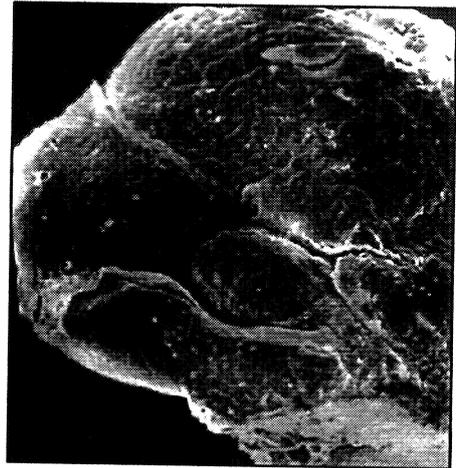
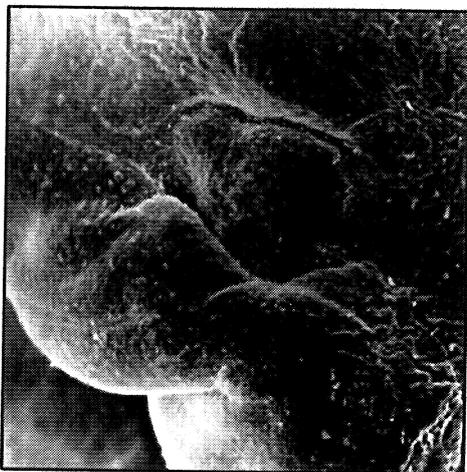


UNIVERSIDAD DE VALENCIA
Facultad de Medicina



**"ESTUDIO DEL DESARROLLO DEL
MACIZO CRANEOFACIAL Y DEL
GLOBO OCULAR EN UN MODELO
DE HIPOTIROIDISMO CONGENITO-
NEONATAL EN LA RATA"**



TESIS DOCTORAL
M^a. José Gamborino Jordá
Valencia, 2.000

DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA
UNIVERSIDAD DE VALENCIA
FACULTAD DE MEDICINA

**“ESTUDIO DEL DESARROLLO DEL
MACIZO CRANEOFACIAL Y DEL
GLOBO OCULAR EN UN MODELO
DE HIPOTIROIDISMO CONGENITO-
NEONATAL EN LA RATA”**

Trabajo de Investigación que presenta la Licenciada en Medicina y Cirugía

Dña. M^a JOSÉ GAMBORINO JORDÁ

para optar al grado de Doctor en Medicina y Cirugía.

VALENCIA, Abril de 2000

MARIA DOLORES PINAZO-DURAN, Doctor en Medicina y Cirugía, Especialista en Oftalmología e Investigador asociado del Centro de Investigación del Hospital Universitario LA FE,

CERTIFICA:

Que la tesis doctoral “Estudio del desarrollo del macizo craneofacial y del globo ocular en un modelo de hipotiroidismo congénito neonatal en la rata”, que presenta la Licenciada en Medicina y Cirugía **Dña. Maria José Gamborino Jordá**, se ha llevado a cabo bajo mi dirección en el Departamento de Biología y Patología Celular del Centro de Investigación del Hospital Universitario La Fe de Valencia. Considero que reúne las condiciones necesarias para optar al grado de Doctor en Medicina y Cirugía.

Y para que conste a todos los efectos, se expide el presente certificado en

VALENCIA a 10 de Abril de 2000



Sección Microscopía Electrónica
Centro de Investigación
HOSPITAL LA FE
Avda. Campanar, 21
46009 VALENCIA

Fdo. MARIA DOLORES PINAZO-DURAN



GENERALITAT
VALENCIANA

CONSELLERIA DE SANITAT

HOSPITAL UNIVERSITARIO "DR. PESET"

PILAR MARCO VENTURA, Doctora en Medicina y Cirugía,
Médico Adjunto Especialista de Oftalmología del
Hospital "Dr Peset" de Valencia,

CERTIFICA que MARIA JOSE GAMBORINO JORDA ha trabajado
bajo mi dirección, habiendo obtenido y estudiado per-
sonalmente el material del trabajo titulado
"Estudio del desarrollo del macizo facial y del globo
ocular en un modelo experimental de hipotiroidismo
congénito y neonatal en la rata".
Estudio que termina en el día de la fecha, con todo
aprovechamiento, habiendo la que suscribe revisado y
estando conforme con su presentación para ser juzgada
como Tesis Doctoral.

Valencia, 14 de Abril de 2000

CS 5/1

*Dedico este trabajo a mi madre y a mi hermana, que han sido
y siguen siendo mi apoyo constante.
A vosotras que sois mi mejor tesoro.*

Fuggi i precetti di quelli speculatori
che le loro ragioni non sono
confermate dalla isperienza

Leonardo da Vinci
1452-1519

Deseo expresar mi agradecimiento a todas las personas que han colaborado de una u otra forma con el desarrollo de este trabajo experimental:

Dra. M^a Dolores Pinazo y Durán, por haber sido mi estímulo durante todo este tiempo de investigación y de trabajo. Sin ti bien sabes que nunca hubiera llegado a fin esta tesis. Gracias por tu apoyo desinteresado y sobre todo por ser mi amiga por encima de todo. Quedan cortas las palabras para expresar todo mi agradecimiento.

Dra. Pilar Marco Ventura, oftalmólogo adjunto del Servicio de Oftalmología del Hospital Dr Peset de Valencia, por su colaboración en el desarrollo de esta tesis y sobre todo en sus inicios, que siempre es lo más difícil.

Dr. Alberto Muñoz Terol, profesor del Consejo Superior de Investigaciones Científicas de Madrid, por creer en mí y por hacerme sentir que un oftalmólogo clínico puede interesarse por la investigación básica. Gracias por ser el estímulo constante y el colaborador incansable.

Dr. Jaime Renau-Piqueras, profesor de Biología Celular de la Universidad de Valencia, por haberme cedido desinteresadamente su laboratorio y haber compartido tantas dificultades y esperanzas.

Dr. Jose Gonzalez Tomás, jefe del Servicio de Oftalmología del Hospital Dr Peset de Valencia, por haber sido mi profesor durante un periodo muy importante de mi vida, cuando comencé este trabajo y por todo lo que de él he aprendido.

Dr. Jose Luis Menezo Rozalén, catedrático de oftalmología de la Facultad de Medicina de Valencia, por aceptar ser el ponente de este trabajo de investigación. Gracias por su ayuda y confianza.

Dr. José Hernandez-Yago, del Instituto de Investigaciones Citológicas por su ayuda inestimable y sus consejos tan acertados. Gracias por haberme demostrado que la sencillez y la fé en uno mismo pueden vencer cualquier barrera.

Margarita González, la mejor técnico de laboratorio que cualquiera podría desear. Gracias por la exquisita dedicación que siempre tuviste para este trabajo.

A **Cristina Verdejo**, compañera de residencia y de proyecto de tesis doctoral durante todos estos años. Gracias por tu ayuda, y porque sin tí jamás hubiera conocido a nuestra amiga M^a Dolores y nunca hubiera llegado a comenzar este trabajo. Tú bien lo sabes.

A **Josep Lluís Paniagua**, navegador incansable del "cyberspace" y a **Carmen Llorca** su compañera de navegación por la vida. A los dos muchísimas gracias por vuestra amistad, por vuestra ayuda y por haberme cedido tantos momentos para que este trabajo tuviera un formato diferente. Sabéis que hemos salvado juntos todas las dificultades para que tanto trabajo pudiera llegar a su fin.

A mis compañeros del Centro de Investigación del Hospital La Fé, **Manolo Portolés, Inma Azorín y Enrique Sevilla** por haberme acogido con los brazos abiertos y permitirme compartir sus conocimientos como biólogos. Gracias por haberme ayudado hasta conseguir que todo pareciera más sencillo.

A **Eloisa Barber** del Instituto de Investigaciones Citológicas y a **Inmaculada Monserrat** del Centro de Investigación del Hospital La Fé, por su ayuda y por haber puesto un interés especial en colaborar con este trabajo.

A **Juan Palomares**, director del Centro Oftalmológico Mediterránea, por ser el mejor jefe que he conocido, por los ratos tan agradables que compartimos en la consulta diaria y por haberme estimulado en el desarrollo de este trabajo. Gracias Juan por la capacidad que tienes de hacer sentir feliz a la gente.

A **Agustín Tato, Tomás Montán y Pilar Gomez** del Servicio de apoyo a la Investigación de la Facultad de Ciencias de Valencia por haber puesto a mi disposición sus conocimientos y sus magníficos microscopios.

A **Manuel Planes y Juan Fayos** del Servicio de microscopía de la Universidad Politécnica de Valencia por haberme acogido sin ninguna reserva y ofrecido su ayuda incondicional en los momentos adecuados.

Al Doctor **Francisco J. Iborra**, de la Universidad de Oxford (Inglaterra), por demostrar constantemente su interés en el estudio, por su ayuda y comentarios tan apreciados.

A la profesora **Kerstin Strömland**, de la Universidad de Göteborg (Suecia), experta en anomalías del desarrollo del sistema visual, por compartir sus ideas sobre la extrapolación de los trabajos de experimentación básica al campo de la oftalmología pediátrica.

Al equipo de oftalmología donde paso la mayor parte de mis horas. Gracias a **Enrique Sempere, Teresa Perez, David Maestre, Jose Tomás, Manolo Lledó, Susi Serra, Marisa Ramón, al equipo de anestesia, Miguel Lloret, Ana, Sonia, Marta, Natalia, Marga, Isa y Mercedes**, por ser compañeros de trabajo excepcionales y hacer del trabajo una diversión.

A todos ellos muchísimas gracias.

INDICE

<i>RESUMEN</i>	<i>V</i>
<i>SUMMARY</i>	<i>VII</i>
<i>ABREVIATURAS</i>	<i>IX</i>
CAPITULO I.- OBJETIVOS	1
CAPITULO II.- INTRODUCCION	3
1. GLANDULA TIROIDES	5
2. HORMONAS TIROIDEAS	6
<i>2.a. Sintesis y secrección</i>	<i>6</i>
<i>2.b. Estructura química</i>	<i>8</i>
<i>2.c. Regulación funcional del tiroides</i>	<i>9</i>
<i>2.d. Transporte</i>	<i>11</i>
<i>2.e. Metabolismo</i>	<i>11</i>
<i>3.a. Antecedentes y estado actual</i>	<i>12</i>
<i>3.b. Estructura</i>	<i>13</i>
<i>3.c. Clasificación</i>	<i>15</i>
<i>3.d. Distribución de las Isoformas</i>	<i>16</i>
<i>3.e. Mecanismo de acción de los receptores nucleares</i>	<i>18</i>
4. ACTIVIDAD BIOLÓGICA Y EFECTOS DE LAS HORMONAS TIROIDEAS	19
<i>4.a. Efectos generales sobre el organismo</i>	<i>19</i>
<i>4.b. Efectos sobre el organismo en desarrollo</i>	<i>22</i>
5. HORMONAS TIROIDEAS Y EL GLOBO OCULAR	24
6. PATOFISIOLOGIA DE LA GLANDULA TIROIDES	26
<i>6.a. Hipertiroidismo</i>	<i>26</i>
<i>6.b. Hipotiroidismo</i>	<i>30</i>

7. EMBRIOLOGIA DEL MACIZO CRANEOFACIAL, GLOBO OCULAR Y TEJIDOS ANEXOS	31
<i>7.a. Desarrollo del macizo craneofacial</i>	31
<i>7.b. Desarrollo del globo ocular</i>	33
<i>7.c. Desarrollo de la retina y distribución de las capas</i>	38
CAPITULO III.- MATERIAL Y METODOS	41
1. DESCRIPCION DEL MODELO EXPERIMENTAL	41
<i>1.a. Animales de experimentación</i>	41
<i>1.b. Modelo experimental de hipotiroidismo congénito</i>	42
<i>1.c. Obtención y manipulación de la descendencia y confirmación del estado de hipotiroidismo congénito neonatal</i>	42
<i>1.d. Comprobación individual del efecto de la ingestión de metil mercaptoimidazol en el desarrollo de la región craneofacial y órgano de la visión. Consideraciones sobre los efectos teratogénicos del tratamiento antitiroideo</i>	45
<i>1.e. Utilización de animales controles</i>	45
<i>1.f. Cantidad total de animales utilizados en relación al grupo</i>	46
<i>1.g. Obtención y manipulación de los tejidos</i>	46
<i>1.h. Técnicas de análisis morfológico y morfométrico de la región craneofacial y esbozo ocular de la rata</i>	53
<i>1.i. Estudio estadístico</i>	57
CAPITULO IV.- RESULTADOS	59
1. ESTUDIO MACROSCOPICO Y A MICROSCOPIA ELECTRONICA DE BARRIDO DE LAS CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS DEL DESARROLLO CRANEOFACIAL DE LA RATA	59

2. ESTUDIO DE LAS CARACTERISTICAS MORFOMETRICAS DEL DESARROLLO CRANEOFACIAL DE LA RATA	62
3. ESTUDIO A MICROSCOPIA OPTICA Y ELECTRONICA DE TRANSMISION DE LAS CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS DEL DESARROLLO DE LA RETINA DE LA RATA	67
4. ESTUDIO DE LAS CARACTERISTICAS MORFOMETRICAS DEL DESARROLLO DE LA RETINA DE LA RATA	75
5. ESTUDIO DE LA EXPRESION Y DISTRIBUCION DEL RECEPTOR DE LA HORMONA TIROIDEA EN LA RETINA DE LA RATA	79
 <i>CAPITULO V.- APENDICE</i>	 85
1. ESTUDIO DE LA REFRACCION EN RELACION A LA FUNCION TIROIDEA	86
2. ESTUDIO DE LA FUNCION VISUAL EN NIÑOS CON HIPOTIROIDISMO CONGENITO	90
 <i>CAPITULO VI.- DISCUSION</i>	 95
1. LA HORMONA TIROIDEA EN EL DESARROLLO DE LA REGION CRANEOFACIAL Y DEL GLOBO OCULAR	95
2. LA HORMONA TIROIDEA EN EL DESARROLLO DE LA RETINA	99
3. LAS HORMONAS TIROIDEAS Y SU POSIBLE RELACION CON LAS PATOLOGIAS OCULARES	103
 <i>CAPITULO VII.- CONCLUSIONES</i>	 105
<i>CAPITULO VIII.- BIBLIOGRAFIA</i>	107

RESUMEN

Nuestro objetivo es identificar factores que regulen procesos de diferenciación y proliferación celular en el globo ocular y tejidos anexos, cuya alteración estuviera relacionada con la aparición de dismorfogénesis ocular. Basándonos en publicaciones que demuestran que la hormona tiroidea (HT) modula la expresión génica en el cerebro, hemos estudiado si el hipotiroidismo congénito-neonatal (HPCN) inducido experimentalmente en la rata gestante (G) interfiere en el desarrollo embrionario de estructuras del macizo craneofacial y esbozo ocular y particularmente en la ontogénesis de la retina. El HPCN se logró mediante administración ininterrumpida a las ratas en el agua de bebida, desde el día 9G hasta que concluye la lactancia de las crías, del antitiroideo de síntesis metil-mercapto-imidazol (0.02%), efectuando una tiroidectomía total a las crías el día 5 tras el nacimiento. Así mediante radioinmunoensayo se detectaron niveles circulantes muy bajos de HT, extrapolables a los de mujeres cuya descendencia padecía el cretinismo. Junto a las hipotiroideas (GH) se mantuvieron en paralelo un grupo de ratas no tratadas (GC). Obtenidas las cabezas pre- (p) y postnatalmente (P) se procesaron para técnicas morfológicas y morfométricas a microscopía (m.) electrónica (e.) de barrido. Los ojos se obtuvieron p y P y se destinaron a examen macroscópico y técnicas morfológicas y morfométricas a m. óptica y m. e. de transmisión. Los resultados sugieren que el HPNC provoca el retraso en la formación de estructuras orbitarias y del esbozo ocular, con disminución significativa de los ejes oculo-nasal y oculo-bucal y área media del esbozo ocular en el GH frente al GC ($p < 0.01$). El área media y el espesor total de la retina aumentaron progresivamente durante el desarrollo, aunque con valores significativamente inferiores en el GH ($p < 0.001$). La morfogénesis de las capas retinianas se retrasó notablemente en el GH y se relacionó con anomalías en el desarrollo de los elementos celulares correspondientes inducida por la baja disponibilidad de HT. Mediante inmunohistoquímica hemos detectado el receptor de HT en la retina durante el desarrollo, con predominio pre- y perinatal de la isoforma $\alpha 1$ y de las $\beta 1$ y $\beta 2$ postnatalmente. Concluimos que las HT son esenciales para el desarrollo de las estructuras orbitarias y del globo ocular desempeñando una función primordial en la morfogénesis de la retina.

SUMMARY

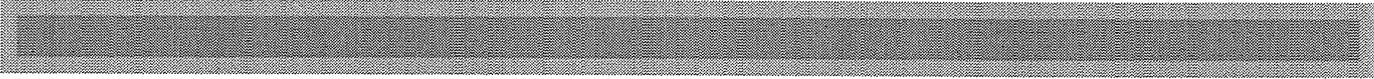
Our main goal is to identify factors regulating cell differentiation and proliferation in the eyes and adnexa, in order to analyze alterations in these factors capable of inducing processes of ocular dysmorphogenesis. Since thyroid hormone (TH) has been involved in brain gene expression, we have studied whether or not congenital-neonatal hypothyroidism (CNHP), induced experimentally in pregnant rats (G), may interfere with the morphogenesis of the face and eyes, and particularly in retinal development. CNHP was obtained by administering in the tap water to dams and their offspring (from G9 and throughout lactancy), the chemical antithyroid methyl-mercapto-imidazole (0.02%). At postnatal day fifth, a surgical thyroidectomy was also performed to the newborns. Low TH blood levels were detected by radioimmunoassay, resembling those obtained from cretins born to hypothyroid women. This group of hypothyroid rats (HG) was maintained in parallel with a group of controls (CG) during the whole experiment. The heads were obtained pre- (p) and postnatally (P) and processed for scanning electron (e) microscopy (m). The eyes were obtained p and P and processed for macromorphometrical examination and light and e. transmission m. assays. The results suggest that CNHP induces a delay in the morphogenesis of the orbit, optic primordia and adnexa, with significantly smaller values of the oculo-nasal and oculo-bucal axes ($p < 0.1$). Significantly lower values of the optic primordia area were detected in the HG, as compared to the CG ($p < 0.001$). The retinal area and thickness increased during the p and P development, but significantly smaller data were obtained from the HG than from the CG ($p < 0.001$). The definitive morphology of the retinal layering was delayed in the HG, in relation to low TH availability in the developing retinal cells from the treated rats. Finally, TH receptor was localized in the retina by immunohistochemistry, with higher presence of $\alpha 1$ isoform early in development and higher immunoreaction of $\beta 1$ and $\beta 2$ isoforms postnatally. To summarize, TH are essential for orbit and eye development and play a pivotal role in modulating the morphogenesis of the retina.

