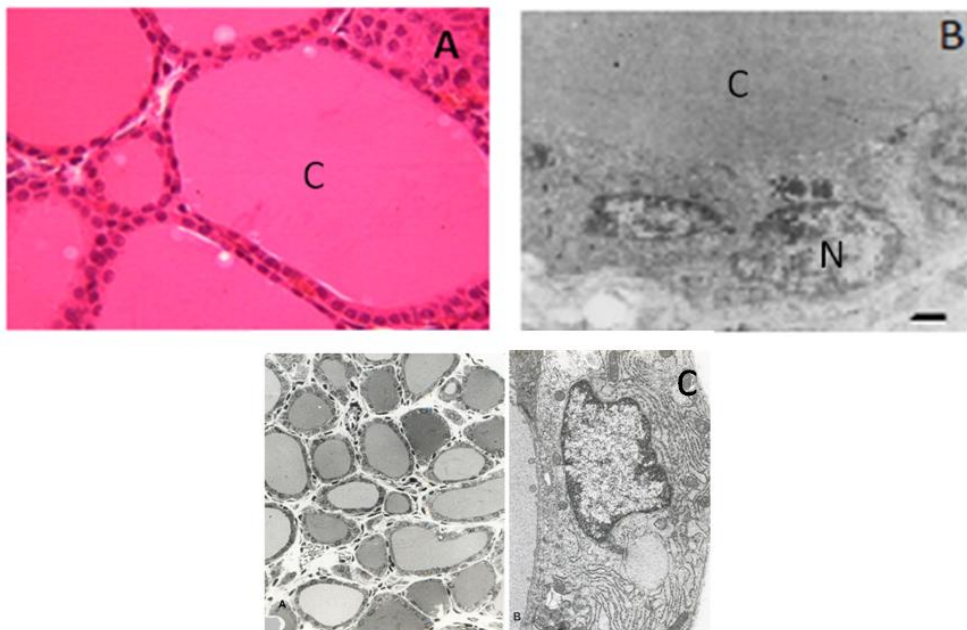


Figura 23. Morfología Tiroides de cerdo. A. Corte histológico de la tiroides de cerdo obtenido en Frigorífico Guadalupe. Nótese que el epitelio folicular es cúbico muy bajo casi plano, similar a una glándula hipotiroidea. C: Coloide (MO: H y E, Barra 120 μ m). B. Aspecto de los tirocitos en microscopio electrónico de los folículos de A. Se evidencia el aspecto casi plano de las tirocitos, escaso retículo endoplasmático rugoso y complejo de Golgi, morfología similar a una célula hipotiroidea, C: Coloide, N: Núcleo (ME: Barra 1,5 μ m). Imágenes del grupo tomado de Herrera, 2007. C. Tejido de tiroides normal izquierda nótese el epitelio cubico M.O 220X derecha Ultra-estructura de tirocito M.E. 16,000X, Tomado de Many, 1982 y Spinel, 1987.

Las muestras tomadas para realizar los experimentos de este trabajo, fueron heterogéneas, ya que se utilizaron 4 glándulas por experimento. Esto permitió tener una muestra aleatoria y representativa de la población de cerdos procedentes de diferentes fincas, sacrificados en el frigorífico Guadalupe.

En el desarrollo de los primeros cultivos se observaron variables inherentes del tejido y condiciones metodológicas en el desarrollo de este, que influyeron en el número de folículos cerrados viables. Las variables inherentes del cultivo se observaban de forma macroscópica, por la heterogeneidad de la muestra debido al origen de éstas. Para homogeneizar este material, la totalidad de cultivo fue mezclado y posteriormente dejado en preincubación durante 8 horas, antes de ser sometido a las distintas condiciones del cultivo.

En los primeros experimentos, se obtuvieron agregados celulares en mayor proporción que los folículos cerrados, lo cual generó datos que no pudieron ser normalizados y cuantificados sobre μg de ADN (Fig 12). Este resultado se atribuye a una fuerte digestión mecánica, la cual abre los folículos, también pudo ser afectado negativamente el cultivo debido a condiciones propias como: problemas de incubación, falta de humedad y CO_2 . Sin embargo, los resultados de estos primeros experimentos permitieron demostrar que los folículos que estén cerrados desde el principio del cultivo, pese a las condiciones adversas, logran estar funcionales en este caso hasta las 48 horas.