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

AR	Acido retinóico
BSA	Albúmina de Suero Bovino
C	Control
DIT	Diyodotirosina
E	Embrión/Embrionario
EPR	Epitelio pigmentario de la retina
FCS	Fetal calf serum
G	Gestación /Gestacional
GA	Grupo amétrope
GC	Grupo control
GH	Grupo hipotiroideo
H	Hipotiroideo
HT	Hormonas Tiroideas
HPC	Hipotiroidismo congénito
HPCN	Hipotiroidismo congénito y neonatal
MIT	Monoyodotirosina
MMI	Metil-mercapto-imidazol
p	Prenatal
P	Postnatal
PBS	Tampón fosfato sódico
RE	Elementos de respuesta
RHT	Receptor de la hormona tiroidea
SH	Hipermétropes
SM	Miopes
rT₃	T ₃ reversa
SNC	Sistema nervioso central
T₃	Triyodotironina
T₄	Tetrayodotironina o tiroxina
TBG	Thyroxine binding globuline
TBPA	Thyroxine binding pre-albumin
TSH	Hormona hipofisaria tiroestimulante
TRH	Hormona hipotalámica liberadora de TSH
TTR	Transtiretina
Tg	Tiroglobulina

I. OBJETIVOS



OBJETIVOS

Las **hormonas tiroideas (HT)**, triyodotironina (T_3) y tetrayodotironina o tiroxina (T_4), regulan el metabolismo y la homeostasis y desempeñan una función muy importante en el desarrollo del tejido neural, tanto en el hombre como en los animales superiores.

La relación entre las HT con la morfogénesis y la regulación del desarrollo ha despertado gran interés en los últimos años, de manera que ha sido objeto de estudio por diversos grupos de investigación, incluyendo su función en los mecanismos de transcripción de señales (Shawlot y Behringer 1995), factores inductivos o mediadores (Iglesias y cols., 1994; Slack 1994), y otros procesos moleculares y genéticos que tienen lugar durante la formación del SNC y órganos sensoriales (Mitsuhashi y cols., 1988; Calvo y cols 1990; Lee y Mahdavi 1993; Matsuo 1993; Morreale de Escobar y cols. 1993; Barres y cols., 1994 a; Berko-Flint y cols., 1994).

Basándonos en experimentos preliminares de nuestro propio laboratorio, en los que detectamos la disminución del peso y tamaño de los globos oculares procedentes de ratas hipotiroideas respecto a ratas controles de la misma edad y teniendo en cuenta las descripciones de otros autores que habían relacionado diversas anomalías oculares con el hipotiroidismo como el retraso en la apertura palpebral espontánea (Shapiro 1968), alteraciones en el desarrollo del nervio óptico (Mastaglia y cols., 1978; Stein y cols. 1991, 1994; Dussault y Ruel 1987; Leung y cols., 1992; Barres y cols., 1994 b), malformaciones craneofaciales (Bierich y cols., 1991; Elliot y cols., 1993), alteraciones genéticas asociadas al desarrollo del globo ocular (Matsuo 1993; Mavilio 1993; Quiring y cols., 1995) y alteraciones de las neuronas piramidales de la corteza visual (Ruiz-Marcos y cols., 1980) y apoyándonos en las observaciones de Walker y cols. (1979) por las que se demuestra que T_4 aumenta los niveles del factor de crecimiento nervioso en distintas partes del cerebro de la rata, creemos que existen evidencias suficientes para reconsiderar la función de las HT en el desarrollo del globo ocular y patologías asociadas.

Partiendo de un modelo experimental de hipotiroidismo congénito y neonatal (HPCN) en la rata Wistar diseñado para estudiar el desarrollo del sistema nervioso y obtenido mediante el bloqueo de la función tiroidea en las ratas gestantes, hasta que los niveles circulantes de HT en sangre se equiparasen a los valores de pacientes hipotiroideos,

I.- OBJETIVOS

abordaremos el trabajo con tres objetivos:

- 1.- Analizar la influencia de la glándula tiroides sobre el desarrollo embrionario del macizo craneofacial y primordio ocular.
- 2.- Estudiar la función que desempeña la glándula tiroides sobre el desarrollo pre- y postnatal del globo ocular y de una forma particular sobre la retina.
- 3.- Interpretar los resultados anteriores y buscar nexos de unión entre la disfunción tiroidea congénita y neonatal y la génesis de procesos patológicos que afectan al globo ocular y tejidos anexos, al macizo craneofacial y en definitiva a la función visual.

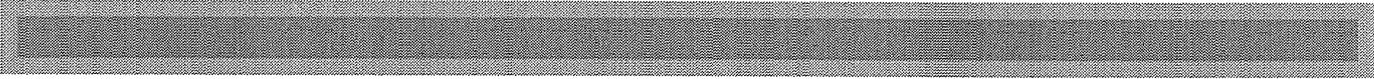
Pormenorizaremos estos objetivos en los siguientes puntos:

a.- Estudiar un **modelo de hipotiroidismo congénito y neonatal en la rata Wistar (HPCN)** para establecer las características morfológicas y morfométricas del desarrollo pre- y postnatal del macizo craneofacial y del globo ocular en relación a la disponibilidad de HT, mediante examen macroscópico y a microscopía electrónica de barrido.

b.- Estudiar un **modelo de HPCN en la rata Wistar**, para describir las características morfológicas y morfométricas del desarrollo pre- y postnatal de la retina en relación con la disponibilidad de HT, mediante examen a microscopía óptica y electrónica de transmisión.

c.- Establecer un **patrón de distribución del receptor de la HT (RHT)** durante el desarrollo de la retina y coroides de la rata no tratada, empleando anticuerpos frente a las isoformas del RHT y técnicas inmunohistoquímicas, mediante examen a microscopía óptica con lente de epifluorescencia.

II. INTRODUCCION



INTRODUCCION

Durante las etapas más precoces del desarrollo y en periodos significativos de la morfogénesis, los procesos de diferenciación y proliferación celular y los mecanismos de interacción celular y tisular están sometidas a un estricto control genético. Las HT tienen una función esencial durante los procesos de desarrollo y maduración de órganos y sistemas, interviniendo en estos procesos bien de forma directa o a través de mediadores. De hecho, a principios de los noventa se publicó la expresión del receptor de la HT (RHT) en el hipotálamo de la rata en desarrollo (Cook y cols., 1992) y recientemente se han descubierto áreas cerebrales en las que la expresión de genes específicos se regula por el ácido retinoico (AR) y la HT (Matsuo 1993; Mavilio 1993; Muñoz y cols., 1993, Iglesias y cols., 1994, 1995; López-Barahona y cols., 1994).

El AR (producto metabólico de la vitamina A o retinol) y la HT son los principales reguladores del metabolismo, diferenciación y desarrollo en los vertebrados (Gaetano y cols., 1991; Mc Caffery y cols., 1991; Buser e Imbert 1993; Muñoz y cols., 1993; Duester 1994; López-Barahona y cols., 1994), modulando la expresión génica a nivel celular y tisular mediante su unión a receptores específicos nucleares. La T₄ y T₃, ejercen una gran variedad de acciones sobre el organismo, de modo que durante el desarrollo las alteraciones en su disponibilidad (tanto el defecto como el exceso en la producción) originan una serie de alteraciones bioquímicas y estructurales en distintos órganos y sistemas, la mayoría de las cuales han sido detectadas y estudiadas a nivel cerebral (Iñiguez y cols., 1993).

En los últimos años ha resurgido el interés por el estudio de las anomalías que la disfunción tiroidea congénita puede provocar en el sistema visual en desarrollo y las consecuencias que esto conlleva para la visión. La idea de contribuir a estos estudios se basa principalmente en que de forma similar a lo que ocurre en el SNC, las HT deben desempeñar una función importante en el desarrollo del globo ocular y del nervio óptico. En este sentido, se ha descrito recientemente la presencia y el patrón de distribución durante el desarrollo de la retina de las isoformas del RHT (Sjöberg y cols., 1992) y también en el nervio óptico (Yusta y cols., 1988; Sarlieve y cols., 1989; Stein y cols., 1994). Es importante añadir que se han publicado diversas anomalías oftalmológicas relacionadas con la deficiencia de HT durante el desarrollo, como el retraso en la apertu-

II.- INTRODUCCION

ra palpebral espontánea (Adams y cols., 1989), insuficiencia de osificación a nivel orbitario (Hayek y cols., 1973), alteraciones en el desarrollo del nervio óptico (Mastaglia y cols., 1978; Stein y cols., 1991; Leung y cols. 1992), anoftalmos bilateral (Elliot y cols., 1993) y trastornos oculomotores (Mc Fault y Grant 1977), siendo esto posible gracias al desarrollo que se ha producido en los últimos años en la microscopía, microtecnología computerizada (De Paz y cols., 1986; Huijsmans y cols., 1986; Waterman 1974; Jongebloed y cols., 1993) y en la biología molecular y tecnología genética (Levi-Montalcini 1987; Iglesias y cols., 1994; Uchichara y cols., 1995,) que ha permitido obtener información fundamental sobre el desarrollo de la región cefálica y el primordio ocular (Cook y Sulik, 1986; Kaufman 1992). Además, existen estudios que demuestran que la integridad funcional y anatómica del sistema circulatorio y más concretamente de la barrera endotelial vascular (Tilton y cols., 1989) está modulada directamente por el tiroides en estructuras oculares como el iris, cuerpo ciliar, coroides y retina. En 1990, Dwork y colaboradores identificaron a la transtiretina (TTR), principal proteína de transporte de T_4 , en el epitelio pigmentario de la retina, cuerpo ciliar, epitelio de iris, endotelio corneal, capa de fibras del nervio óptico de la retina y cápsula del cristalino, sugiriendo además que dicha proteína es sintetizada por el epitelio pigmentario, al menos en parte, y de ahí transportada a las distintas estructuras oculares.

Por todo ello, y ya que la patofisiología tiroidea afecta al tejido orbitario y sus manifestaciones oculares son conocidas por los oftalmólogos clínicos, este proyecto de tesis doctoral se basa en analizar la función que desempeña la glándula tiroides durante el desarrollo de la región facial y del órgano de la visión. Se han estudiado las características morfológicas y morfométricas del desarrollo pre- y postnatal del macizo craneofacial, del globo ocular y de la retina en la rata Wistar, comparándolas con los resultados obtenidos de ratas que han sido tratadas durante la gestación para inducirles niveles muy bajos de HT circulantes y cuya descendencia presentaba un cuadro similar al hipotiroidismo congénito y neonatal del humano. Las peculiaridades de este modelo experimental refinado nos han permitido considerar que la disponibilidad de HT durante el desarrollo es el único factor que intervendrá en los cambios observados en dichas estructuras y por lo tanto responsable de las diferencias que podamos observar en ellas.

II.- INTRODUCCION

1. GLANDULA TIROIDES

El tiroides humano tiene su origen embriológico alrededor de la 4ª semana de gestación, al formarse una evaginación del epitelio faríngeo (1ª bolsa faríngea, de origen endodérmico) y englobar algunas células de las bolsas faríngeas laterales. El descenso progresivo del primordio tiroideo en la línea media da origen al conducto tirogloso, que va del agujero ciego en la base de la lengua al istmo del tiroides. A lo largo de éste pueden existir restos de tejido en forma de tiroides lingual, quistes o nódulos tiroglosos, o como una estructura adyacente al istmo llamada lóbulo piramidal.

La descripción anatómica se debe a Vesalio quien en 1547 estableció que la glándula tiroidea está constituida por dos lóbulos unidos por un istmo, y se sitúa en la parte anterior del cuello, por delante y hacia abajo de los cartílagos de la laringe. Está dividida por tabiques fibrosos en pseudolóbulos, los cuales se componen a su vez de vesículas denominadas folículos o acinos, cuyas paredes están revestidas por epitelio cúbico que secreta hacia el interior del folículo y su luz está llena con un material proteináceo denominado coloide, que contiene una proteína característica, la tiroglobulina (Tg), dentro de cuya secuencia de aminoácidos se sintetizan y almacenan las HT. Además contiene las células C que producen calcitonina. Rodeando a los folículos se encuentra una amplia red capilar. (Figura 1). (Williams y Warwick 1985).

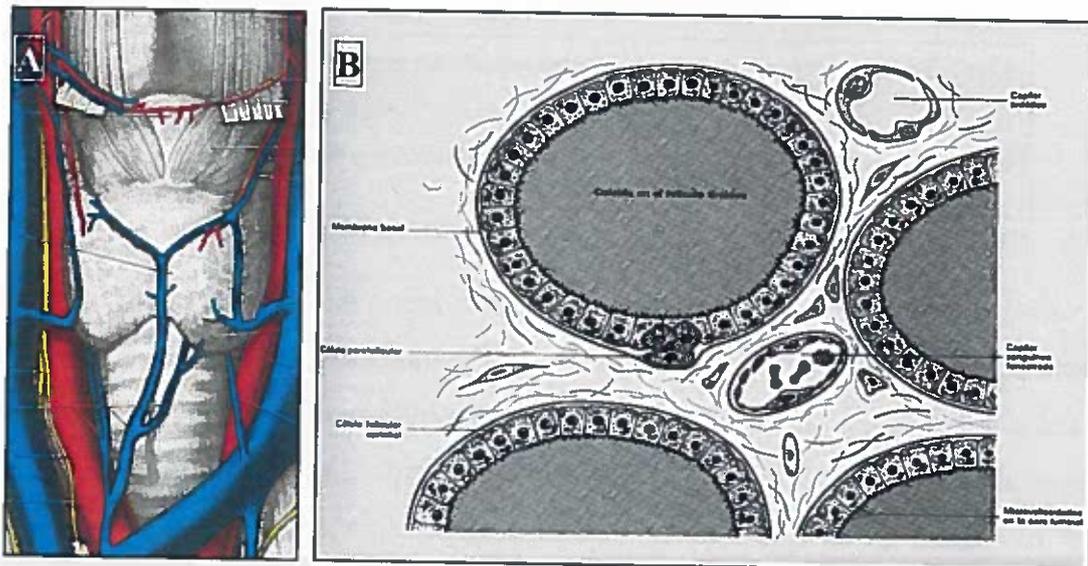


Fig. 1. Características anatómicas de la glándula tiroides. A.-Glándula tiroides y estructuras vecinas. B.- Esquema de la estructura folicular del tiroides.

2.-HORMONAS TIROIDEAS

2.a. SINTESIS Y SECRECION

La glándula tiroides tiene como función principal la concentración de yoduros, su combinación con tirosina para la síntesis de HT y el almacenamiento de las mismas para su posterior liberación según las necesidades del organismo (Figura.2).

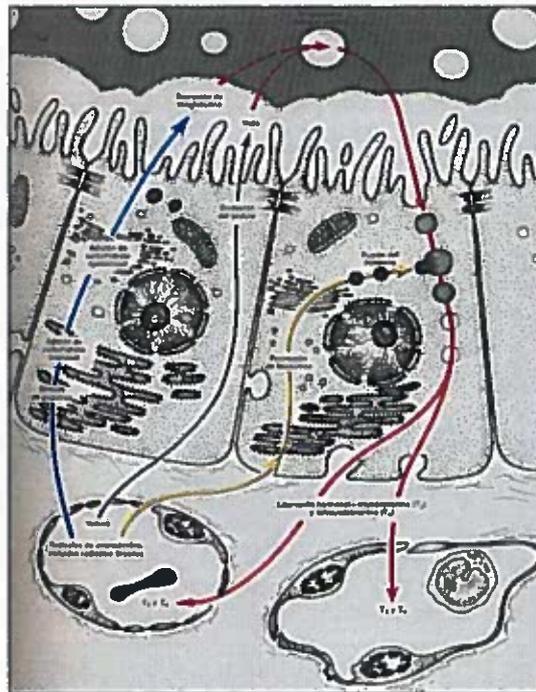


Fig. 2. Estructura funcional de las células foliculares tiroideas. En uno de los lados de las células se muestra la cavidad que contiene material coloidal y en el otro capilares (uno sanguíneo y otro linfático). Las flechas indican las vías de flujo metabólico.

El yodo penetra en el organismo a través de la absorción intestinal del que ingerimos, aunque también es absorbido a través de la piel y pulmones. Los compuestos orgánicos son reducidos a yoduro iónico a nivel del tracto gastrointestinal, donde se absorben y son transportados al torrente circulatorio en ese mismo estado. Del yodo absorbido sólo un tercio es captado por la glándula tiroides bajo el estímulo de la hormona hipofisaria tiroestimulante (TSH), siendo eliminado el resto por la orina.

Una vez captado, el yodo es oxidado por la acción de la tiroperoxidasa en presencia de agua, convirtiéndose de este modo en la forma activa.

II.- INTRODUCCION

El siguiente paso es la unión del yodo activo a la Tg, para formar monoyodotirosina (MIT) y posteriormente diyodotirosina (DIT), yodoaminoácidos precursores de HT. La Tg es una glicoproteína yodada de alto peso molecular específica de las células epiteliales tiroideas (esta estructura única está relacionada con la dependencia funcional de yodo que tiene la glándula para la síntesis de hormonas tiroideas) y que representa el 75% de las proteínas tiroideas.

Las HT también denominadas yodotironinas, se forman mediante el acoplamiento de una molécula de MIT y otra de DIT, dando lugar a la T₃, o bien mediante el acoplamiento de dos moléculas de DIT, dando lugar a la T₄, reacciones también catalizadas por la tiroperoxidasa.

En condiciones normales se generan aproximadamente dos residuos de T₄ por molécula de Tg y solamente un residuo de T₃ por cada tres moléculas de Tg.

La Tg yodada se almacena en el coloide, sirviendo de reserva de T₄, T₃ y yodo. Cuando la glándula es estimulada, se produce la hidrolización de la Tg por proteasas y peptidasas, liberándose de esta forma T₄ y T₃, MIT y DIT. La T₄ y T₃ son liberadas a la sangre pero las yodotirosinas (MIT y DIT) son rápidamente desyodadas por el enzima yodotirosina desyodasa reciclándose el yodo liberado en el interior del tirocito para ser utilizado de nuevo en la síntesis de MIT, DIT, T₄ y T₃. Estas últimas son liberadas al torrente sanguíneo en distinta proporción siendo T₄ la forma mayoritaria.

Un alto porcentaje de T₃ se produce por la desiodación de la T₄ circulante, que tiene lugar en los tejidos diana por la acción de las desyodasas.

Un esquema de todo este proceso de formación y homeostasis de la HT puede verse en la figura 3. (Guyton 1985; Cruz 1988; Williams y Warwick 1985)

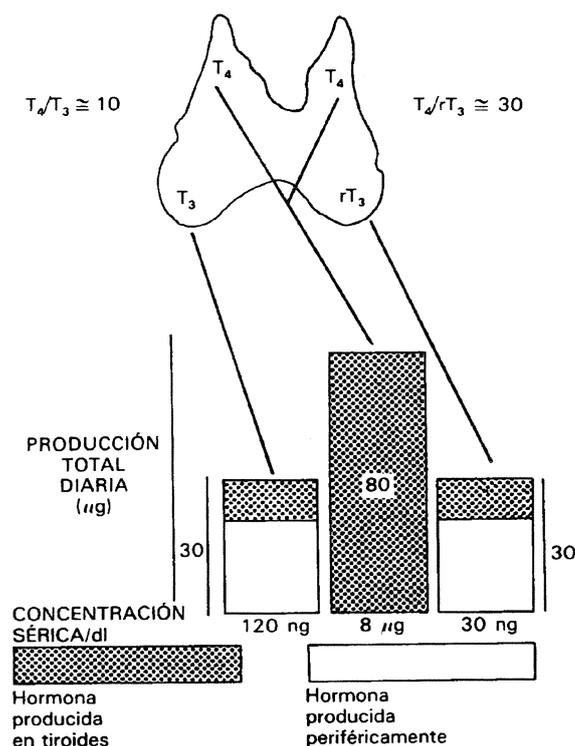


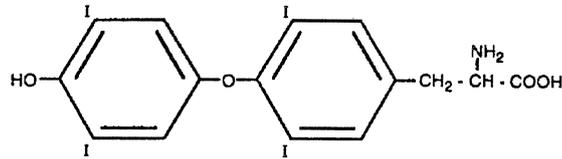
Fig. 3. Hormonas tiroideas a nivel de la glándula y en sangre periférica.