Estos primeros resultados, permitieron mejorar la forma de realizar la digestión mecánica cambiando a pipeteos suaves creando la menor turbulencia en el medio, así mismo se mejoraron las condiciones de cultivo.

Estos cambios permitieron obtener folículos cerrados, lo cual se verificó con la prueba de exclusión de azul Tripán, al igual se realizó un control posterior a la medición de captación, para asegurar que los folículos continuaban cerrados para la posterior medición de organificación por medio de la observación de la muestra en un microscopio óptico.

Medidas de Captación y Organificación

Dado que se estaba trabajando con folículos cerrados y viables, lo cual fue comprobado con las pruebas de viabilidad y observaciones al microscopio después de realizado el proceso de captación (Fig 13 y 14), en el presente trabajo se esperaba obtener un comportamiento de captación y organificación en los distintos tiempos similar al reportado por Spinel (1987) en folículos de rata, obteniendo porcentajes de organificación cercanos al 90% con respecto a los de captación (Fig 8).

La relación entre la captación y la organificación del yoduro total en todos los experimentos, mostró que la unión de yoduro a proteínas fue muy baja con respecto al yoduro captado por los folículos. Así mismo, ningún experimento mostró diferencia marcadas entre los tratamientos con y sin TSH, lo que muestra que los folículos no se comportaron como se ha reportado *in vitro e in vivo*, para folículos normales (Spinel, 1987).

Según la literatura (Spinel, 1987), en folículos normales de rata y en concentraciones de 10^{-10} y 10^{-7} M de NaI se presenta una relación de organificación con respecto a captación por encima del 90%. Los datos obtenidos de los experimentos no muestran este comportamiento. En los experimentos de 10^{-7} M de NaI (Figs. 16. A. B) y sin NaI (Fig. 15), la organificación es muy baja con respecto a lo captado (porcentaje menor al 60%). Este comportamiento puede sugerir que la glándula no presenta un comportamiento fisiológico como lo mostraron Spinel (1987) *in vitro* y Wolff y Chaikoff (1948) *in vivo* en ratas.

En ninguno de los experimentos se observaron diferencias entre los tratamientos con y sin TSH, a ninguna de las concentraciones de NaI. Este es un resultado que no se ajusta a lo que ha sido observado *in vivo* en una glándula tiroidea normal e *in vitro* en cultivos de folículos de rata, en los que se observa una regulación dada por la TSH de vías celulares encargadas de la captación y organificación (Dayem *et al.* 2006). En condiciones normales, se esperaría que los tratamientos con TSH presenten valores de organificación por encima del 90% de los valores captados,

contrario a los tratamientos sin TSH, donde se esperaría observar un decaimiento de la captación y organificación desde el primer día de cultivo (Fig. 8).

Al presentar una organificación por debajo del 90% de la captación en los distintos grupos experimentales y una baja respuesta fisiológica de los folículos a la TSH; se puede sugerir que el tejido tiroideo con el que se trabajó presenta una respuesta funcional diferente a la reportada por Spinel 1987. Este resultado va acorde con el trabajo morfológico realizado por Herrera *et al* (2008) en el cual se trabajo con muestras procedentes del frigorífico Guadalupe.

Herrera y colaboradores (2008), reporta folículos morfológicamente hipotiroideos (Fig 22. A. B), los cuales no responden a la TSH hasta el tercer día de cultivo. En nuestros datos no se observa una respuesta evidente a la TSH, esto puede deberse a que las muestras solo duraron 48 horas bajo observación. La patología hipotiroidea se caracteriza por una baja organificación (Lewis *et al.*, 1963), la cual fue evidente en todos los experimentos realizados, independiente de los valores de captación que se presentaron.

El experimento sin NaI presenta medidas de captación y organificación muy bajas, lo cual indica que los trazos de yoduro en el agua son mínimos. Este experimento evidencia un funcionamiento anormal del tejido, ya que la captación y la organificación fueron medidas muy bajas pero muy cercanas, lo que indica que por más que el folículo capte una mayor cantidad de yoduro, como en las otras concentraciones (10^{-7} y 10^{-3} M de NaI) tiene un “límite” para la organificación dada por la anormalidad en su función.