2.b. ESTRUCTURA QUIMICA

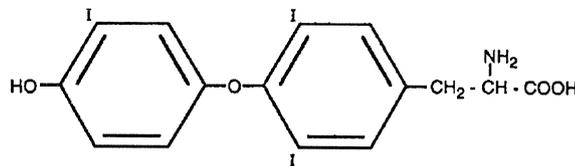
Las HT presentan una estructura básica con dos anillos bencénicos unidos por un puente de oxígeno, uno de los cuales tiene una cadena de alanina (anillo α) y el otro un grupo fenilo (anillo β) ambos en posición *para* con respecto al puente. Esta estructura corresponde a la de un aminoácido aromático, la tironina. Los átomos de yodo sólo se pueden colocar en las posiciones 3, 5, 3' y 5', en número máximo de cuatro. El producto mayoritario de la secreción tiroidea es la yodotironina tetrayodada 3, 5, 3', 5' -L-tetrayodotironina o tiroxina T_4 . La otra hormona es la forma triyodada 3, 5, 3' -L-triyodotironina T_3 , forma activa que presenta una afinidad por el receptor 10 veces mayor que la T_4 y se forma tanto en la glándula como en tejidos extratiroideos por pérdida de un átomo de yodo del anillo fenólico de la T_4 (Figura 4). Si el átomo de yodo que se pierde pertenece al anillo alanínico, se genera T_3 reversa (rT_3) forma inactiva de la hormona.

II.- INTRODUCCION

Otros metabolitos, generados por alteraciones de la cadena alanínica, son el TETRAC (tetrayodotiroacético), TRIAC (triyodotiroacético) etc. ninguno de los cuales son formas biológicamente activas. (Cook y cols., 1992; De Visscher 1980; Nunez 1984).



Fórmula química de la 3,5,3',5'-L-Tetrayodotironina (T4)



Fórmula química de la 3,5,3'-L-Triyodotironina (T3)

Fig. 4. Estructura química de las hormonas tiroideas. 3,5,3',5'-L-tetrayodotironina (T₄ ó tiroxina) y 3,5,3'-L-triyodotironina (T₃). La T₃ presenta una afinidad 10 veces mayor que T₄ por el receptor nuclear de hormonas tiroideas.

2.c. REGULACION DE LA FUNCION TIROIDEA

La regulación de la función tiroidea se realiza mediante dos mecanismos: un mecanismo extratiroideo de retroalimentación (ver fig. 5) similar al de otras glándulas endocrinas y un mecanismo intratiroideo de autorregulación.

a.- Mecanismo de retroalimentación: Existe una hormona segregada por las células basófilas de la adenohipófisis que estimula el desarrollo de la glándula tiroidea, es la "thyroid stimulating hormone" u hormona tireotropa (TSH). Dicha hormona estimula la secreción de hormonas tiroideas ejerciendo su acción a través de su receptor en la membrana basal del tirocito y a su vez la secreción de TSH es regulada por un

II.- INTRODUCCION

mecanismo de retroalimentación negativo, que actúa directamente sobre la hipófisis y se halla en relación principalmente con la concentración de hormona tiroidea libre en sangre, guardando con ella una relación inversa. La liberación de TSH es inducida por una hormona hipotalámica, "la thyrotropin releasing hormone" (TRH), que es secretada por neuronas del núcleo paraventricular del hipotálamo y a través del sistema porta llega a la hipófisis actuando positivamente sobre las células tireotropas. Entre los factores que regulan la secreción de TRH destaca la concentración de T_3 y T_4 en sangre, que actúan negativamente sobre ella y posiblemente estímulos procedentes de centros diencefálicos que aún no son bien conocidos (Figura. 5) (Cruz 1988)

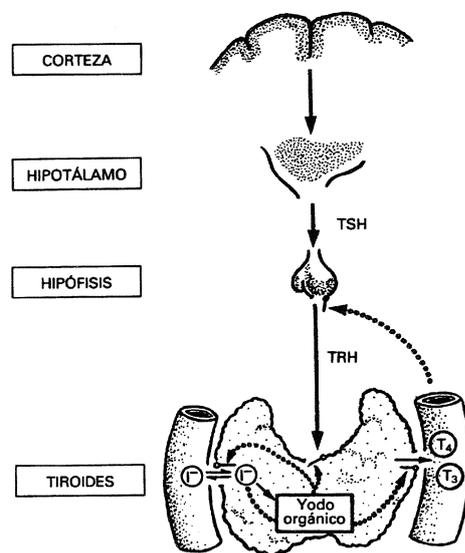


Fig. 5. Esquema elemental de la regulación hipotálamo-hipofisaria de la función tiroidea

b.- Mecanismo de autorregulación: "Efecto de Wolff-Chaikoff": Si las concentraciones de yoduro intratiroideo suben muy por encima de lo normal, disminuye la síntesis de Tg así como su yodación y viceversa. Esto permite al tiroides prevenir las variaciones en la secreción hormonal antes de que se produzcan y mantener constante la tasa hormonal glandular (Guyton 1985).

2.d. TRANSPORTE

El 99,98% de T_4 circulante se encuentra unida a tres proteínas de transporte: “la thyroxine-binding globulin” (TBG), que presenta la mayor afinidad por la T_4 y transporta hasta el 75% de esta hormona, “la thyroxine-binding pre-albumin” (TBPA) denominada también transtiretina (TTR), que transporta el 15-20% de la hormona y la albúmina que transporta el 5-10%. La TBPA o TTR plasmática se sintetiza en el hígado y en el plexo coroideo del SNC. La TTR no cruza la membrana de Bruch hacia la retina y por ello se sospecha que existe una producción en el ojo y el único sitio de síntesis sería el epitelio pigmentario de la retina, y también se cree que pudiese participar en el ciclo del retinol. Debido a la gran afinidad que presenta por las proteínas transportadoras (mucho mayor que la T_3), sólo el 0,05% de T_4 circula libre en plasma.

La tiroxina ligada a proteínas constituye un depósito circulante pero inactivo, que para ejercer su acción debe ser liberada en forma de tiroxina libre. La T_3 circulante deriva en parte de la producida por el tiroides, pero en su mayoría procede de la desyodación periférica de la T_4 , y por ello algunos autores consideran a la T_4 como una prehormona. La T_3 también se une a la TBG y a la TBPA, aunque su afinidad por estas proteínas es menor, y la relación T_3 libre y T_3 total es diez veces superior a la de T_4 libre y T_4 total. En sangre se encuentra también rT_3 que procede casi en su totalidad de la desyodación periférica de la T_4 y que carece de actividad biológica conocida (Guyton 1985; Cruz 1988).

2.e. METABOLISMO

A su llegada a los diferentes tejidos, las HT gracias a su naturaleza liposoluble entran en la célula por difusión pasiva y allí son metabolizadas, produciéndose la desyodación progresiva de la T_4 (considerada como prehormona). Como la T_4 no tiene una afinidad muy alta por el RHT nuclear su conversión a T_3 , cuya afinidad por dicho receptor es hasta diez veces mayor, es una reacción de activación de la hormona (conversión de prehormona a hormona activa). En el caso de metabolización de T_4 por la vía de formación de rT_3 la activación está inhibida. Estos procesos de desyodación son catalizados por desyodasas específicas (Silva y cols., 1982; Leonard 1990) presentes en los diferentes tejidos, de las cuales se conocen tres tipos: I, II y III. De su actividad

II.- INTRODUCCION

depende la disponibilidad intracelular de T_3 . Las desyodasas 5' tipo I y II catalizan la desyodación en el anillo fenólico (β) dando lugar a T_3 , y las desyodasas 5 de tipo III en el anillo interno (α) dando lugar a la forma inactiva rT_3 . La desyodasa tipo I se expresa principalmente en hígado, músculo, piel, pulmón, riñón y tiroides. La tipo II se encuentra en SNC, pituitaria anterior, grasa y placenta. La tipo III está presente en grandes cantidades en placenta, cerebro e hígado fetal. La tipo II es inhibida por la T_4 , mientras que las de tipo I y III son estimuladas por la hormona.

En situaciones de hipotiroidismo se inhibe la actividad de la desyodasa tipo I haciendo que se consuma menos T_4 circulante en hígado o riñón, quedando ésta disponible para el cerebro. También se inhibe la desyodasa tipo III, disminuyendo la formación a rT_3 inactiva. Por el contrario la desyodasa tipo II se estimula aumentando así la producción local de T_3 . En los tejidos, la concentración total de T_3 disponible será la suma de la T_3 del plasma y la T_3 producida localmente, mientras que en el hígado prácticamente toda la hormona procede del plasma y en el cerebro hasta el 80% procede de la desyodación local de T_4 .

3. RECEPTOR DE LA HORMONA TIROIDEA

3.a ANTECEDENTES Y ESTADO ACTUAL

Los efectos fisiológicos de las HT se inician por la unión a receptores nucleares específicos (Oppenheimer y cols., 1994) que unen T_3 con alta afinidad y capacidad limitada. Los niveles de receptor nuclear para T_3 en los diferentes tejidos se correlacionan bien con los efectos que la hormona ejerce sobre ellos y es por ello por lo que, aunque las HT ejercen algunas acciones no nucleares, hoy se acepta que la mayor parte de las acciones son mediadas por receptores nucleares específicos (Samuels 1983; Oppenheimer y cols., 1987).

Desde los años sesenta se conocía la existencia en el núcleo celular, de proteínas capaces de unir HT. Sin embargo, la gran labilidad y los bajos niveles de expresión del RHT hizo imposible durante muchos años su aislamiento en cantidades que permitieran determinar su estructura (Glass y Holloway 1990). En 1986, dos grupos clonaron simultáneamente el homólogo celular del oncogén *v-erbA* presente en el genoma del virus de la eritroblastosis aviar, gen *c-erbA* de pollo y humano, permitiendo de este

II.- INTRODUCCION

modo comprobar que estos genes presentan una gran homología estructural con genes que codifican los receptores de glucocorticoides y estrógeno, (Thompson y Evans 1989) y además, codifican una proteína semejante al RHT con afinidades para T_3 semejantes a las descritas para su receptor (Sap y cols., 1986; Weinberger y cols., 1986).

El clonado del receptor de T_3 permitió un gran avance en el conocimiento de las bases moleculares y celulares de la acción de T_3 que ha tenido lugar en los últimos años (Muñoz y Bernal, 1997; Bernal y Guadaño Feraz 1998) y ha servido para definir una superfamilia de receptores nucleares (Evans 1988; Mangelsdorf y cols., 1995) que funcionan como factores de transcripción dependientes de ligando. En estos momentos se conocen más de 150 miembros diferentes de esta superfamilia que también incluye un gran número de proteínas cuyos ligandos son aún desconocidos o no existen y que reciben el nombre de receptores huérfanos. Los ligandos de los receptores pertenecientes a esta superfamilia, gracias a su naturaleza liposoluble, atraviesan las bicapas lipídicas de las membranas celulares e interaccionan con sus receptores en el núcleo o en el citoplasma.

Los receptores nucleares se agrupan en cuatro clases según su mecanismo de acción: La clase I incluye a los receptores de hormonas sexuales, glucocorticoides, mineralocorticoides y progesterona. La clase II incluye a los RHT, del AR, del ácido 9-cis retinóico y de la vitamina D_3 . La mayoría de los receptores huérfanos pertenecen a las clases III y IV.

3.b. ESTRUCTURA

Los receptores incluidos en la clase II son proteínas que presentan cierta homología en su secuencia, con una estructura común muy conservada en la que se pueden distinguir seis dominios estructurales (A, B, C, D, E y F) que incluyen tres dominios funcionales como se puede apreciar en la figura 6.

1) El **dominio A/B**, en el extremo aminoterminal, de función poco conocida. La delección de este dominio no tiene efecto sobre la activación dependiente de T_3 (Thompson y cols., 1989).

2) El **dominio C** es el responsable de la unión al DNA (DNA binding domain). Este dominio se caracteriza por estar muy conservado entre los miembros de la familia de

II.- INTRODUCCION

receptores nucleares y presenta una estructura muy peculiar rica en aminoácidos básicos organizados en dos estructuras en dedos de zinc, que permiten el reconocimiento de una secuencia específica del DNA diferente a la reconocida por los receptores nucleares pertenecientes a la clase I (corticoides y hormonas sexuales) (Green y cols., 1988). A diferencia de los receptores de clase I, los receptores de la clase II se mantienen unidos al DNA en ausencia de hormona.

3) El **dominio D**, poco conservado, es una región bisagra entre el dominio C (DBD) y el dominio E/F (LBD) que proporciona flexibilidad en la disposición de ambos dominios sobre diferentes elementos de respuesta (Kurokawa y cols., 1993). Este dominio parece dictar la presencia del receptor en el núcleo y es posible que se requiera esta región, junto con el extremo carboxiterminal (región E/F) para la unión de la hormona al receptor (Muñoz y cols., 1988; Dang y Lee 1989). También parece estar implicado en la represión basal de la transcripción en ausencia de hormona (Lee y Mahdavi. 1993; Damm y Evans 1993) mediante la interacción con unas proteínas auxiliares denominadas co-represores (Horlein y cols., 1995; Tong y cols., 1996).

4) El **dominio E/F** localizado en la zona carboxiterminal es el implicado en la unión del ligando (de la hormona) (**ligando binding domain** o **LBD**) (Muñoz y cols., 1988) de modo que actuando a modo de interruptor al unir la hormona hace que el receptor sea transcripcionalmente activo (Evans 1988). También contiene la actividad silenciadora en ausencia de ligando, así como las regiones necesarias para la interacción con proteínas auxiliares.

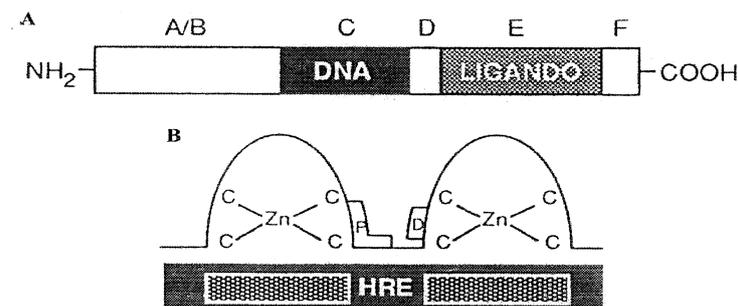


Fig. 6. Estructura del RHT. Dominios estructurales y funcionales de los receptores de la superfamilia del RT₃. A. Se distinguen seis dominios estructurales (A-F), que incluyen los dominios responsables de la unión al ligando y al DNA B. El dominio de unión al elemento de respuesta (HRE) en el DNA se compone de dos átomos de Zn tetracoordinados con cisteínas (dedos de Zn). Las posiciones de las cajas P y D, implicadas en el reconocimiento del sitio de unión y del espaciamiento entre los hexámeros pueden ser observadas.

3.c. CLASIFICACION

Los RHT están codificados por dos genes distintos, α y β , localizados en los cromosomas 17 y 3 respectivamente. Cada uno de estos genes da lugar a distintas isoformas (Sap y cols.,1986; Schwartz y cols 1991;Lazar, 1993; Nicola, 1994). (Figura 7):

- Familia α :

El gen α (*c-erbA α*) va a procesar tres isoformas $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ (Lazar 1993) de las cuales la única con capacidad para unir HT es la $\alpha 1$ ya que las isoformas $\alpha 2$ y $\alpha 3$ en el procesamiento pierden parte del extremo carboxiterminal (LBD) lo que les impide unir hormona, aunque sí pueden unirse al DNA, inhibiendo los efectos transcripcionales de T3 mediados por los receptores funcionales ($\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\beta 2$) (Lazar y cols., 1988; Izumo y Mahdavi 1988; Mitsuhashi y cols., 1988).

Existe otra isoforma, la *rev-erbA α* codificada por la cadena complementaria del gen α , de función desconocida, aunque entre otras funciones podría regular los niveles relativos de las isoformas $\alpha 1$ y $\alpha 2$.

A todas las isoformas que no unen hormona se les atribuye un papel modulador en la regulación transcripcional ejercida por los receptores funcionales (Koening y cols., 1989; Lazar y cols., 1989; Rentoumis y cols., 1990).

- Familia β :

El gen β (*c-erbA β*) va a dar lugar a dos isoformas, $\beta 1$ y $\beta 2$ que difieren únicamente en el extremo aminoterminal AB.

Ambas isoformas unen T₃ con alta afinidad y por tanto son junto a $\alpha 1$ los receptores funcionales.

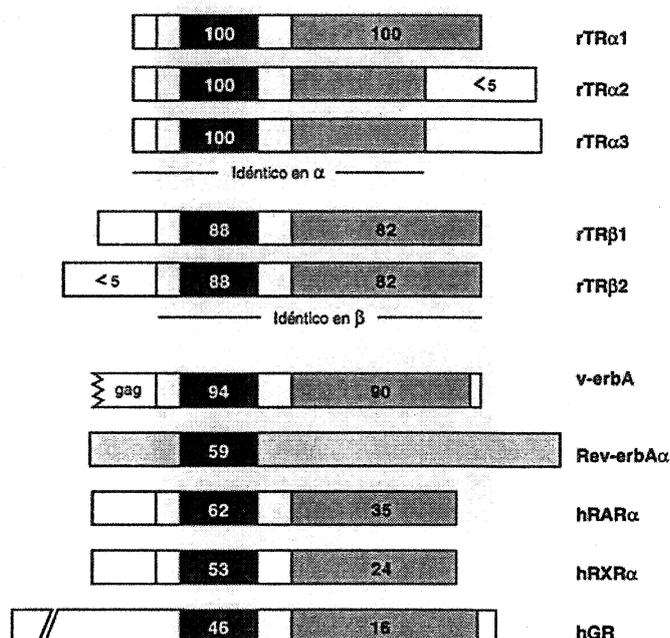


Fig.7. Representación esquemática de las diferentes isoformas del receptor de la hormona tiroidea y otros miembros de la superfamilia de receptores nucleares. El alineamiento de los receptores se basa en los dominios altamente conservados de unión a DNA (negro) y de unión a ligando (gris). Los valores dentro de cada dominio representan el porcentaje de homología de los diferentes receptores con respecto al receptor TRα1. TR, receptor de hormona tiroidea; RAR, receptor de ácido retinoico; RXR, receptor del ácido 9 cis retinoico; GR, receptor de glucocorticoides.

3.d. DISTRIBUCION DE LAS ISOFORMAS

La función fisiológica de las HT depende de la presencia de su receptor en las células diana. Según descripciones anteriores, todas las isoformas se encuentran en el globo ocular del pollo durante la embriogénesis (Sjoberg y cols., 1992) y se han conseguido determinar los patrones de expresión para los diferentes subtipos de receptor de T₃ (Forrest y cols., 1991; Brent 1994), comprobando que existe un patrón específico de expresión temporal y espacial para cada uno de ellos, de modo que los receptores α son mucho más abundantes en el periodo fetal y neonatal, mientras que los β son indetectables en ese periodo y van incrementando su expresión desde los primeros días después del nacimiento hasta el adulto, donde son la forma predominante.

II.- INTRODUCCION

- RHT α 1 : Se expresa muy temprano y es la forma más abundante en el embrión de rata. Su expresión está ampliamente distribuida en el cerebro a todas las edades estudiadas (Mellström y cols., 1991). En las tres primeras semanas después del nacimiento se observa el máximo nivel de expresión. Estos datos sugieren que la isoforma α estaría involucrada en las acciones generales sobre la mayoría de las estructuras nerviosas durante el periodo fetal y neonatal. A partir del día 20 postnatal comienza a disminuir la expresión y desaparece prácticamente en el adulto. El tiroides fetal comienza a ser activo en el periodo embrionario (E) los días E17 y E18 (Porterfield y Hendrich 1993), pero en E13 ya se detectan HT en el cerebro fetal procedentes de la T₄ materna, capaz de atravesar la placenta (Morreale de Escobar y cols., 1988, 1990; Contempré y cols., 1993). La presencia de RHT α en el embrión en estadios tan tempranos, mucho antes de que la glándula tiroidea fetal comience a secretar la hormona, sugiere que su actividad biológica podría ser necesaria incluso antes del establecimiento de la función tiroidea fetal, siendo entonces ocupado por la T₃ procedente de la madre. Sabiendo que el receptor de la hormona tiroidea sin ligando tiene función represora (Fondell y cols., 1993) también se ha planteado la posibilidad de que estos tengan una función reguladora importante independiente de ligando.
- RHT α 2: Presenta un patrón de expresión muy parecido al de α 1 en las mismas edades aunque es diez veces más abundante y en el adulto pasa a ser la isoforma α dominante.
- RHT β 1: Prácticamente indetectable durante el periodo embrionario, comienza a expresarse en los primeros días después del nacimiento en determinadas regiones cerebrales, aumentando posteriormente los niveles en otras regiones, alcanzando un pico en el décimo día postnatal e incluso incrementando los niveles de expresión en el adulto pasando a ser la isoforma β predominante. El aumento de expresión de β 1 ocurre paralelamente al aumento de T₃ en suero debido a la actividad del tiroides fetal. Durante este periodo ocurren en el cerebro la mayoría de los cambios morfológicos y bioquímicos dependientes de T₃ que han sido documentados.
- RHT β 2: En un principio se consideró que su expresión era específica de la hipófisis (Hodin y cols., 1989), pero estudios posteriores han demostrado que también se

II.- INTRODUCCION

expresa en otras regiones del cerebro (Cook y cols., 1992; Lechan y cols., 1993; Schwartz y cols., 1994).

3.e. MECANISMO DE ACCION DE LOS RECEPTORES NUCLEARES

Todos los miembros de la superfamilia de receptores nucleares comparten un mecanismo de acción común como factores de transcripción dependientes de ligando. Los efectos transcripcionales de estos receptores resultan de su interacción directa con pequeñas secuencias de reconocimiento específicas en el DNA, en las regiones reguladoras de los genes diana denominadas elementos de respuesta a hormona. Esta unión del receptor de la hormona tiroidea a secuencias específicas en el DNA se produce incluso en ausencia de hormona (Ribeiro y cols., 1992; Yen y cols., 1992 b).

La unión de T_3 (ligando) al complejo receptor-DNA puede activar o reprimir la transcripción génica. (Figura 8)

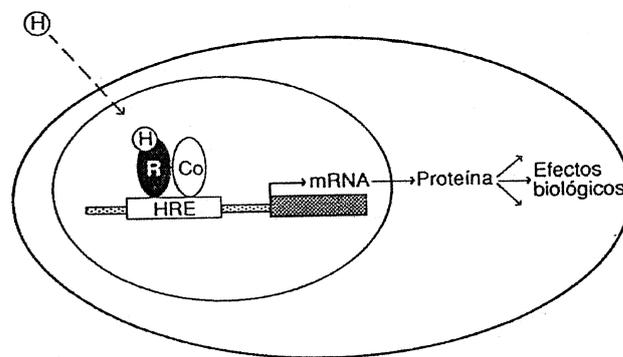


Fig. 8. Modelo de acción de los receptores nucleares. La hormona, que puede proceder del medio extracelular y ser convertida en hormona activa en el citoplasma de la célula a partir de una prehormona o bien ser producida por la propia célula, penetra en el núcleo celular y tras la unión a su receptor específico, el complejo activado es capaz de regular la transcripción del gen diana asociado.

Experimentos "in vitro" han demostrado que el receptor de T_3 reconoce una secuencia en el DNA o elemento de respuesta a T_3 . El receptor de T_3 puede unirse a

II.- INTRODUCCION

estos elementos de respuesta en forma de monómero, homodímero o formando heterodímeros con otras proteínas nucleares denominadas de forma genérica TRAPS o "thyroid hormone receptor associated proteins" (Rosen y cols., 1991). Los heterodímeros RHT-TRAP poseen mayor afinidad por los elementos de respuesta a T_3 , siendo su unión más estable que en el caso de los monómeros y homodímeros del RHT (Yen y cols., 1992a,b). La principal proteína TRAP es el receptor del ácido 9-cis retinóico.

Estos heterodímeros desempeñan una función fundamental en la regulación por T_3 . Experimentos "in vitro" han permitido concluir que en ausencia de T_3 los monómeros y homodímeros del RHT actuarían como represores de la transcripción, y que la unión de T_3 a los heterodímeros sería la responsable de la activación transcripcional. El RHT también puede formar heterodímeros con el receptor del AR u otras proteínas nucleares, aunque con menor afinidad (Yen y cols., 1992a,b). La regulación transcripcional ha quedado demostrada con la identificación de RHT, tanto naturales como artificiales, que determinan la estimulación o inhibición de la expresión génica como consecuencia de la unión de la hormona al complejo del RHT.

Algunos autores (Yen y Chin 1994), apoyados en el hecho de que el RHT β 1 humano y el RHT α 1 pueden fosforilarse (Goldberg y cols., 1988, Lin y cols., 1992) sugieren que la fosforilación pudiera ser otro mecanismo, además de la unión de T_3 , que selectivamente afectara la unión del complejo-RHT con los elementos de respuesta (T_3 RE), ya que la fosforilación afecta a la unión del DNA de otros factores de transcripción como el receptor de los glucocorticoides, y por tanto sería de mucho interés comprender como la fosforilación afecta la unión del RHT a los elementos de respuesta así como a la regulación transcripcional.

4. ACTIVIDAD BIOLÓGICA Y EFECTOS DE LAS HORMONAS TIROIDEAS

4.a. EFECTOS GENERALES SOBRE EL ORGANISMO

Las HT regulan el desarrollo, crecimiento y diferenciación tisular, la homeostasis y el metabolismo en el hombre y en todos los vertebrados. La mayor parte de los tejidos y órganos expresan receptores para T_3/T_4 . El efecto principal de las HT es el aumento de las actividades metabólicas de la mayor parte de los tejidos, pudiendo aumentar el

II.- INTRODUCCION

metabolismo basal hasta 60-100% cuando la secreción de HT es elevada.

Cuando se administra HT a un animal, la síntesis de proteínas aumenta en casi todos los tejidos corporales. La primera etapa del aumento de esta síntesis resulta de la estimulación del proceso de traducción, y ocurre de manera inmediata. Una segunda etapa ocurre horas o días más tarde por un aumento casi generalizado de la síntesis de RNA (Nicola, 1994).

ADN	<i>transcripción</i>	ARNm/ARNt	<i>transferencia</i>	ARNr	<i>traducción</i>	Síntesis Proteica
-----	----------------------	-----------	----------------------	------	-------------------	-------------------

También produce un aumento del número de enzimas intracelulares, entre ellos la deshidrogenasa de α -glicerofosfato, responsable de la desintegración de carbohidratos y la Na-K ATPasa, la cual aumenta el transporte de sodio y potasio a través de las membranas celulares de algunos tejidos sugiriéndose que este sea uno de los mecanismos mediante los cuales las HT aumentan el índice metabólico del cuerpo.

Al administrar HT a un animal, las mitocondrias de la mayor parte de células del organismo aumentan en tamaño y número, así como la superficie total de membranas en las mitocondrias y esto acelera la producción de ATP para suministrar energía a las funciones celulares.

Todos estos son hechos intracelulares, que se traducen a nivel del organismo en los siguientes efectos (Guyton 1985; Sidney 1989):

- Efecto estimulante del crecimiento, probablemente por su capacidad para promover la síntesis de proteínas, aunque un exceso de HT también podría producir un catabolismo más rápido que la síntesis.
- Sobre los carbohidratos, las HT estimulan casi todas las fases del metabolismo, incluyendo rápida captación de glucosa por las células, aumento de la glucólisis, aumento de la gluconeogénesis, incremento de la absorción a nivel del tubo digestivo, e incluso incremento de la secreción de insulina.
- Sobre el metabolismo lipídico, las HT estimulan prácticamente todas las fases, produciendo sobre todo una movilización de los lípidos del tejido graso, y produciendo por tanto un aumento de la concentración de ácido graso libre en plasma, y además aceleran la oxidación de los ácidos grasos libres por las células.

II.- INTRODUCCION

- A pesar de aumentar los ácidos grasos libres, las HT disminuyen la cantidad de colesterol, fosfolípidos y triglicéridos de la sangre. Una disminución importante de HT da lugar a un aumento de colesterol, HDL y LDL en sangre (Asami y cols., 1995) y riesgo importante de arterioesclerosis.
- Producen disminución del peso corporal cuando la síntesis de HT está elevada.
- Sobre el sistema cardiovascular:
 1. Flujo sanguíneo y gasto cardíaco: Debido al aumento del metabolismo celular y la liberación por los tejidos de los productos finales del metabolismo, las HT producen una vasodilatación y por tanto un aumento del flujo sanguíneo en casi todo el cuerpo y un aumento del gasto cardíaco.
 2. Aumento de la frecuencia cardíaca.
 3. Fuerza del latido cardíaco: El aumento de las actividades enzimáticas por un aumento de HT aumenta la fuerza del latido, pero si el aumento de HT es excesivo se produce un exceso de catabolismo proteico y la fuerza de contracción cardíaca disminuye.
 4. Aumento del volumen sanguíneo, debido en parte a la vasodilatación.
 5. Presión arterial: La presión arterial media permanece sin cambio por un equilibrio entre la vasodilatación que tendería a disminuirla y el aumento del gasto cardíaco que tiende a aumentarla.
- Sobre la respiración: Se produce una activación de los mecanismos que aumentan la intensidad y la profundidad de la respiración, ya que las HT elevan la utilización de oxígeno por el aumento del metabolismo.
- Sobre el aparato digestivo: Producen un aumento de la absorción de alimentos, y elevan la secreción de jugos y la movilidad del tubo digestivo.
- Sobre el sistema nervioso central: La HT promueve la génesis de oligodendrocitos desde sus precursores en el nervio óptico y la ausencia de hormona induce un retraso en su diferenciación (Almazan y cols., 1985; Barres y cols., 1994 a y b). Así las HT aumentan la rapidez de encefalización. Producen nerviosismo, insomnio e incluso tendencias psiconeuróticas.
- Sobre la función muscular: Producen un aumento de la actividad muscular por el aumento de síntesis proteica, aunque un exceso de HT produce el efecto contrario.

II.- INTRODUCCION

Uno de los signos más característicos del hipertiroidismo es un temblor muscular fino.

- Sobre otras glándulas endocrinas: El aumento de las HT aumenta la secreción de la mayoría de las glándulas endocrinas, pero asimismo la necesidad de hormonas en los tejidos.

Tabla1. Funciones de las hormonas tiroideas (T₃ y T₄)

Acciones metabólicas

- Regulación procesos oxidativos (Metab.basal)
- Regulación metabolismo hidrocarbonado, lipídico, proteico y de las vitaminas y minerales
- Estimulante del SNC, SNP y SNV

Acciones sobre órganos y sistemas

- Aparato digestivo
 - Peristaltismo gástrico e intestinal
 - Secreción gástrica, pancreática e intestinal
- Sistema hematopoyético (estimula la producción celular y factores de coagulación)
- Sistema inmunológico

Acciones morfogenéticas

- Activa la diferenciación actuando sinérgicamente con la hormona de crecimiento (GH)
 - Regula mecanismos reparadores
 - Interviene en el desarrollo de la piel y faneras
 - Función reguladora del desarrollo del SNC
-

4.b. EFECTOS SOBRE EL ORGANISMO EN DESARROLLO

Las HT son uno de los principales reguladores del desarrollo, crecimiento y diferenciación tisular, de la homeostasis y del metabolismo en el hombre y en todos los vertebrados, jugando un importante papel en los procesos de crecimiento/diferenciación (Eayrs 1968; Balazs 1976; Dussault y Ruel 1987). La mayoría de los tejidos y órganos expresan receptores para T3 y T4. En consecuencia estas hormonas ejercen múltiples y complejas acciones de regulación de la fisiología del organismo, existiendo una relación

II.- INTRODUCCION

causa- efecto entre la deficiencia de T_3/T_4 durante el periodo fetal y neonatal, y la aparición de daño cerebral y distintas malformaciones.

La placenta de los mamíferos ha sido considerada durante años impermeable a las HT y por tanto se creía que dichas hormonas no estaban disponibles para el feto hasta el comienzo de su función tiroidea y que no eran necesarias para el desarrollo normal de los mamíferos. El descubrimiento de que las hormonas tiroideas fueran las responsables de los grandes cambios morfológicos, bioquímicos y fisiológicos que se producen en el proceso de metamorfosis de los anfibios (Frieden y Just 1970; Becker y cols., 1994) sugirió a algunos autores la idea de que estas hormonas podrían intervenir en los procesos de desarrollo de los vertebrados superiores. De hecho la disfunción de la glándula tiroidea materna cursa con un aumento significativo de las complicaciones obstétricas por hipertiroidismo o hipotiroidismo neonatal (Lazarus, 1993).

La determinación de T_3 y T_4 en cavidad celómica y líquido amniótico humano tan temprano como en el segundo mes de gestación, cuando el tiroides fetal no es funcionante supuso un gran hallazgo, permitiendo suponer que dichas hormonas son necesarias para el desarrollo fetal en mamíferos (Contempré y cols., 1993). La T_4 hallada en cavidad celómica se encuentra unida a la TTR y a la albúmina. La concentración de T_3 en cavidad celómica es mucho menor que la de T_4 , pero a pesar de ello, T_3 se halla en el cerebro fetal en la 9ª semana de gestación. Sin embargo en el hígado pulmón y corazón solo se encontró T_4 en el 2º trimestre. La transferencia de T_4 al feto podría verse facilitada por la síntesis de TTR en el epitelio del saco vitelino y continúa hasta el final de la gestación de modo que tras el comienzo de la función tiroidea fetal las HT tienen un doble origen, materno y fetal (Morreale de Escobar y cols., 1993).

Se supone que el mecanismo de transferencia materno-fetal podría ser similar al transporte de T_4 al cerebro vía TTR, sintetizada por el plexo coroideo (el gen de la TTR se expresa en el plexo coroideo del embrión de pollo entre E5 y E9 y en hígado entre E3 y E5) (Prati y cols., 1992).

El comienzo de la función tiroidea fetal se acompaña de un rápido aumento de T_4 en la circulación, pero los niveles de T_3 son muy bajos hasta el nacimiento en la rata y hasta bien entrado el tercer trimestre en el hombre (Fisher y Klein 1981). A pesar de todo, estos hallazgos no muestran una evidencia de la función que desempeñan dichas hormonas en el desarrollo; sin embargo, el hallazgo de receptores nucleares de hormona

II.- INTRODUCCION

tiroidea en tejido embrionario y fetal de rata, incluso antes del comienzo de la función tiroidea, con la expresión de la isoforma c-erbA α en el día 14 cuando se está desarrollando el tubo neural, es la base de la implicación de la HT (Contempné y cols., 1993). En humanos, los receptores se han identificado entre la 9ª y 18ª semana de gestación.

Tabla 2. Función tiroidea fetal. Determinaciones de T_3 y T_4 en plasma y en cerebro de ratas fetales (nmol/L o pmol/g) de 21 días. (Extraído de Morreale de Escobar y cols., 1993).

	T_4	T_3
<i>Plasma</i>	5.15 \pm 0.03	0.12 \pm 0.02
<i>Cerebro</i>	1.53 \pm 0.17	1.44 \pm 0.22

También existen estudios en embriones de pollo, en los que se miden las concentraciones de T_3 y T_4 antes (4 y 6 días de la incubación) y después (10 y 20 días de la incubación) del comienzo de la función tiroidea y la expresión de RHT, expresándose respectivamente el gen c-erb A α en el cerebro a los 4 días y el gen c-erb A β en el ojo a los 9 días y en el cerebro a los 16 días. El RHT se ha caracterizado bien en varios tejidos de embrión de pollo y se ha detectado en neuronas y cerebro a los 7 días de la incubación (Prati y cols., 1992; Morreale de Escobar y cols., 1992, 1993).

5. LAS HORMONAS TIROIDEAS Y EL GLOBO OCULAR

Aunque existen muchas y variadas publicaciones relacionadas con las acciones de la disfunción tiroidea sobre el tejido orbitario y el globo ocular en el curso del hipertiroidismo, tras una búsqueda exhaustiva de la literatura hemos constatado que existen pocas publicaciones que demuestren una asociación directa entre las HT y el desarrollo del globo ocular. Sin embargo, es muy probable que la acción de dichas hormonas sobre el mismo sea mayor de lo que en un principio se conoce, dado que el órgano visual es una prolongación del SNC y sí que se ha podido demostrar la relación directa entre las HT y la maduración cerebral (Dussault y Ruel, 1987) a

II.- INTRODUCCION

diferentes niveles.

La relación entre la disfunción tiroidea y el globo ocular fue establecida a raíz de las descripciones de la oftalmopatía de Graves, aunque continúan sin conocerse las bases celular y molecular de esta enfermedad.

Por otra parte, en los últimos años han surgido descripciones clínicas y experimentales de anomalías oftalmológicas relacionadas con el HPCN, entre ellas el retraso de la apertura palpebral espontánea (Adams y cols., 1989), la insuficiencia de osificación a nivel orbitario (Hayek y cols., 1973), anomalías en el desarrollo del nervio óptico (Stein y cols., 1991; Leung y cols., 1992; Mastaglia y cols., 1978), anoftalmos bilateral (Elliot y cols., 1993), y anomalías oculomotoras (Mac Fault y cols., 1977).

Por otro lado, la TTR que es la principal proteína transportadora de T_4 , ha sido localizada a nivel ocular con una amplia distribución, en EPR, epitelio ciliar, epitelio iridiano, endotelio corneal, capa de fibras nerviosas de la retina y cápsula cristalina mediante técnicas de radioinmunoensayo (Dwork y cols., 1990). Además se sabe que la TTR es incapaz de cruzar la barrera de la membrana de Bruch hacia la retina lo que sugiere que dicha proteína sea sintetizada al menos en parte en el EPR y de ahí transportada a localizaciones específicas dentro del ojo. Lo que no se conoce con exactitud es su función aunque es posible que participe en el ciclo del retinol intraocular (Cavallaro y cols., 1990).