Los resultados obtenidos para la concentración de 10^{-3} M de NaI, muestran una organificación mínima a lo largo del tiempo, no se evidencia una diferencia marcada entre los tratamientos con y sin TSH. Las medidas de organificación observadas en este grupo experimental son características, ya que en la concentración de 10^{-7} M de NaI la organificación con respecto a la captación es mínima, pero es posible observar variaciones en el tiempo, encontrando picos altos y bajos de organificación. En 10^{-3} M de NaI esto no ocurre, lo que podría

demostrar que se está presentando el efecto Wolff-Chaikoff ya que hay inhibición de organificación desde el primer momento, como reporta Wolff y Chaikoff (1948), en experimentos *in vivo* a concentraciones de 10^{-4} M de NaI en rata.

Algunos autores (Langer *et al.*, 2003) reportan que el yoduro a altas concentraciones es tóxico, pero los resultados de este trabajo permiten observar que a una concentración de 10^{-3} M de NaI los folículos son funcionales, evidenciado por los valores de captación a las 48 h de cultivo, siendo estos los más altos para esta concentración de NaI.

Los resultados muestran que la captación se comportó en proporción a la concentración de yodo, lo cual generó valores de captación mayores para 10^{-3} M de NaI seguidos por los datos de 10^{-7} M de NaI y finalmente los valores más bajos, para el experimento sin NaI (Fig. 18); este mismo comportamiento fue observado en los tratamientos con perclorato (Fig. 22).

Teniendo en cuenta lo anterior, los estudios previamente realizados y los resultados obtenidos en el presente trabajo, podríamos sugerir que los folículos presentan una función similar a folículos hipotiroideos, debido probablemente a una dieta alta en yoduro. El hipotiroidismo se evidencia por una organificación baja y concentración de TSH alta en el plasma; esto indicaría como vienen los folículos al principio del cultivo y muy posiblemente el punto de inicio, por lo cual se observa que no responden a la TSH hasta que logran estabilizarse a las condiciones del medio, como lo reporta Herrera y colaboradores (2008). Al encontrarse en un medio bajo en yoduro 10^{-7} M de NaI o en ausencia de este, el folículo debe adaptarse a este cambio. Si el exceso de yoduro en la dieta produjo un hipotiroidismo reversible, al encontrarse en estas condiciones puede cambiar la respuesta al yoduro y tratar de retomar las condiciones de un folículo normal pasado un tiempo, posiblemente en el día tres.

Grupos experimentales con perclorato (ClO_4^-)

Cuando se aumenta la concentración del yoduro (competidor de menor sensibilidad) y se mantiene la concentración del perclorato (competidor de mayor

afinidad), se observa que la inhibición es total en captación y PBI pasada unas horas. A diferencia de la concentración de 10^{-10} M de NaI (Fig 19), la cual desde la primera hora se observa inhibición.

Las Figs 20 y 21 muestran que el perclorato no está ejerciendo una inhibición inmediata por competencia ya que se presentan medidas de captación y organificación durante las 24 h. Esto se puede explicar ya que el comportamiento cambia al aumentar la dosis de yoduro. Cuando las concentraciones de los competidores es similar, la inhibición no se da inmediatamente en el tiempo, según Dohaín y colaboradores (2007), esto puede durar entre la hora 4 y 6. En las concentraciones de 10^{-3} y 10^{-7} M de NaI, se observa inhibición entre las horas 6 y 24. Sin embargo el tiempo exacto de inhibición según la dosis no pudo ser identificado por la diferencia de tiempo entre una medida y otra.