Por todos estos datos, apoyados además por la presencia de distintas isoformas del RHT en la retina y nervio óptico durante el desarrollo (Yusta B y cols., 1988; Sarlieve y cols., 1989; Sjoberg y cols., 1992; Stein y cols., 1994; Pinazo-Durán y cols., 1997) y por nuestros trabajos preliminares que sugieren que la ausencia de HT durante el desarrollo del globo ocular induce el retraso en el crecimiento del mismo (Gamborino y cols., 1998; Pinazo-Durán y cols., 1999a; Sevilla y cols., 2000) podemos pensar que las HT desempeñan una función muy importante en el desarrollo del globo ocular y particularmente en la retina y en el establecimiento de la función visual. Y ya que no existen datos concluyentes en este sentido hemos dirigido nuestro trabajo experimental en esta línea, de ahí nuestra principal hipótesis y el motivo fundamental de esta tesis.

II.- INTRODUCCION

En lo que respecta a la práctica oftalmológica diaria, las ametropías (anomalías del estado refractivo de los ojos que inducen una deficiencia de visión) constituyen una de las causas más frecuentes de alteración visual en los pacientes que acuden a las consultas de oftalmología. Tanto su génesis como la evolución posterior de los defectos de refracción han sido relacionadas con muchos factores, entre ellos genéticos, ambientales, endocrinos etc. (Wallman y cols., 1978; Smith y cols., 1980; Olmedo y cols., 1993; Connolly y cols., 1994). Sin embargo la diversidad genotípica y fenotípica de las ametropías ha favorecido el que a pesar de la proliferación de modelos experimentales en los últimos años (Rada y Matthews 1994), aún se desconozca la etiopatogenia para la miopía, hipermetropía y astigmatismo, así como las causas definitivas de las progresiones de éstas. A raíz de estos hechos, Bosch y colaboradores estudiaron en 1998 la posible relación entre la miopía y la disfunción tiroidea del adulto estudiando un grupo control de emétopes y un grupo de pacientes amétopes y determinando los niveles de HT en cada grupo, observando que la cifra de pacientes distiroideos en el grupo de amétopes era el doble que en el grupo control, lo cual podría sugerir que las HT estuvieran implicadas en el desarrollo de las ametropías. Esta hipótesis no debe ser descartada cuando se investigan los posibles motivos de progresión de la miopía o las causas de instauración de la misma. Por todos estos hechos, no dudamos en afirmar que tanto las funciones fisiológicas de las HT en el globo ocular como su función en el establecimiento de la función visual y también sus posibles implicaciones en patologías que afecten al ojo en desarrollo y en el estado adulto, aún permanecen sin esclarecer.

6.-PATOFISIOLOGIA DE LA GLANDULA TIROIDES

Los trastornos de la función tiroidea se clasifican fundamentalmente en dos tipos: Por exceso de actividad, dando lugar a un hipertiroidismo o también llamado tirotoxicosis y por defecto de su actividad, originando el hipotiroidismo (Sidney 1989).

6.a. HIPERTIROIDISMO

El exceso de HT da lugar a una serie de hallazgos clínicos, fisiológicos y bioquímicos que se deducen fácilmente al analizar los efectos fisiológicos de las HT

II.- INTRODUCCION

sobre el organismo y que se engloban bajo el término general de hipertiroidismo o tirotoxicosis.

Tabla 3. Variedades de tirotoxicosis

Trastornos con hiperfunción tiroidea

- Producción excesiva de TSH
- Estimulante tiroideo anormal
 - Enfermedad de Graves
 - Tumor trofoblástico
- Autonomía tiroidea intrínseca
 - Adenoma hiperfuncionante
 - Bocio tóxico multinodular

Trastornos sin hiperfunción tiroidea

- Alteraciones de almacenamiento hormonal
 - Tiroiditis subaguda
 - Tiroiditis crónica (tirotoxicosis transitoria)
- Fuente extratiroidea de hormona
 - Tirotoxicosis ficticia
 - Tejido tiroideo ectópico
 - Estroma ovárico
 - Carcinoma folicular funcionante

Este cuadro clínico más que una enfermedad representa a un síndrome complejo que puede ser producido por distintas causas, las cuales se resumen en la tabla 3.

En los trastornos con hiperfunción tiroidea lo que ocurre es una sobreproducción constante de hormonas por el propio tiroides.

En los trastornos sin hiperfunción tiroidea, lo que ocurre es una fuga en exceso de hormona preformada por la glándula, debido a la enfermedad inflamatoria. Dado que la reserva de hormona preformada se agota y además se produce una inhibición de la formación de nueva hormona debido a la supresión de TSH por el exceso de hormona, se trata de estados transitorios que a menudo se siguen de un periodo de insuficiencia tiroidea.

Si bien todos estos trastornos se acompañan de tirotoxicosis, no todos conllevan

II.- INTRODUCCION

hipertiroidismo. Este término debe reservarse para aquellos estados en que la hiperfunción mantenida del tiroides produce tirotoxicosis.

Esta diferenciación etiopatogénica es muy importante y debe ser tomada en cuenta, sobre todo a nivel terapéutico.

Cuando se produce un exceso de HT circulante durante el periodo gestacional o neonatal se induce el hipertiroidismo congénito o adquirido en la fase inmediata postnatal, que cursa con anomalías del aprendizaje, alteraciones del comportamiento, disfunciones metabólicas secundarias y otras manifestaciones de órganos y sistemas (Shapiro 1968).

Dada la extensión de este apartado, por su importancia y por los trastornos oculares que produce conviene centrar la descripción en la **Enfermedad de Graves-Basedow**. La primera descripción de hipertiroidismo y oftalmopatía data de 1786 cuando Parry asoció el bocio tóxico con las manifestaciones oculares. Graves fue el primer autor en reconocer el origen tiroideo del proceso y Basedow el que analizó de forma más precisa las manifestaciones de la enfermedad. Esta se define como la entidad nosológica en la que existe una alteración severa de los mecanismos homeostáticos que regulan la secreción hormonal (Wall y How 1990) y que luego se ha relacionado con la presencia en el plasma de anticuerpos contra RHT localizados en las membranas de las células tiroideas, que producen un efecto estimulante de la glándula. Uno de esos anticuerpos se denomina LATS, estimulante tiroideo de larga acción, llamado así por su acción prolongada en comparación a la de TSH. A su vez, la secreción elevada de HT causada por LATS suprime la formación de TSH. Existe actividad LATS en las IgG producidas por los linfocitos de estos pacientes.

Es dudosa la naturaleza de estos anticuerpos, aunque casi con seguridad son resultado de la autoinmunidad desarrollada contra el tejido tiroideo, por una liberación excesiva de antígenos celulares tiroideos en alguna época de la vida. Tampoco se conocen bien los mecanismos intrínsecos que a nivel ocular provoca esta enfermedad, aunque se cree que puede ser debido a la aparición de anticuerpos contra los músculos extraoculares y también se postula que exista un transporte linfático de Tg desde el tiroides a los tejidos orbitarios generándose una respuesta inmunológica. La enfermedad de Graves-Basedow presenta una triada de manifestaciones:

II.- INTRODUCCION

1.- **Hipertiroidismo con bocio difuso:** La glándula está hipertrófica e hiperplásica, con una infiltración linfocitaria que refleja el carácter inmune de la enfermedad. Las manifestaciones derivadas de la tirotoxicosis incluyen nerviosismo, temblor, aumento del ritmo intestinal, sudoración excesiva, intolerancia al calor, pérdida de peso, oligomenorrea o amenorrea, disnea, palpitaciones, amplitud de la presión del pulso, taquicardia sinusal, arritmias auriculares y en pacientes cardíopatas puede sobrevenir o agravarse la insuficiencia cardíaca. Los signos oculares debido a la hiperestimulación simpática son: mirada fija con aberturas palpebrales ensanchadas, parpadeo poco frecuente, e incapacidad de arrugar la frente al mirar hacia arriba.

2.- **Oftalmopatía infiltrativa:** Se caracteriza histopatológicamente por un infiltrado inflamatorio del contenido orbitario (Mateos y cols., 1993) exceptuando el globo ocular, siendo lo más afectado la musculatura extraocular, que aumenta su volumen siendo una de las causas de proptosis. Además se produce una degeneración progresiva de las fibras musculares que puede terminar en atrofia. Las manifestaciones clínicas incluyen: retracción de los párpados, proptosis, oftalmoplejia, oculopatía congestiva (que incluye quemosis, conjuntivitis, edema periorbitario y que puede complicarse con neuritis óptica e incluso atrofia óptica (Neigel y cols., 1988; Perez-Moreiras 1995). También se ha sugerido la asociación entre hipertiroidismo y uveitis, aunque se desconoce el mecanismo patogénico (Nakao y cols., 1994). (Tabla 4).

3.- **Dermopatía:** Existe también una infiltración de la dermis por linfocitos y mucopolisacáridos que da lugar a un engrosamiento de la misma, sobre todo a nivel del dorso de los pies y las piernas, llamado mixedema localizado o pretibial. La piel se encuentra elevada, engrosada, y con aspecto de piel de naranja.

Tabla 4. Signos Clínicos y clasificación de la oftalmopatía distiroidea

Clase 0: Distiroidismo sin alteración oftalmológica ni signos oculares

Clase 1: Retracción palpebral. Tortuosidad venosa sobre las inserciones musculares en el globo

Clase 3: Los anteriores más proptosis del globo ocular [*medida con exoftalmómetro de Hertel*, mínima (entre 21-23 mm); moderada (24-27 mm); fuerte (mayor de 28 mm)].

Clase 4: Los anteriores más aparición de trastornos de los músculos extraoculares.

Clase 5: Los anteriores más afección de la córnea (desde epitelopatía leve por exposición a queratitis por lagofthalmos y ulceración grave, necrosis y perforación del globo ocular).

Clase 6: Los anteriores más neuropatía óptica (edema del disco óptico, pérdida de agudeza visual moderada o severa que puede llegar a la amaurosis).

II.- INTRODUCCION

6.b. HIPOTIROIDISMO

La disminución en la disponibilidad de HT da lugar a un cuadro multisistémico conocido como hipotiroidismo y cuyas causas se muestran en la tabla 5 (Sidney 1989).

Tabla 5. Clasificación etiopatogénica del hipotiroidismo

Origen tiroideo (95%)

---- Tiroprivas

- Defecto congénito del desarrollo
- Idiopática primaria
- Tras eliminación (yodo radiactivo, operación) o radiación (linfoma)

---- Bociosas

- Defectos hereditarios en la biosíntesis
- Transmitidas por la madre (yoduros, antitiroideos)
- Deficiencia de yodo
- Medicamentosas (ácido p-aminosalicílico, yoduros, fenilbutazona, yodoantipirina, litio)
- Tiroiditis crónica (Hasimoto)

Causas Supratiroideas (tiroprivas) (5%).

---- Hipofisarias

---- Hipotalámicas

De resolución espontánea

---- Tras suspender la terapéutica tiroidea supresora

----Tiroiditis subaguda y tiroiditis crónica con hipotiroidismo transitorio (generalmente tras una fase de tirotoxicosis)

Las manifestaciones clínicas en el hipotiroidismo del adulto se resumen de la forma siguiente: Según la etiología, se produce bocio (engrosamiento generalizado o localizado de la glándula), que puede ser simple o no tóxico, en el que no existen otras manifestaciones clínicas de hipotiroidismo. Como manifestación del déficit de HT al inicio de la enfermedad hay aletargamiento, estreñimiento, intolerancia al frío, rigidez muscular y calambres, síndrome del tunel del carpo y menorragia. A medida que avanza la enfermedad se produce un enlentecimiento de la actividad psico-motora, disminución del apetito, aumento de peso, sequedad de piel, caída del cabello, cambio del tono de voz y disminución de audición. Puede haber apnea obstructiva durante el sueño. A la larga

aparece el cuadro clínico de mixedema florido, con facies abotargada e inexpresiva, cabello escaso, aumento del volumen periorbitario, blefaroptosis, nictalopia, lengua grande y piel pálida, fría, endurecida y pegajosa. Se ha descrito una posible relación entre hipotiroidismo y glaucoma y existe un caso publicado de remisión de glaucoma en un paciente hipotiroideo sometido a tratamiento con tiroxina durante un año (Smith y cols., 1992). No se palpa tejido tiroideo salvo la variedad que presenta bocio. Existe crecimiento cardíaco por dilatación y por derrame pericárdico. Puede ocurrir obstrucción intestinal. En algunos casos el cuadro clínico está dominado por síntomas psiquiátricos o ataxia cerebelosa.

En la infancia el aspecto de los hipotiroideos depende de la edad de inicio de la deficiencia y rapidez del tratamiento. Es importante el diagnóstico precoz mediante detección de TSH y T₄, para instaurar el tratamiento antes de los primeros signos clínicos (Delange y cols., 1976; Mc Fault y Grant 1977). El cretinismo puede manifestarse al nacimiento pero suele hacerlo en los primeros meses (según el grado de insuficiencia tiroidea) con persistencia de ictericia fisiológica, llanto ronco, sueño, estreñimiento y problemas alimentarios. En los meses siguientes destaca el retraso en el desarrollo y aparición de rasgos físicos del cretino con talla baja, facciones ásperas con protusión de la lengua, nariz ancha y plana, ojos separados, cabello escaso, piel seca, abdomen protuberante con hernia umbilical y desarrollo mental deficiente (Morreale de Escobar y Escobar del Rey, 1980). En niños mayores las manifestaciones son intermedias entre el neonato y adulto y hay evidencia de que un buen control tiroideo mejora el resultado de los test cognitivos en estos niños (Klein y cols., 1994).

7. EMBRIOLOGIA DEL MACIZO CRANEOFACIAL, GLOBO OCULAR Y TEJIDOS ANEXOS.

7.a. DESARROLLO DE LA REGION CRANEOFACIAL.

El prosencéfalo, la parte más anterior de las vesículas nerviosas primitivas, adquiere en fases precoces del desarrollo (horizonte XI de Streeter) una forma redondeada y se rodea de una fina capa de mesodermo envuelta finalmente por ectodermo y constituirá la mayor parte de la cara primitiva. Inmediatamente por debajo se configurarán los primeros arcos branquiógenos (el primero de los cuales dará lugar a la mandíbula).

II.- INTRODUCCION

Por tanto, en la primera fase, la cara embrionaria está delimitada por arriba por la vesícula más anterior del tubo nervioso, por debajo por el primer arco branquiógeno o arco mandibular y lateralmente por la prolongación del arco mandibular en sentido ascendente que dará lugar a los *mamelones o protuberancias maxilares*.

En medio de estas formaciones queda la hendidura bucal o estomodeo. Alrededor de la quinta semana se produce un cambio importante en la morfología de la cara, debido a que se produce una rápida proliferación del mesodermo que cubría el prosencéfalo y crece entre los dos mamelones maxilares constituyendo el *mamelón fronto-nasal*, el cual va a dar lugar a las dos terceras partes de la superficie total de la cara. En esta etapa además las placodas cristalinas se encuentran sobre los *mamelones maxilares*.

Alrededor de la sexta semana aparecen unas condensaciones ectodérmicas que se engrosarán y darán lugar a las *placodas nasales*, que inmediatamente e inducido por la acción organizadora de la placa precordial, van a sufrir una invaginación en la parte más inferior que posteriormente darán lugar a las fosas nasales. En esta fase el *mamelón fronto nasal* queda dividido en tres porciones: el mamelón nasal medio situado en la posición central y entre las dos invaginaciones y los mamelones nasales laterales a ambos lados de dichas invaginaciones.

Al final de la sexta semana hay una fusión entre los mamelones nasales laterales y sus correspondientes maxilares, dejando en medio el *surco nasomaxilar o naso-lagrimal*.

En esta misma fase aparecen a ambos lados de la cara los *primordios ópticos* (esbozo de los globos oculares) y además el ectodermo del surco nasomaxilar forma un cordón de células que se introduce en el mesodermo y posteriormente se canaliza, dando lugar su porción más externa al saco lagrimal y la más interna se abre a la ventana de la nariz completando el conducto naso-lagrimal.

Todas las características morfológicas del desarrollo del macizo craneo-facial, en relación con estadio evolutivo quedan reflejadas en la figura 9.

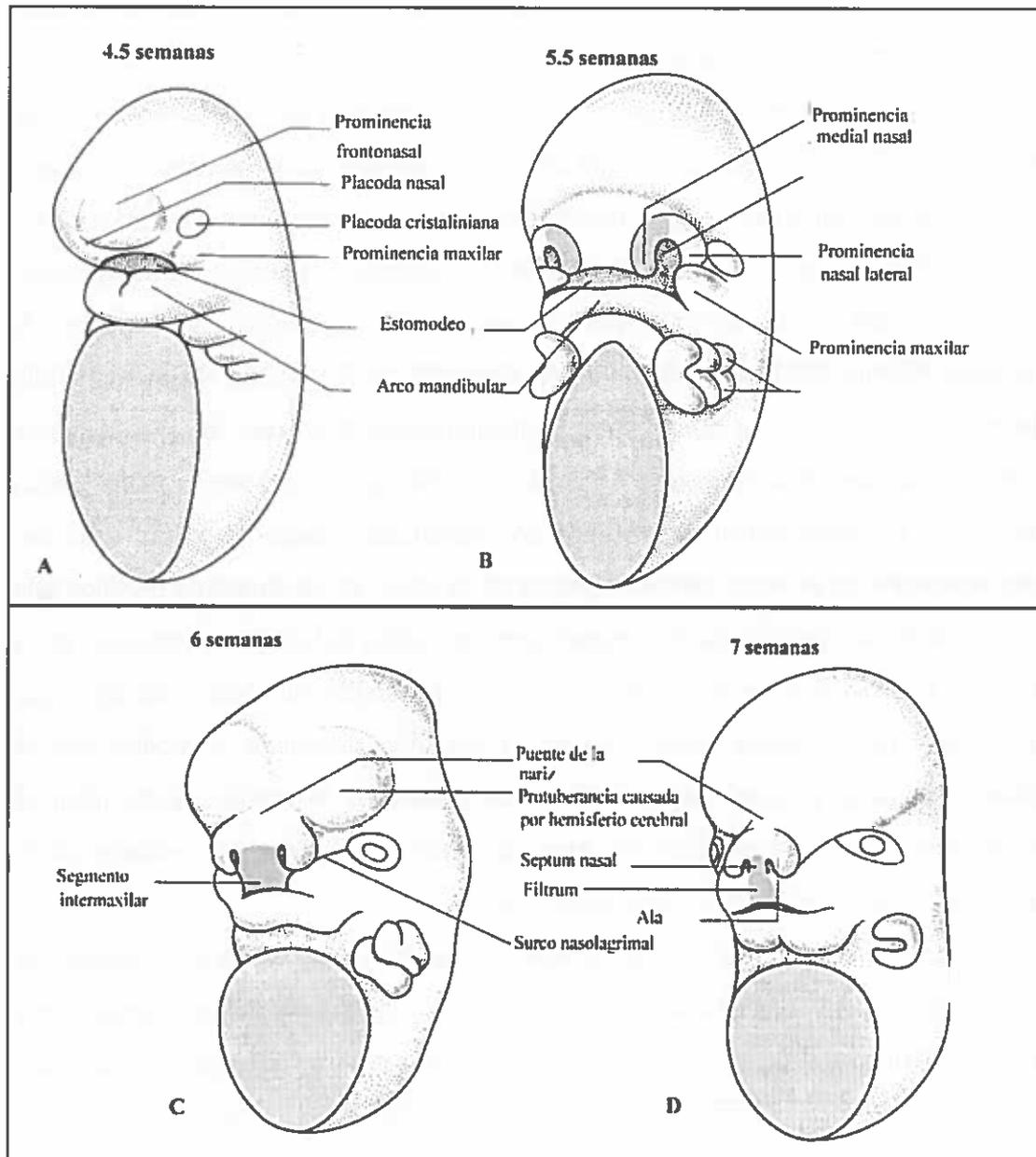


Fig. 9. Desarrollo del macizo craneofacial. Los procesos nasales y segmentos intermaxilares se muestran coloreados en rosa.

7.b. DESARROLLO DEL GLOBO OCULAR

Los dos sucesos clave en el desarrollo de los globos oculares ocurren en la cuarta semana de gestación en el humano y alrededor de la mitad de la primera semana de gestación en los roedores (Kaufman, 1992; Saude, 1993; Sweeney, 1998).

El comienzo de este proceso surge por la formación de un pequeño surco que aparece

II.- INTRODUCCION

a ambos lados del tubo neural antes de que este se cierre para formar la vesícula diencefálica (Fitzgerald y Fitzgerald, 1994 b). Este surco es el primer *esbozo de la vesícula óptica*, que en este momento está unida al tubo neural por el tallo óptico, como se aprecia en la figura 10A. Esta vesícula óptica va creciendo hasta ponerse en contacto con el ectodermo superficial de la futura piel, induciendo un engrosamiento de las células ectodérmicas que va a formar la *placoda cristaliniiana*, la cual se irá invaginando hasta separarse del ectodermo de la piel. A medida que va invaginándose la placoda cristaliniiana (Figura 10B) va produciendo una depresión en la vesícula óptica adoptando finalmente forma de copa, la *copa óptica*. La invaginación de la copa óptica se extiende a lo largo de la superficie interna de la copa y el *tallo óptico* creando la fisura óptica (Figura 10C). La fisura óptica es infiltrada por mesénquima antes de que se unan sus paredes alrededor de la sexta semana. Dentro de la copa, el mesénquima produce una secreción gelatinosa que rellena el compartimento posterior del ojo, como aparece en la figura 10D. También a partir de ese mesénquima se desarrollan los vasos hialoideos que pasan a través de la cámara vítrea y nutren el cristalino inmaduro. A medida que el cristalino madura, la porción distal de los vasos hialoideos se atrofia, dando lugar al canal hialoideo que cruza el vítreo. Su parte proximal forma los vasos centrales de la retina (Figura 10E). (Saude, 1993; Sweeney, 1998).

Durante las semanas quinta y sexta, la capa externa de la copa óptica es revestida con una cáscara de mesénquima que deriva del mesodermo precordial y del ectomesénquima de la extremidad rostral de la cresta neural. Este mesénquima se diferencia en vascular, que da lugar a la *coroides*, y fibroso que da lugar a la *esclerótica* y *córnea*.

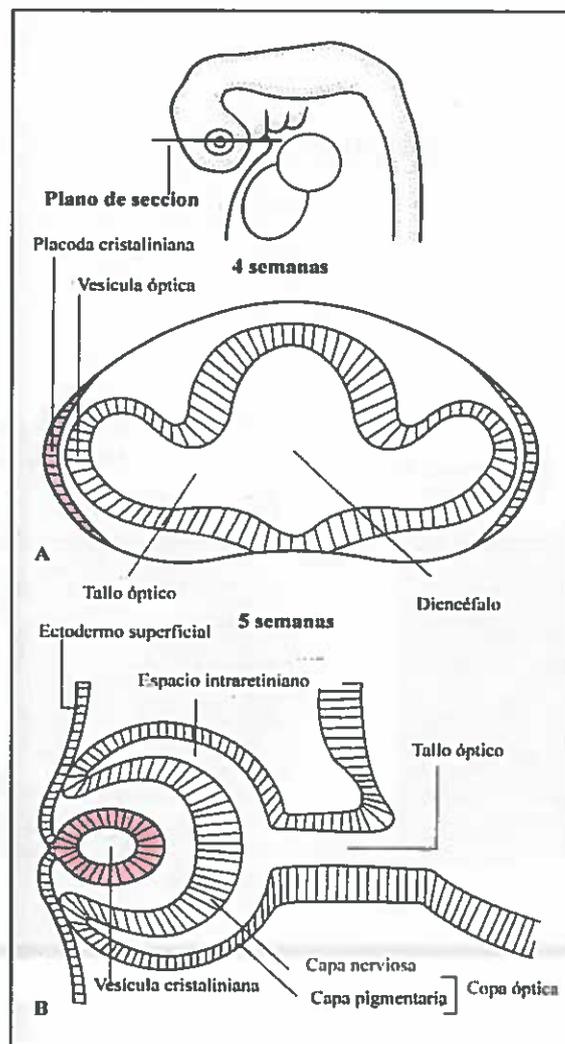
Los músculos extraoculares se desarrollan del mesodermo precordial situado por fuera de la cáscara.

En la unión de la esclera con la córnea, el recubrimiento vascular forma la mayor parte del cuerpo ciliar (músculo ciliar y procesos ciliares). Por delante del cristalino se forma el tejido conectivo del iris. Los músculos del iris (esfínter y dilatador de la pupila) se diferencian del neuroectodermo que tapiza su superficie posterior. Las células de la pared posterior de la vesícula cristaliniiana se elongan y forman las fibras cristaliniianas primarias. Las fibras cristaliniianas secundarias se forman más tarde a partir de células que migran al interior del cristalino a partir de una zona mitótica alrededor del margen

II.- INTRODUCCION

del cristalino, como se vé en la figura 10E. El epitelio externo de la copa óptica acumula pigmento melánico y se convierte en epitelio pigmentario de la retina. Alrededor del borde de la copa, las capas más externa e interna forman el epitelio posterior del cuerpo ciliar y el iris.

Los músculos oculares intrínsecos son de origen ectodérmico. El músculo ciliar se desarrolla a partir de células ectomesenquimales del cuerpo ciliar, mientras que el esfínter y dilatador de la pupila lo hacen a partir del epitelio posterior del iris. La mayoría del epitelio interno de la copa óptica se convierte en la capa nerviosa de la retina, que se diferencia en células fotosensoriales, neuronas bipolares y ganglionares y células neurogliales. Existen 1-1.5 millones de ganglionares y sus axones forman la capa de fibras nerviosas de la retina a medida que convergen en el tallo óptico.



Figs.10A y 10B

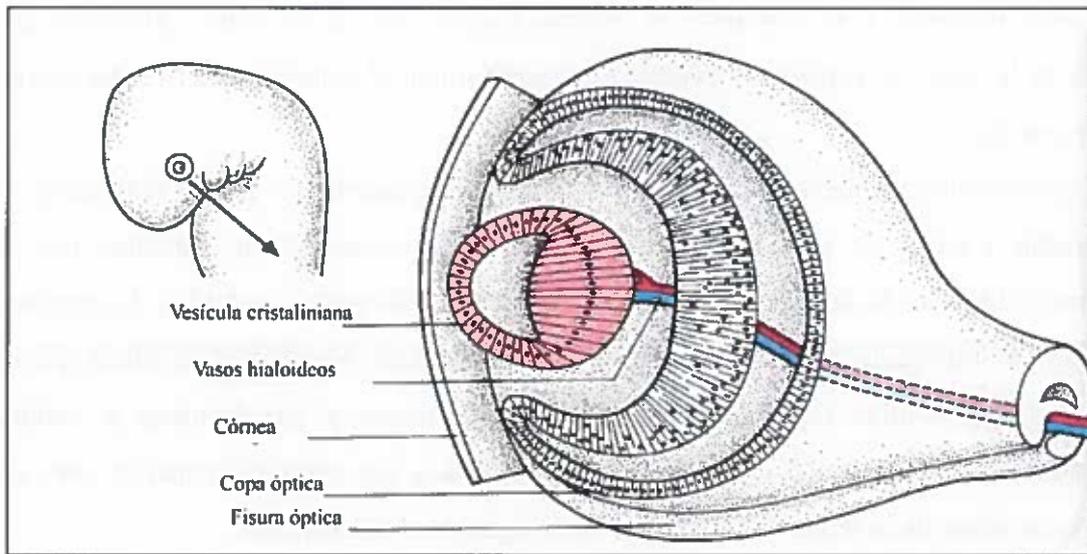


Fig. 10C

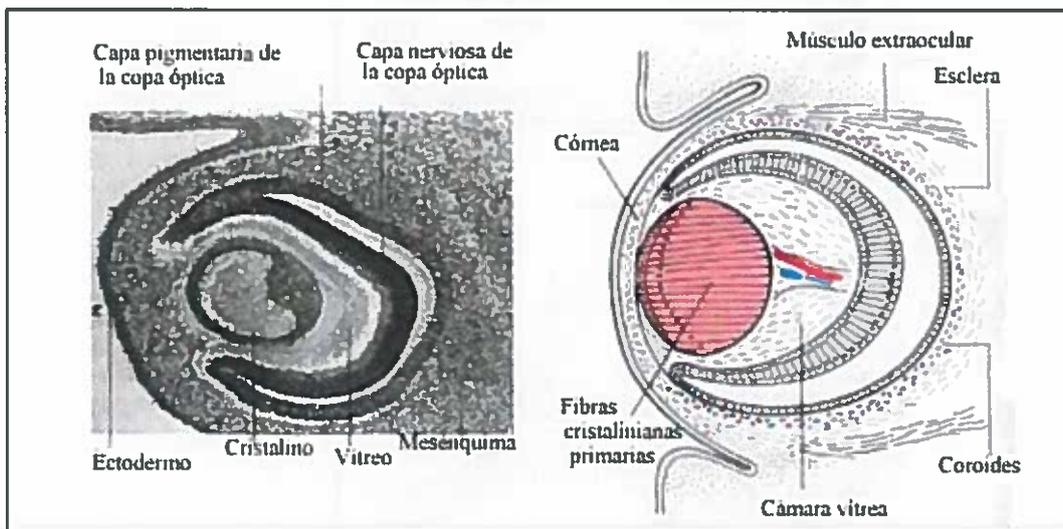


Fig 10D

Fig. 10E

II.- INTRODUCCION

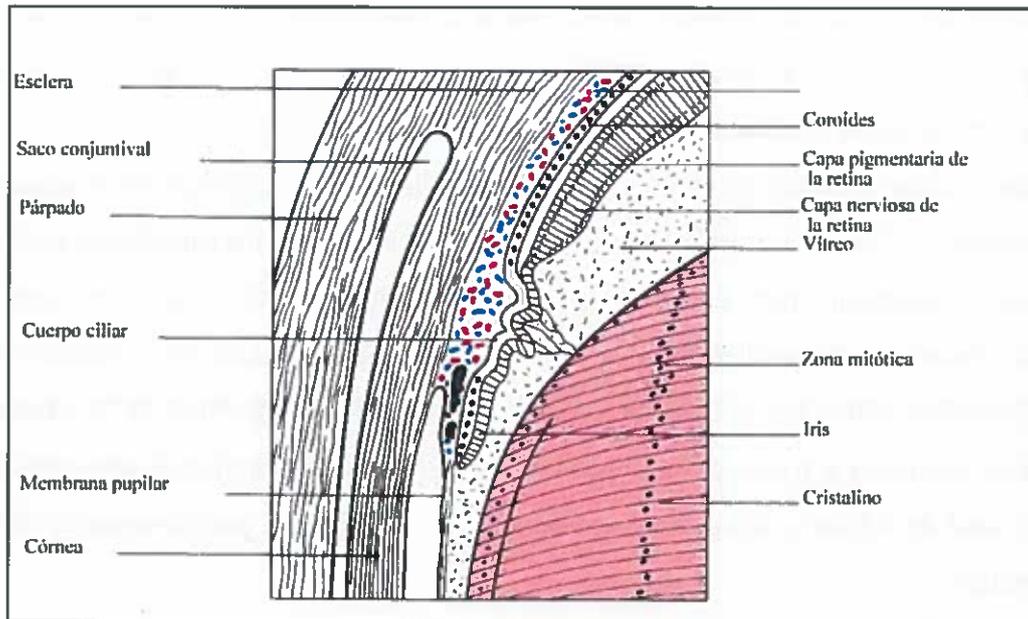


Fig. 10F

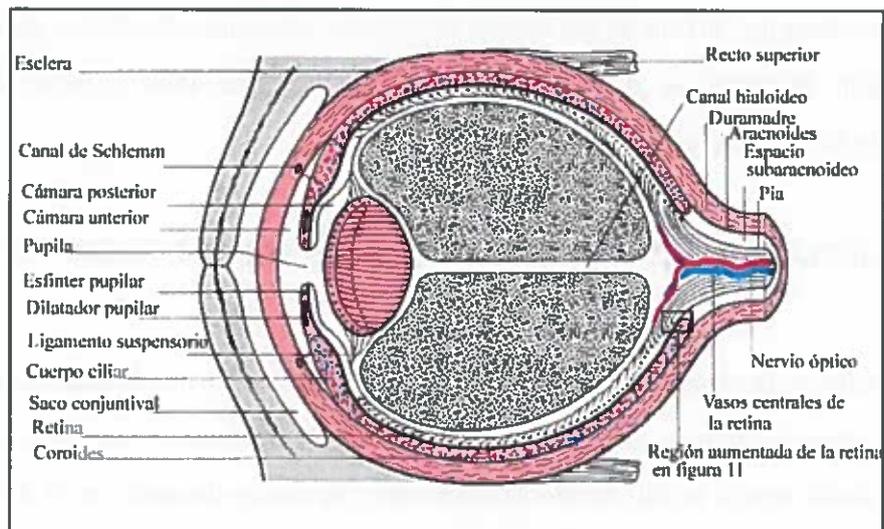


Fig. 10G

Figura 10. Dibujos seriados de la embriogénesis del globo ocular. A y B. muestran el desarrollo temprano del ojo. C. Esquema del ojo a las seis semanas de gestación, mostrando la fisura óptica. D. Corte sagital del ojo a las seis semanas y media. E. Dibujo demostrativo de la órbita a las ocho semanas. F. Desarrollo tardío de la parte anterior del ojo. G. Boceto de la sección transversal del ojo a las veinte semanas.

II.- INTRODUCCION

La fisura óptica crea un conducto directo hacia el tallo óptico, para los axones de las células ganglionares, que discurren a lo largo de la pared interna de la fisura óptica como el nervio óptico, que al derivar del SNC se rodea de las vainas meníngeas.

El humor acuoso es segregado por los procesos ciliares, acumulándose en el espacio entre la córnea y el cristalino. Inicialmente la capa vascular forma una membrana pupilar enfrentada al cristalino, pero esta se desintegra a medida que se acumula el humor acuoso. Entonces es posible identificar la cámara anterior del ojo (entre iris y córnea) y la cámara posterior (entre iris y cristalino). El humor acuoso se moviliza de la cámara posterior a la anterior a través de la pupila y pasa de la cámara anterior al seno venoso escleral (canal de Schlem), una pequeña vena que rodea el ojo en el margen anterior de la capa coroides.

Los párpados son pliegues mesenquimales que derivan de los procesos frontonasal y maxilar, rodeados por ectodermo de superficie, que crecen para juntarse enfrente de la córnea durante el segundo mes de gestación. Desde el tercer mes al sexto, el saco conjuntival se cierra por fusión de los bordes epiteliales aposicionados de los párpados.

La glándula lagrimal se desarrolla a partir de la parte más externa del saco conjuntival, en forma de glándulas exocrinas.

7.c. DESARROLLO DE LA RETINA Y DISTRIBUCION DE LAS CAPAS

El primordio de la retina está presente desde el estadio de foseta óptica, en la tercera semana de gestación, incluso antes de que se cierre el tubo neural. Después de que el estadio de vesícula óptica ha alcanzado su desarrollo (aproximadamente en el día 26), se produce rápidamente la diferenciación del ectodermo neural (Saude, 1993; Sweeney, 1998). Hay cambios en la parte central de la vesícula óptica al tiempo que se producen modificaciones en la superficie ectodérmica en contacto con ella, siendo la primera manifestación visible de la inducción del cristalino (Figura 10A). La capa interna de la copa óptica tiene una zona nuclear externa y una interna anucleada marginal. La capa externa de la zona nuclear externa (capa germinativa o proliferativa) proyecta cilios a la superficie de la capa externa de la copa óptica, o futuro epitelio pigmentario de la retina, los cuales desaparecen en la séptima semana, siendo sustituidos por los precursores de los segmentos externos de los fotorreceptores en el cuarto mes. (Figura 10B).

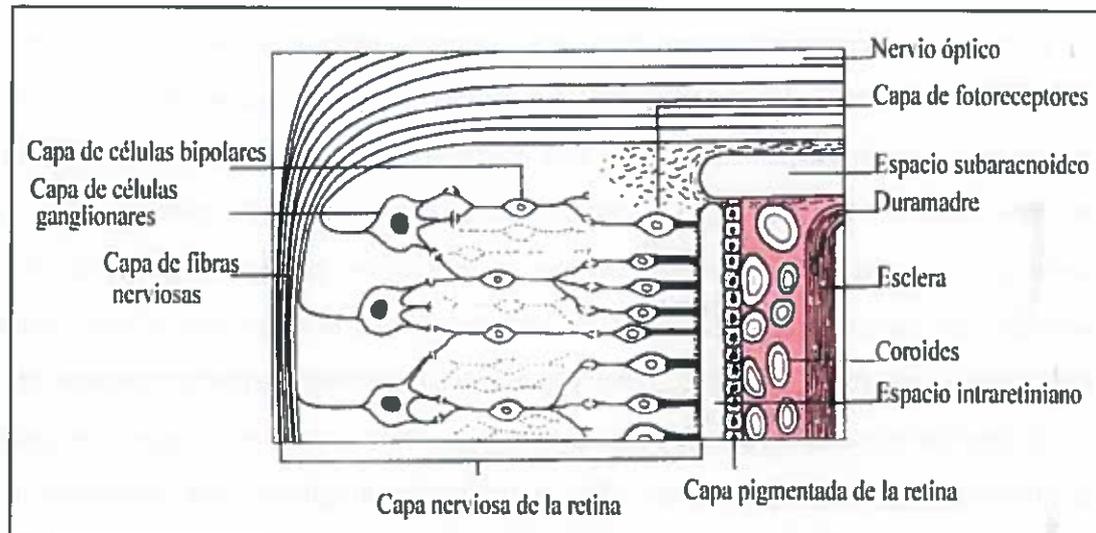


Figura 11. Esquema de las capas de la retina a las veinte semanas de gestación.

Se acepta que al principio las células retinianas tienen las mismas características que cualquier célula epitelial. La diferenciación retiniana comienza cuando cesa la mitosis de estas células. Las células ganglionares y las células de Müller se desarrollan prácticamente a la vez aunque existe un gradiente, de manera que se diferencian antes las células cercanas a la cabeza del nervio óptico y posteriormente las de la retina más periférica.