8. CONCLUSIONES

- El modelo tridimensional es reproducible para pruebas funcionales en cerdo.
- El material trabajado se comporta de forma similar a una glándula hipotiroidea por lo cual sus resultados no pueden ser homologados a un modelo de tiroides normal.
- La captación se comportó en proporción a la dosis. La organificación presentó niveles por debajo del 90% de lo captado. Lo que refuerza un modelo de glándula hipotiroidea.
- En ninguna de las concentraciones de yoduro utilizada se observó respuesta a la TSH.
- El efecto Wolff-Chaikoff se presentó en la concentración de 10^{-3} M de NaI, ya que desde la hora 0.5 la organificación mantuvo valores mínimos con respecto a lo captado, lo que demuestra que los folículos son funcionales y capaces de reproducir el efecto *in vitro*.
- Cuando se aumenta la concentración del yoduro y se mantiene la concentración del perclorato, se observa que la inhibición es total para captación y organificación pasadas las 6 primeras horas. A diferencia de la concentración de 10^{-10} M de NaI, la cual presenta inhibición desde la primera hora.
- El resultado funcional va acorde a lo observado morfológicamente por el grupo, concluyendo que se está trabajando con un modelo de folículos de cerdos que no tienen un comportamiento normal (Hipotiroidismo).

9. RECOMENDACIONES

- Realizar prueba de autoradiografía para asegurar folículos cerrados. Ya que el azul Tripán no permite establecer si realmente los folículos están cerrados.
- En caso de continuar trabajando con muestras del Frigorífico Guadalupe, es aconsejable prolongar el tiempo de pre incubación a 48h. Permitiendo una mejor respuesta a los tratamientos y así mismo un comportamiento de folículos normales.
- Modificar el protocolo utilizado, ya que el material de cultivo para pruebas funcionales no es adecuado. Haciéndose necesario un gran número de digestiones lo cual ocasiona heterogeneidad en los resultados dificultando el análisis de estos.
- Realizar el mismo trabajo descrito anteriormente en una glándula de cerdo normal e *in vivo*.

10.REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Berne R y Levy M. Fisiología. 2 ed. España: Editorial Mosby Year Book.; 1993. Pag 547 – 556.
2. Braverman L y Ingbar S. Changes in thyroidal function during adaptation to large doses of iodide. J. Clin. Inv 1963;42(8), 198 - 207.
3. Burikhanov B y Matsuzaki S. Excess Iodine Induces Apoptosis in the Thyroid of Goitrogen-Pretreated Rats *in vivo*. Thyroid. 2000: 10(2): 123-129.
4. Burton K. A Study of the Conditions and Mechanism of the Diphenylamine Reaction for the Colorimetric Estimation of Deoxyribonucleic. Acid. Biochem. J. 1955: 62, 315–323.
5. Cardoso L, Martins D, Figueiredo M, Rosentha. D, Vaisman M, Violante A y Carvalho, D. Ca²⁺/Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate-Dependent H₂O₂ Generation Is Inhibited by Iodide in Human Thyroids. J. Clin. End. & Metab. 2001: 86(9), 4339-4343.
6. Carrel A y Burrows M. Cultivation in vitro of the thyroid gland. Jour. Exper. Med. 1911: 387(8), 416-421.
7. Chambard M, Gabrion J y Mauchamp J. Influence of collagen gel on the orientation of epithelial cell polarity: Follicle formation from isolated thyroid cells and from preformed monolayer. J Cell Biol. 1982;91(1):157-166.
8. Dayem M, Navarro V, Marsault R, Darcourt J, Lindenthal S y Pourcher T. From the molecular characterization of iodide transporters to the prevention of radioactive iodide exposure. J. Biochi. 2006: 88, 1793–1806.
9. De la Vieja A, Dohan O, Levy O y Carrasco N. Molecular Analysis of the Sodium/Iodide Symporter: Impact on Thyroid and Extrathyroid Pathophysiology. Physiol. Rev. 2000: 80(3), 1083-1105.
10. Delorme N, Remond C, Sartelet H, Petitfrere E, Clement C, Schneider C, Bellon G, Virion A, Haye B y Martiny L. TGFbeta1 effects on functional activity of porcine thyroid cells cultured in suspension. Endocrinology 2002: 173(2): 345-355.
11. Deneff J-F, Björkman U, Ekhölm R. Structural and functional characteristics of isolated thyroid follicles. J Ultrastruct Res. 1980;71:185-202.

12. Dohan O, De la vieja A, Paroder V, Riedel C, Artani M, Reed M, Ginter C y Carrasco N. The sodium/iodide symporter (NIS): Characterization, Regulation and Medical Significance. *The Endocrine Society*. 2003: 24(1), 48-77.
13. Dohan O, Portulano C, Basquin C, Reyna-Neyra A, Amzel L, y Carrasco N. The Na⁺/I symporter (NIS) mediates electroneutral active transport of the environmental pollutant perchlorate. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007: 104(51):20250-20255.
14. Eng P, Cardona G, Previti M, Chin W y Braverman L. Regulation of the Sodium Iodide Symporter by Iodide in FRTL-5 cells. *Eur J Endocrinol.* 2001: 144, 139-144.
15. Eng P, Cardona G, Fang S, Previti M, Alex S, Carrasco N, Chin W y Braverman L. Escape from the Acute Wolff-Chaikoff Effect Is Associated with a Decrease in Thyroid Sodium/Iodide Symporter Messenger Ribonucleic Acid and Protein. *Endocrinology*. 1999: 140 (8), 3404-3410
16. Fayet G, Hovsépian S, Dickson I y Lissitzky S. Reorganization of porcine thyroid cells into functional follicles in a chemically defined, serum-and thyrotropin free medium. *J Cell Biol*. 1982:93(2):479-488.
17. Fayet G, Michel-Bchet M y Lissitzky S. Thyrotrophin-Induced Aggregation and Reorganization into Follicles of Isolated Porcine-Thyroid Cells in Culture. *Em. J. Biochem*. 1971: 24, 100-111.
18. Ferreira A, Lima L, Araujo R, Müller G, Rocha R, Rosenthal D y Carvalho D. Rapid regulation of thyroid sodium-iodide symporter activity by thyrotrophin and iodine. *Endocrinology*. 2005: 184, 69-76.
19. Forteza R, Salathe M, Miot F, Forteza R y Conner G. Regulated Hydrogen Peroxide Production by Duox in Human Airway Epithelial Cells. *Cell Mol Biol*. 2005: 32, 462-469.
20. Gardas A, Lewartowska A, Sutton B, Pasięka Z, Mcgregor A y Banga J. Human Thyroid Peroxidase (TPO) Isoforms, TPO-1 and TPO-2: Analysis of Protein Expression in Graves' Thyroid Tissue. *J. Clin. End. & Metab*. 1997: 82(11), 3752-3757.

21. Gartner L y Hiatt J. Texto Atlas de Histología. 2 ed. Mexico: Editorial Mc Graw Hill.; 2002. Pag 297 – 301.
22. Gruffat D, Venot N, Marriq C y Chabaud O. Thyroid Hormone Synthesis in Thyroglobulin Secreted by Porcine Thyroid Cells Cultured on Porous Bottom Chambers. Effect of Iodide. *Endocrinology* 1992: 131(6), 2921-2927.
23. Haiyan S y Carayanniotis G. Induction of Goitrous Hypothyroidism by Dietary Iodide in SJL Mice. *Endocrinology*. 2007: 148(6), 2747-2752.
24. Hapon M, Varas S, Jahn G y Giménez M. Effects of hypothyroidism on mammary and liver lipid metabolism in virgin and late-pregnant rats. *J Lipid Res*. 2005, 46(6):1320-1330.
25. Herrera M, Ondo A, Bernal E y Spinel C. Estudio Morfológico del Cultivo a Largo Plazo de Folículos Aislados y Cerrados de Tiroides de Cerdo. *Acta Biol. Colomb*. 2008: 13(3), 49 – 60.
26. Herrera M. Caracterización morfológica y ultra-estructural de foliculos de tiroides de cerdo cerrados aislados y en cultivo tridimensional [Tesis de pregrado]. Bogota: Departamento de Biología, Facultad de ciencias, Universidad Militar Nueva Granada; 2007.
27. Karlsson F, Westermark K y Westermark B. Functional properties of porcine-thyroid follicles in suspension. *Mol Cell Endocrinol*. 1982;28:99-112..
28. Kogai T, Curcio F, Hyman S, Conford E, Brent G y Hershman J. Induction of follicle formation in long-term cultured normal human thyroid cell treated with thyrotropin stimulates Iodide uptake but not sodium/Iodine Simporter messenger RNA and protein expression. *Endocrinology*. 2000: 167, 125-135.
29. Lally E y Sassone C. Thyroid-stimulating hormone (TSH)-directed induction of the CREM gene in the thyroid gland participates in the long-term desensitization of the TSH receptor. *PROC. NATL. ACAD. SCI. Biochemistry*. 1995: 92(21), 9633–9637.