Con la proliferación y migración de las células, el epitelio neural se separa durante la séptima semana de gestación en capa externa de células neuroblásticas y capa interna. Días más tarde se establece un estrechamiento definitivo en la capa de fibras nerviosas a veces cruzado por las fibras radiales y las células de Muller.

Los cuerpos inmaduros de las células ganglionares se dirigen a la capa neuroblástica interna acompañando a otras células, presumiblemente futuras células amacrinas, creando en su camino un enmarañado de procesos sin núcleo, la capa transitoria de fibras de Chievitz, que desaparecerá entre 8-10 semanas de gestación con el realineamiento de las células. En este período, las células de las capas neuroblásticas interna y externa se mezclan por medio de sus extensiones citoplásmicas, rellenando la previa capa anuclear de Chievitz, constituyendo una zona libre de células, la capa

II.- INTRODUCCION

plexiforme interna.

Con la formación de la capa plexiforme interna, aparece la capa *nuclear interna*, formada en su mayoría por los cuerpos celulares de las *células ganglionares*, y separada de una zona neuroblástica más externa. Los cuerpos celulares de las *células de Muller* y las *amacrinas* en desarrollo se localizan cerca del borde más interno de la zona neuroblástica externa. Las *células bipolares* se diferencian mayoritariamente de la zona media de esa capa más externa, mientras que las *células horizontales* y *fotorreceptores* emergen de la región más externa. Estos procesos se desarrollan entre las semanas 10-12.

Al final del tercer mes, aparecen los precursores de los conos en la capa más externa. Se observa en la capa plexiforme más externa sinaptogénesis que involucra a los pedículos de los conos.

En lo que respecta a la formación de los fotorreceptores, la clave más precoz de la diferenciación de los segmentos de la capa más interna, es la aparición de cilios en las células más externas de la capa nuclear externa a las 10 semanas. Más tarde, la membrana celular forma un proceso citoplásmico cilíndrico enfrente del epitelio pigmentario de la retina en desarrollo. La formación de los segmentos externos comienza a los cinco meses y termina a los 7 meses (Saude 1993; Sweeney 1998).

III. MATERIAL Y METODOS

MATERIAL Y METODOS

En este capítulo se describe el modelo experimental de HPCN, la manipulación de los animales, la obtención de tejidos para las técnicas planificadas, la descripción del aparataje e instrumental empleado, así como los protocolos de cada uno de los ensayos efectuados y los métodos de obtención y procesamiento de los datos.

1. DESCRIPCION DEL MODELO EXPERIMENTAL

1.a. ANIMALES DE EXPERIMENTACION

Para llevar a cabo este trabajo experimental se han empleado un total de 78 ratas juveniles, hembras de la raza Wistar y de peso corporal inicial 175-200 g. vírgenes y que además no habían sido utilizadas previamente para ningún otro tipo de experimento. Las ratas proceden del estabulario del Instituto de Investigaciones Biomédicas de Madrid donde crecieron en condiciones constantes de ciclos luz/obscuridad, temperatura, humedad alimentación, etc.). Todos los experimentos se efectuaron de acuerdo a la normativa vigente [*European Communities Council Directive of November 24th, 1986 (86/609/EEC)*] con el fin de minimizar el sufrimiento animal, reducir el número de animales utilizados (por lo que cada uno de éstos fue destinado a varios investigadores) y para utilizar alternativas a las técnicas “in vitro” necesarias para la extrapolación de resultados al ser humano.

La dieta se basó en la alimentación con pienso “Sanders” y administración de agua potable para bebida “ad libitum”. Se estableció un control dietético riguroso durante toda la experimentación, de forma que el aporte calórico diario total fue de 18% en forma de proteínas, 21% en forma de grasas y 61% como hidratos de carbono, con un suplemento vitamínico-mineral adaptado al ciclo vital del animal y modificado según requerimientos.

Las ratas fueron preparadas para cruzarse con machos de la misma raza con el objetivo de obtener las crías en nuestro propio animalario y utilizarlas a las edades previstas. Cuando las hembras se encontraron en fase de estro o poestro de su ciclo, se expusieron a los machos durante toda la noche, realizándoles un frotis vaginal a la mañana siguiente, que se observó en fresco al microscopio de contraste de fases. La cópula se confirmó por la presencia de espermatozoides en el frotis vaginal. Este día se denominó día 0 de la gestación (G) y a partir de aquí las hembras se separaron en jaulas

III.- MATERIAL Y METODOS

individuales perfectamente identificadas, controlándoles el incremento de peso y el consumo nutritivo diario durante los 22 días de la gestación.

1.b. MODELO EXPERIMENTAL DE HPC

El hipotiroidismo fue inducido químicamente en las ratas gestantes mediante administración en el agua de bebida de una concentración de *2-mercapto-1-metilimidazol* al 0.02% desde el día 9G hasta el fin del período gestacional o su sacrificio, según un modelo previamente establecido (Muñoz y cols. 1991, 1993; Lopez-Barahona y cols., 1996). La posible evaporación de los bebederos y la ingesta de líquido por los animales fué controlada durante toda la gestación (Figura 12A).

Para evaluar la función tiroidea se efectuaron determinaciones en sangre de las hormonas tiroideas mediante técnicas de radioinmunoensayo (Tabla 6). Las ratas gestantes hipotiroideas mostraron niveles bajos de T₃ y T₄ en sangre circulante, en comparación con los datos de animales no tratados y extrapolables a los que se han descrito en sangre de mujeres gestantes hipotiroideas (Shapiro 1968; Mc Fault y Grant, 1977; Morreale de Escobar y cols., 1980, 1985, 1990; 1993).

Tabla 6. Concentraciones de T₄ y T₃ en plasma, obtenidas de ratas gestantes control e hipotiroideas durante la última semana de gestación. (Los datos son media \pm DS de 12 ratas).

	T ₄		T ₃	
	Controles	Hipotiroideas	Controles	Hipotiroideas
día 16	2.8 \pm 0.2 μ g/dl	0.07 \pm 0.01 μ g/dl	43 \pm 2 ng/dl	9.6 \pm 0.4ng/dl
día 21	1.1 \pm 0.3 μ g/dl	0.08 \pm 0.02 μ g/dl	19 \pm 5 ng/dl	12.1 \pm 1.3ng/dl

1.c. OBTENCION Y MANIPULACION DE LA DESCENDENCIA Y CONFIRMACION DEL ESTADO DE HPCN

Entre las ratas gestantes, se eligieron al azar las 28 a sacrificar para destinar sus crías a los experimentos correspondientes al período prenatal (G) mediante la inducción del hipotiroidismo, obteniéndolas los días 13G, 15G, 18G, 19G y 21G. El día indicado se pesó la rata y tras exponerla unos minutos a una atmósfera de éter, se decapitó mediante guillotina, se efectuó una cesárea visualizando el número de implantaciones, embriones o

III.- MATERIAL Y METODOS

fetos viables o no viables, reabsorciones, etc. (Fig. 12B). Se separaron los embriones o fetos y las placentas, observando posibles malformaciones y anomalías de interés para nuestros objetivos (Fig. 12C). Las crías se pesaron y decapitaron con tijeras quirúrgicas para obtener íntegras las cabezas los días indicados anteriormente (Fig. 12D). Se obtuvieron 4-5 cabezas por cada día de experimentación prenatal. Además un grupo de fetos se destinó a la obtención de los globos oculares los días 19G y 21G, sacrificando entre 4-5 fetos por cada día de experimentación conveniente para el estudio de los ojos .

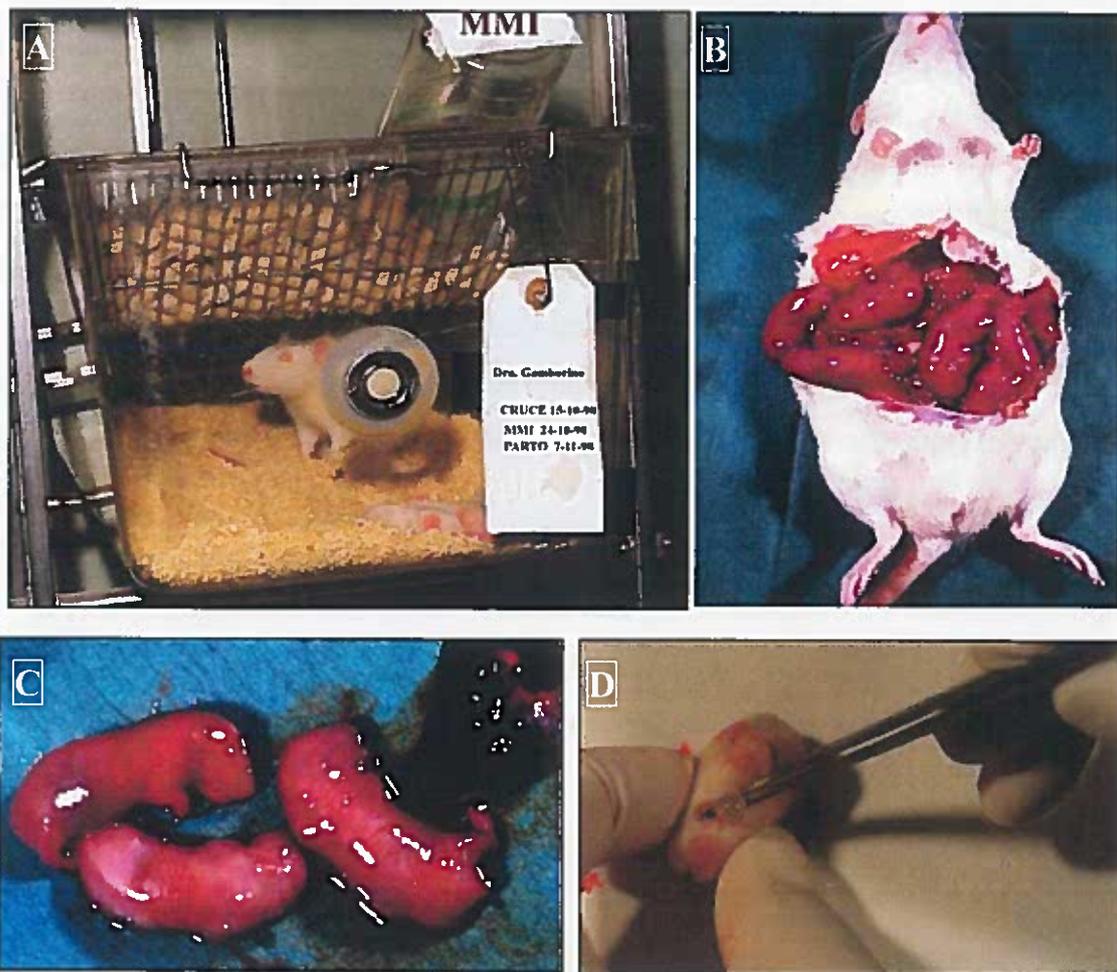


Fig. 12. Manipulación de los animales y obtención de las muestras. A. Ratas en las jaulas del estabulario con sus crías. Identificación de las mismas. B. Cesárea de rata gestante. C. Fetos recién extraídos. D. Obtención de los globos oculares.

Otro grupo de ratas gestantes se destinaron a experimentos postnatales (P), permitiéndoles llevar su gestación “a término” vigilando el parto entre los días 21 y 23 para controlar el número de crías, pesarlas y examinarlas para establecer la presencia o

III.- MATERIAL Y METODOS

no de anomalías. Las crías se mantuvieron con sus madres biológicas durante toda la lactancia, controlando la ingesta alimentaria, peso corporal y determinando en sangre los niveles de T_3 y T_4 . Si alguna de las crías se malogró, se repuso inmediatamente para mantener constante el número de crías con cada madre.

Teniendo en cuenta el importante periodo de desarrollo para el SNC (“brain growth spurt”) que abarca más allá del nacimiento de la rata (Dobbing y Sands 1979; Pinazo-Durán y cols., 1993) y con el fin de asegurar el estado hipotiroideo de los animales y anular la función de su propia glándula tiroidea, se efectuó una tiroidectomía total a todos y cada uno de los neonatos el día 5P. Para ello se induce la anestesia en atmósfera de éter, y se sujetó a la cría convenientemente a una tabla quirúrgica, extendiéndolo y asegurando mediante cinta adhesiva las extremidades a la misma. Se incidió longitudinalmente con hoja de bisturí la región anterior del cuello, separando planos músculo-aponeuróticos hasta acceder al tiroides, que se disecó en su totalidad (Figura 13). Posteriormente se suturó la herida, permitiendo la recuperación del animal.

Este modelo resulta en una profunda disfunción tiroidea que se comprobó igualmente mediante determinación de los niveles en sangre por radioinmunoensayo según Morreale de Escobar y cols., 1985, 1990.

Así queda asegurada la condición de HPCN de las crías denominando a este grupo, el grupo hipotiroideo experimental (GH). Los días 5P, 10P, y 25P se escogieron al azar 8-10 animales por cada día de experimentación y tras pesarlos se sacrificaron mediante decapitación con tijeras en los más pequeños y mediante guillotina los mayores, para obtener los globos oculares.

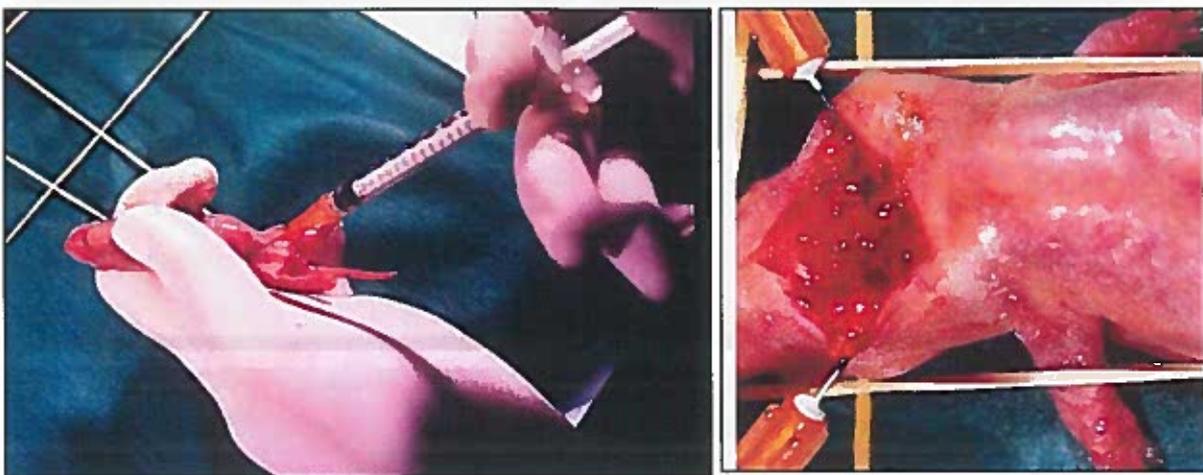


Fig.13. Tiroidectomía total efectuada a crías (día 5 postnatal) . A.-Anestesia. B.- Tiroidectomía

1.d COMPROBACIÓN INDIVIDUAL DEL EFECTO DE LA INGESTIÓN DEL ANTITIROIDEO DE SINTESIS METIL MERCAPTO IMIDAZOL EN EL DESARROLLO DEL MACIZO CRANEOFACIAL Y GLOBO OCULAR. CONSIDERACIONES SOBRE LOS EFECTOS TERATOGENICOS DEL TRATAMIENTO ANTITIROIDEO.

Con el fin de descartar el posible efecto tóxico o teratogénico del antitiroideo de síntesis Metil Mercapto Imidazol (MMI) sobre el desarrollo del macizo craneofacial y del primordio ocular y dada la ausencia de bibliografía al respecto, administramos la misma concentración de la sustancia química utilizada para inducir el hipotiroidismo materno en el agua de bebida (0.02%) a un grupo de 18 ratas gestantes desde el día 9G y diariamente durante toda la gestación, manteniendo en paralelo a 18 ratas más sin administración de la misma. Los días 13G, 15G, 18G y 21G se eligieron al azar cuatro ratas de cada grupo que se midieron, pesaron y decapitaron para obtener los embriones y fetos, que se examinaron minuciosamente en cuanto a detalles del macizo craneofacial y primordio ocular.

Un feto de cada una de las cuatro madres diferentes de cada grupo se pesó y decapitó para obtener la cabeza y procesarla para microscopía electrónica de barrido. El resto se utilizó para analizar otras estructuras y órganos. A este grupo se le denominó grupo tratado con MMI (GMMI), sin ser tiroidectomizado.

1.e UTILIZACIÓN DE ANIMALES CONTROLES

Es necesario disponer de un número de animales criados y alimentados igual que los tratados y que se sacrificarán paralelamente a aquellos completando todos y cada uno de los días de experimentación. Los registros nutricionales, la determinación del peso corporal y las medidas de niveles hormonales se efectuaron de forma idéntica al grupo experimental. Este grupo se denomina control (GC) y es esencial para efectuar la comparación de resultados entre ambos grupos. En el caso de los animales que se trataron únicamente con el antitiroideo oral, sin efectuar la tiroidectomía quirúrgica (GMMI) también se mantuvo otro grupo de animales de desarrollo paralelo y que se consideraron como controles (GC2).

1.f. CANTIDAD TOTAL ANIMALES SACRIFICADOS EN RELACIÓN AL GRUPO

Clasificándolos respecto al período del desarrollo y su grupo correspondiente, las ratas gestantes (n=78) y crías (n'=176) que han sido sacrificadas durante este trabajo han sido los siguientes:

UTILIZACION DE LAS RATAS GESTANTES Y SU DESCENDENCIA

Grupo	Madres	13G	15G	18G	19G	21G	5P	10P	25P
GC	22	4	4	4	8	16	12	12	12
GH	22	4	4	4	8	16	12	12	12
GC2	17	4	4	4		4			
GMMI	17	4	4	4		4			
Total	78	16	16	16	16	40	24	24	24

1.g. OBTENCIÓN Y MANIPULACIÓN DE LOS TEJIDOS

Nuestro objetivo fue obtener las cabezas y globos oculares de embriones, fetos y animales postnatales en ambos grupos, para efectuar el estudio morfológico, el análisis morfométrico correspondiente y realizar ensayos inmunológicos sobre las estructuras oculares, concretamente la retina.

A) Las cabezas se obtuvieron los días 13G, 15G, 18G y 21G, procediendo a su limpieza y lavado en tampón de Sorensen y procesándolos para microscopía electrónica de barrido (Waterman 1974; Wickman y Worthen 1974; Cook y Sulik 1986). El protocolo se describe a continuación:

- 1.- Fijación de la pieza completa en una solución de formaldehído 2.5% en tampón de Sorensen durante 24 horas en nevera a 4°C. (este paso fue modificado posteriormente y se describe en nota al margen).
- 2.- Tres lavados de 5 minutos cada uno en tampón de Sorensen.
- 3.- Deshidratación en concentraciones crecientes de etanol (50%, 70%, 80%, 90% y 95% dos veces en etanol absoluto 100 %) y desecación en acetona.
- 4.- Punto crítico mediante dióxido de carbono, colocando las cabezas en solución de acetona cubriéndolas totalmente y en dedales de rejilla metálica convenientemente

III.- MATERIAL Y METODOS

identificadas. El tiempo necesario para la obtención del punto crítico osciló entre 1-3 horas, dependiendo del número de muestras incluidas y del tamaño de las mismas.