30. Langer R, Burzler C, Bechtner G y Gartner R. Influence of Iodide and Iodolactones on Thyroid Apoptosis. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2003; 111, 325-329.
31. Marine D y Feiss H. The absorption of potassium iodide by perfused thyroid glands and some of the factors modifying it. *J. Pharmacol. and. Exp. Therap.* 1915: 7(5), 557-576.
32. Martin J, Banda M, Hittelman K, y Tahmassian A. Radiation Safety Training Manual. UCSF Environmental Health and Safety. University of California, San Francisco. 2002
33. Mero R. Tratado de Fisiología médica. Madrid: Editorial Mc Graw Hill Interamericana. ; 2001. Pag. 709-734.
34. Morand S, Chaharoui M, Kaniewski J, Dème D, Ohayon R, Noel-hudson. M, Virion. A. y Dupuy. C. Effect of Iodide on Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Oxidase Activity and Duox2 Protein Expression in Isolated Porcine Thyroid Follicles. *Endocrinology*. 2003; 144(4):1241–1248.
35. Morton M y Chaikoff I. The formation *in vitro* of thyroxine and diiodotyrosine by surviving thyroid tissue with radioactive iodine as indicator. *J. Biol. Chem* 1942:147, 1-9.
36. Morton M, Chaikoff I y Rosenfeld S. Inhibiting effect of inorganic iodide on the formation in vitro of thyroxine and diiodotyrosine by surviving thyroid tissue *J. Biol. Chem* 1944: 157, 381-387.
37. Mussart N y Coppo J. Variaciones fisiológicas de los lípidos séricos en porcinos del nordeste argentino. *Comunicaciones Científicas y Tecnológicas*. 2006: 007.
38. Nobuyuki T, Shinichi O, Ichiro K, y Takashi Y. Requirements of Follicle Structure for Thyroid Hormone Synthesis; Cytoskeletons and Iodine Metabolism in Polarized Monolayer Cells on Collagen Gel and in Double Layered, Follicle-Forming Cells. *Endocrinology*, 1992. 131(3): 1143-1148,
39. Paul R, Kerkof J, Long P y Chaikoff I. *In Vitro* Effects of Thyrotropic Hormone on the Pattern of Organization of Monolayer Cultures of Isolated Sheep Thyroid Gland Cells. *Endocrinology* 1964: 74(2), 170-179.

40. Pearce E, Gerber A, Gootnick D, Khan L, Li, R, Pino y Raverman L. Effects of Chronic Iodine Excess in a Cohort of Long-Term American Workers in West Africa. *J. Biol. Chem* 2002: 87(12), 5499-5502.
41. Riedel C, Levy O y Carrasco N. Post-transcriptional Regulation of the Sodium/Iodide Symporter by Thyrotropin. *J. Biol. Chem* 2001: 276(24), 21458 – 21463.
42. Riou C, Remy C, Rabilloud R, Rousset B y Fonlupt P. H₂O₂ induces apoptosis of pig thyrocytes in culture. *Journal of Endocrinology* 1998: 156(2): 315-322.
43. Roppa, L. La importancia del cerdo en la medicina humana. 2008. www.aacporcinos.com.ar.
44. Schneider W. Determination of Nucleic Acids in Tissues by Pentose Analysis. *Meth. Enz.* 1945:3, 680-684.
45. Sidney C y Sidney H. "The Thyroid". 3 ed. New York: Editorial Medicad department, 1971.
46. Spinel C y Yildiz I. High doses of iodide is not toxic for rat thyroid follicles in culture. *Proceeding of the 10th International Thyroid Conferences*. Rotterdam 1991: 259.
47. Spinel C, Colin I, Van den Hove M y Deneff J. Correlated morphological and functional study of isolated rat thyroid follicles in suspension culture. *Mol Cell Endocrinol* 1990;71(2):141-153.
48. Spinel C. Aspects morphologiques et fonctionnels des follicules thyroïdiens en culture. Tesis de Doctorado. Université Catholique de Louvain. 1987.
49. Spitzweg, C, Harrington, K, Pinke L, Vile R y Morris. The Sodium Iodide Symporter and Its Potential Role in Cancer therapy. *J. Clin. End. & Metab.* 2001: 86(7): 3327-35.
50. Suzuki K, Lavaroni S, Mori A, Ohta M, Saito J, Pietrarelly M, Singer D, Kimura R, Katoht† A y Kawaoit† L. Kohn. Autoregulation of thyroid-specific gene transcription. *Medical Science* 1998: 95(14), 8251-8256.
51. Takasu N, Ohno. Komiya S y Yamada. T. Requirements of Follicle Structure for Thyroid Hormone Synthesis; Cytoskeletons and Iodine Metabolism in

- Polarized Monolayer Cells on Collagen Gel and in Double Layered, Follicle-Forming Cells. *Endocrinology* 1992;131(3), 1443-1448.
52. Teng X, Shan Z, Teng W, Fan C, Wang H y Guo R. Experimental study on the effects of chronic iodine excess on thyroid function, structure, and autoimmunity in autoimmune-prone NOD.H-2h4 mice. *Clin Exp Med* 2009, 9(1):51-59.
53. Tong W, Kerkof P, Chaikoff IL. Iodine metabolism of dispersed thyroid cells obtained by trypsinization of sheep thyroid glands. *Biochim Biophys Acta*. 1962;60:1–19.
54. Torres G. Memorias del Curso básico de protección radiológica para el manejo de material radioactivo. Unida de seguridad nuclear, protección radiológica y gestión ambiental. Ingeominas, Bogotá, 2002.
55. Tran N, Valentin, Blount BC, McCuistion CG, Fenton MS, Gin E, Salem A, Hershman JM. Thyroid-stimulating hormone increases active transport of perchlorate into thyroid cells. *Physiol Endocrinol Metab*. 2008;294(4):802-806.
56. Uyttersprot N, Pelgrims N, Carrasco N, Gervy C, Maenhaut C, Dumont J y Miot F. Moderate doses of iodide in vivo inhibit cell proliferation and the expression of thyroperoxidase and Na⁺/I⁻ symporter mRNAs in dog thyroid. *Mol Cell Endocrinol*. 1997: 131 (2): 195-203.
57. Vitale M, Matola T, D'ascoli F, Salzano S, Bogazzi F, Fenzi G, Martino E y Rossi G. Iodide Excess Induces Apoptosis in Thyroid Cells through a p53-Independent Mechanism Involving Oxidative Stress. *Endocrinology* 2000: 141(2), 598-605.
58. Wang K, Sun Y, Liu Y, Zhang L, Ye Y, Lin L, Yan Q y Chen Z. The Impact of Iodine Excess on Thyroid Hormone Biosynthesis and Metabolism in Rats. *Biological trace element research*. 2009: 130(1), 72-85.
59. Weiss R, Forrest† D, Pohlenz J, Cua K, Curran T y Refetoff S. Thyrotropin regulation by thyroid hormone in thyroid hormone receptor b-deficient mice. *Endocrinology* 1997: 138(9), 3624-3629.

60. Werner C e Ingbar H. The thyroid. 3 ed. New York: Editorial Harper & Row; 1971.
61. Wissig S. The Anatomy of Secretion in the Follicular Cells of the Thyroid Gland. I. The Fine Structure of the Gland in the Normal Rat. J. Biophysic. Biochem. Cytol. 1960: 7(3).
62. Wolff J y Chaikoff I. Plasma Inorganic Iodide as a Homeostatic Regulator of Thyroid Function. J. Biol. Chem. 1948:174(2), 555-565.
63. Wollman, S. Structure of the thyroid gland. Vissler M. Editor. The thyroid gland. New York: Raven Press; 1980.
64. Yoshida A, Hisatome I, Taniguchi S, Sasaki N, Yamamoto Y, Miake J, Fukui H, Shimizu H, Okamura T, Okura T, Igawa O, Shigemasa C, Green ED, Kohn LD y Suzuki K. Mechanism of iodide/chloride exchange by pendrin. 2004:145(9):4301-4308.