5.- Una vez obtenido el punto crítico se colocaron las cabezas mediante adhesivo en placas de aluminio, aplicando un puente con solución de plata para favorecer la transmisión. Se orientaron convenientemente cada una de las cabezas para su visualización al microscopio.

6.- Se sombrearon con una lluvia de partículas de oro de 400 Å en un "Sputter coater SCD 004 Balzers Gold Palladium" al vacío (5×10^{-2} mbar) durante un tiempo aproximado 10-18 minutos.

7.- Finalmente se almacenaron al vacío hasta su utilización.

8.- Se fotografiaron en microscopio electrónico de barrido "Scanning Jeol JSM 50 A" x40, x120 y x200 utilizando una película Agfapan APX (100 ASA). Las electro-micrografías se ampliaron a dos niveles: x2 y x3.

9.-El examen de cada espécimen y el análisis de imágenes se efectuó en un microscopio electrónico de barrido "Scanning Hitachi S-4100" acoplado a un sistema de ordenador con el programa de procesamiento de imágenes a microscopía electrónica "Electron Microscope Imagen Processing Multi Sync 5 FG-NEC" y utilizando una videoimpresora profesional tipo "Sony VP 869 CE Videographic printer".

Nota: Tras haber realizado el primer proceso de inclusión se observaron algunas zonas deterioradas en la superficie de algunas de las cabezas, aunque tras varias pruebas se subsanó este contratiempo, prolongado progresivamente la primera fijación bajo estricta vigilancia, hasta que quedó estipulada entre 35-40 horas, dependiendo del tamaño de la cabeza. Además se procedió a cortar sagitalmente las cabezas en dos partes iguales tras la primera desecación en acetona antes de efectuar el vacío, particularmente las cabezas de animales fetales más desarrollados(21G). (Figura 14).

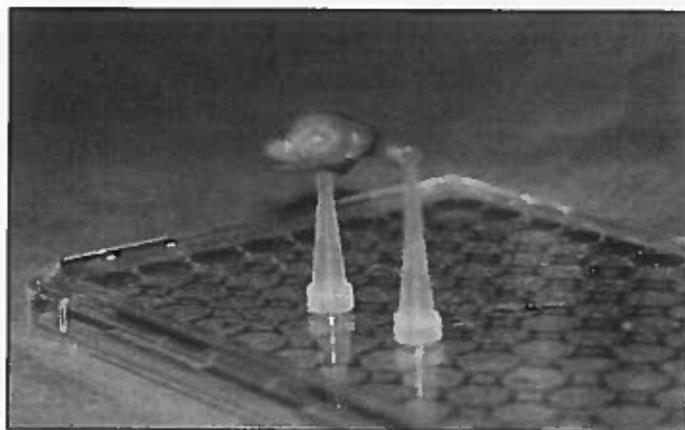


Fig. 14. Cabezas fijadas y preparadas para el procesamiento

B) Los globos oculares fueron obtenidos “in toto” mediante enucleación “ab externo” los días 19G, 21G, 5P, 10P, 25P, según técnica descrita con anterioridad (Pinazo-Durán y cols., 1993) limpiados cuidadosamente examinados y lavados en tampón para destinarlos a tres tipos de experimentos:

1) *En fresco* para observación de los mismos (Figura 15) y determinación de parámetros (peso y tamaño del globo ocular). Para ello se colocaron en una placa petri y se examinaron a través de un microscopio-lupa binocular de luz fría “Intralux 5000-Tecnos”.

Un calibrador incorporado al binocular permite efectuar la medición de los siguientes parámetros: diámetro vertical, diámetro horizontal, eje antero-posterior. También se procedió a pesar los ojos recién enucleados en una balanza Meztler (precisión 0.1g) como en experimentos previos (Pinazo-Durán y cols. 1992; 1993; 1994).

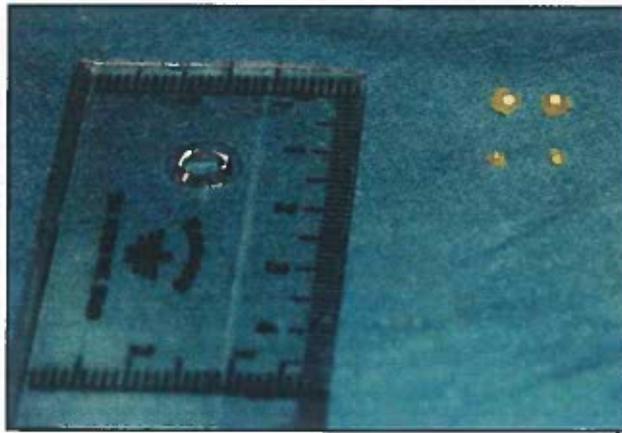


Fig. 15. Ojos de rata Wistar en G19 y G21. La regla es orientativa de su tamaño

2) Procesamiento de los globos oculares para microscopía óptica y electrónica de transmisión. El protocolo se basa en la fijación en una solución de glutaraldehído y formaldehído y posterior inclusión en una resina epoxi alifática, el EPON 812, que tiene un WPE de 145 a 160 y densidad de 1.22-1.15 g/ml, menor que la araldita y esto le permite mayor conservación y le confiere una mejor visualización combinando con el tetraóxido de osmio (Karnovsky, 1971). Los pasos son los que siguen:

1.- Enucleación del globo ocular, limpieza del mismo, disección cuidadosa de restos de inserciones musculares, conjuntiva, etc y sección del nervio óptico retrobulbar. Lavado en tampón cacodilato 0.1M pH 7.4 frío. (3 lavados de 5 minutos cada uno, conservando la muestra en nevera a 4 °C).

2.- Fijación del globo ocular completo, en una solución de glutaraldehído 2% (glutaraldehído ultrapure tem grade 25%) y formaldehído 3% (formaldehído ultrapure tem grade 16%) en tampón cacodilato 0.1M y pH 7.4 durante media hora.

Posteriormente seccion del globo ocular a nivel del ecuador mediante bisturí oftalmológico quirúrgico de 15° de angulación y separación del casquete posterior para seguir fijándolo en la misma solución durante 90 minutos más moviendo constantemente. La muestra se conservó en nevera a 4°C.

III.- MATERIAL Y METODOS

- 3.- Sumergir el globo ocular en tampón cacodilato 0.1M y pH 7.4 frío y efectuar 3 lavados de 10 minutos cada uno, conservando en nevera a 4°C. En el último lavado se puede quedar la muestra almacenada en tampón en la nevera hasta su utilización.
- 4.- Osmicación mediante introducción del casquete de globo ocular en una solución de tetraóxido de osmio (1.0% OsO₄) en agua bidestilada, conteniendo ferricianuro potásico (1% FeCnK) y mantenerla durante 60 minutos en nevera a 4°C y en completa oscuridad. A los 30 minutos, sin mostrarlos a la luz agitar levemente las muestras en la solución de tinción. Si se precisan piezas más pequeñas se puede proceder a la sección del casquete de globo ocular previo a la osmicación.
- 5.- Tres lavados en agua bidestilada de 5 minutos cada uno, conservando en nevera a 4°C.
- 6.- Sumergir en una solución de ácido tánico (0.15%) en tampón durante 1 minuto a temperatura ambiente.
- 7.- Lavado en agua bidestilada de 5 minutos a temperatura ambiente. Inmersión en una solución de acetato de uranilo 2.0% en agua bidestilada durante 120 minutos a temperatura ambiente y completa oscuridad.
- 8.- Tres lavados de 5 minutos cada uno a temperatura ambiente.
- 9.- Deshidratación en concentraciones crecientes de etanol (50%, 70%, 90%, 95%, 100%, 100% y 100%) 5 minutos cada una en nevera a 4°C.
- 10.- Inclusión en EPON 812 recientemente preparado, siguiendo el protocolo que se expone a continuación (B): Colocar los frascos que contienen la resina epoxi, el endurecedor, una probeta de cristal graduado y un frasco Erlenmeyer en estufa a 60°C durante 10 minutos. Verter la cantidad requerida de resina en la probeta precalentada y añadirle endurecedor. Pasar la mezcla al frasco Erlenmeyer. Agitar manualmente la mezcla unos minutos. No utilizar agitadores. Añadir la cantidad requerida para el experimento del acelerador EDMA. Agitar el frasco 2 minutos y el EPON ya se puede utilizar.
 - a) Solución de EPON/Etanol 1/2 durante 1 hora a temperatura ambiente
 - b) EPON/Etanol 1/1, una hora a temperatura ambiente.
 - c) EPON/ Etanol 2/1, una hora a temperatura ambiente.
 - d) EPON completo durante toda la noche en nevera a 4°C.
 - e) Al día siguiente incluir en EPON completo recién preparado durante 48 horas en

III.- MATERIAL Y METODOS

estufa a 60°C. Colocando las muestras convenientemente orientadas en recipientes horizontales y rellenando bien con la resina. Cuando polimerice la resina se pueden separar de los recipientes y los bloques obtenidos se clasifican y registran hasta su utilización.

11) Para el microscopio óptico se requieren secciones transversales seriadas semifinas (0.5-1 μm de espesor) que se cortan en el ultramicrotomo (Ultratome LKB) y que tras teñir con azul de toluidina y secar en plancha a 60°, se pueden observar y fotografiar en microscopio óptico OLIMPUS y cámara OLIMPUS con película KODACHROME 200 ASA. Los aumentos finales fueron x10, x20, x40 y x 60 y se efectuaron ampliaciones x3.

12) Para visualización en microscopio electrónico de transmisión, se precisaron secciones transversales seriadas ultrafinas 500 A, que se depositan en rejillas de cobre filmadas con formvar. En el caso de las secciones ultrafinas, las rejillas se tiñeron colocándolas con una pinza de relojero sobre gotas que contienen una solución de acetato de uranilo durante 20 minutos a temperatura ambiente y posteriormente durante 1 minuto se colocan sobre gotas con una solución de citrato de plomo, para examinarlas y fotografiarlas en microscopio electrónico de transmisión, fotografiando x 5.100, x9.000 y x11.000. Las fotografías fueron ampliadas aplicando un factor de ampliación x3.

3) Procesamiento para técnicas inmunológicas:

-Inmunohistoquímica (Ploem 1986; Yoshida y cols., 1992; Zimatkin y cols., 1992; Ramirez y cols., 1994; Pinazo-Durán y cols., 1995). Por medio del protocolo siguiente para inmunofluorescencia:

1.- Una vez enucleado el globo se lavó en tampón PBS y se sumergió en solución de sacarosa 30% en PBS durante 30 minutos en nevera a 4°C, introduciéndolo en un recipiente con freón y éste en un cubilete con nitrógeno líquido. Los ojos se almacenaron en congelador a -70°C hasta su utilización.

2.- Los globos oculares se prepararon para efectuar secciones en criostato (Cryostat Mycrom, Heidelberg, alemania), de 8 μm de espesor que se colocaron en portaobjetos con pocillos, alternándolos de forma que siempre quedase una línea de pocillos sin crio secciones entre dos líneas de pocillos con muestras. Seguidamente se secaron al aire utilizando un ventilador.

3.- Lavado en 3% BSA en PBS.

4.-Durante 5 minutos se les añadió Metanol absoluto a -20°C.

III.- MATERIAL Y METODOS

- 5.-Fijación en solución 3% formaldehído en PBS durante 10 minutos
- 6.- Solución de 50 mM glicina y 0.25% Tritón X-100 durante 10 minutos.
- 7.- Bloqueo con PBS + 3% BSA durante 10 minutos.
- 8.- Incubación con el primer anticuerpo durante 1- 2 horas.
- 9.- Lavado en PBS con 1.5mM ;gCl₂ y 1 mM de CaCl₂ durante 30 minutos
- 10.- Incubación con el segundo anticuerpo FITC en PBS con BSA y FCS (0.1% BSA y 1% FCS).
- 11.- Lavado en PBS durante 30 minutos
- 12.- Ultimo lavado con Agua bidestilada, 10 minutos
- 13.- Montar en PBS/Glicerol 1/1 o Vectashield.
- 14.- Observar al microscopio óptico con lente de epifluorescencia.

Los anticuerpos primarios (policlonales anti α 1: 1/50, α 2: 1/50, β 1: 1/50 y β 2: 1/50) fueron cedidos por los doctores Muñoz y Bernal del Instituto de Investigaciones Biomédicas de Madrid. El anticuerpo secundario se utilizó a dilución 1/10 (FITC goat antirabbit IgG).

La cantidad total de cabezas ($n_c= 64$) y ojos ($n_o= 256$) obtenidos y empleados en todos grupos GH, GC, GMMI y GC2, queda reflejada en el esquema siguiente:

MUESTRAS Y SU EDAD CRONOLOGICA

EDAD (en días)	CABEZAS	OJOS
13E	16	
15E	16	
18E	16	
19E		32
21E	16	80
5P		48
10P		48
25P		48

1.h. TECNICAS DE ANALISIS MORFOLOGICO Y MORFOMETRICO DE LA REGION CRANEOFACIAL Y ESBOZO OCULAR DE LA RATA WISTAR.

a.- De las cabezas.- Las primeras etapas tras la aparición del esbozo ocular entre los mamelones latero-nasal, mandibular y maxilar han sido estudiadas coincidiendo con otras descripciones previas efectuadas en roedores (Kaufman 1992; Cook y Sulik 1986), y siguiendo las bases generales para el estudio antropomórfico y antropométrico hemos analizado las electro-micrografías (inicialmente x40 y ampliadas x2) correspondientes a los días experimentales 13G, 15G, 18G y 21G, que se colocaron sobre una planilla milimetrada para proceder a la medición de los siguientes parámetros en tres determinaciones proximales de cada uno de ellos: eje oculo-nasal (desde la hendidura lagrimal del esbozo ocular hasta el punto más externo de la aleta nasal homolateral) y eje oculo-bucal (desde la hendidura lagrimal del esbozo ocular hasta el hocico, en el punto más externo del esbozo de la comisura bucal homolateral) (Fig. 16).

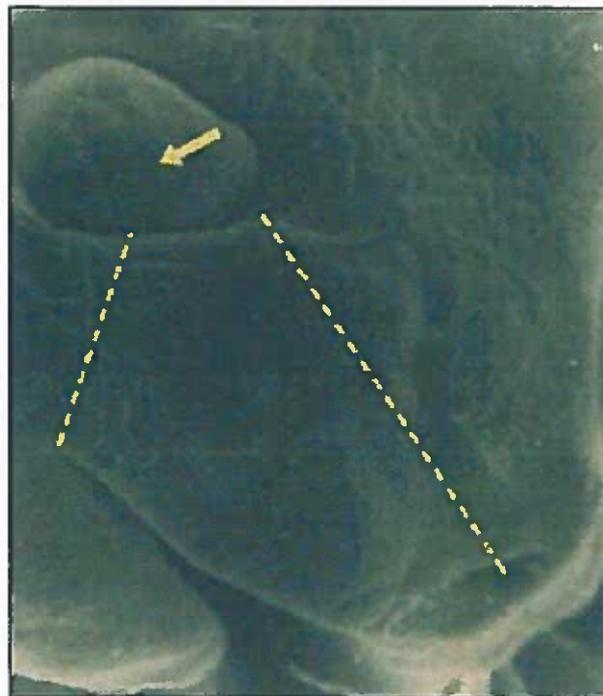
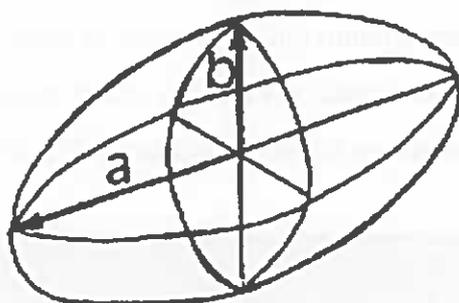


Fig. 16. Analisis morfológico de la región cráneo facial. Eje óculonasal: Línea de puntos más larga. Eje oculo-bucal: Línea de puntos más corta. La flecha señala el esbozo del globo ocular.

b.- **Del esbozo ocular.**-Por otra parte hemos determinado la medida de los diámetros horizontal y vertical del esbozo ocular lo que nos ha permitido hallar el área y volumen del esbozo ocular mediante técnicas morfométricas y estereológicas de aproximación a la fórmula del área de una elipse : $\pi \times a \times b$ (donde a: eje mayor / 2 y b: eje menor / 2). (De la Paz y cols., 1986; Pinazo-Durán y cols., 1997; Gamborino y cols., 1998, en revisión).

Hay que tener en cuenta que al tomar las medidas directamente sobre la propia fotografía ampliada se ha de efectuar la transposición dividiendo por el factor de ampliación que se haya aplicado (Figura 17) y expresar en unidades de área (mm^2). La aplicación de un programa BASIC para cálculos estereológicos desarrollado en nuestro laboratorio nos permite hallar el volumen del primordio ocular (mm^3).



$$\pi \times a \times b$$

$$(A \times fc)^2$$

Fig. 17. Esquema de las medidas del diámetro mayor y menor del globo ocular y fórmula aplicada para el cálculo del área en mm^2 . a: eje mayor; b: eje menor; A: aumentos finales en la fotografía respecto a la placa o negativo; fc: factor de conversión.

Finalmente hemos analizado el proceso de cierre palpebral espontáneo que ocurre en el período embrionario en la rata (Figura 18) y hemos comparado los resultados entre grupos.

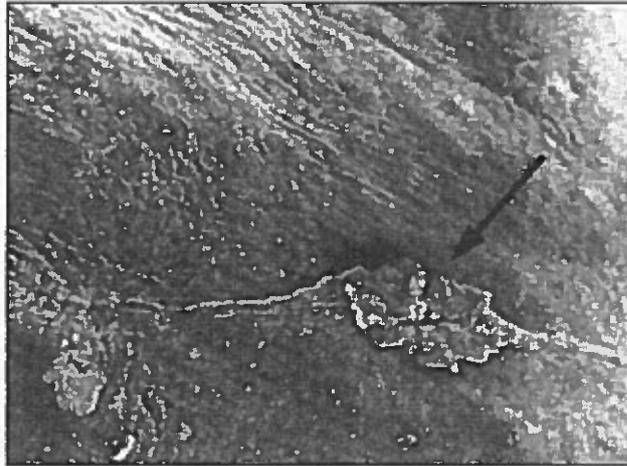


Fig. 18. Párpados fusionados en la línea media por delante del globo ocular.

c.-De los ojos.- El análisis morfométrico se llevó a cabo sobre micrografías obtenidas en el microscopio óptico de la sección transversal retroecuatorial del globo ocular, los días 21G, 5P, 10P y 25P. La ampliación de los negativos x 3 permitió efectuar la medición de las diferentes capas corio-retinianas (Fig. 19) y registrar los resultados. El examen a microscopía electrónica de transmisión permitió fotografiar las distintas capas retinianas. Nuestro estudio morfométrico y estereológico se ha centrado en las células ganglionares (Fig. 20). Hemos efectuado el recuento celular en relación a la unidad de área hallando la densidad ganglionar. También hemos aplicado el programa BASIC (De Paz y cols 1986; Pinazo-Durán y cols., 1993, 1997; Gamborino y cols., 1998) para estereología, hallando el volumen ganglionar. Finalmente estudiamos características del desarrollo postnatal del macizo facial y globo ocular, reseñando el momento en el que los globos oculares se abrían espontáneamente en los dos grupos de ratas.

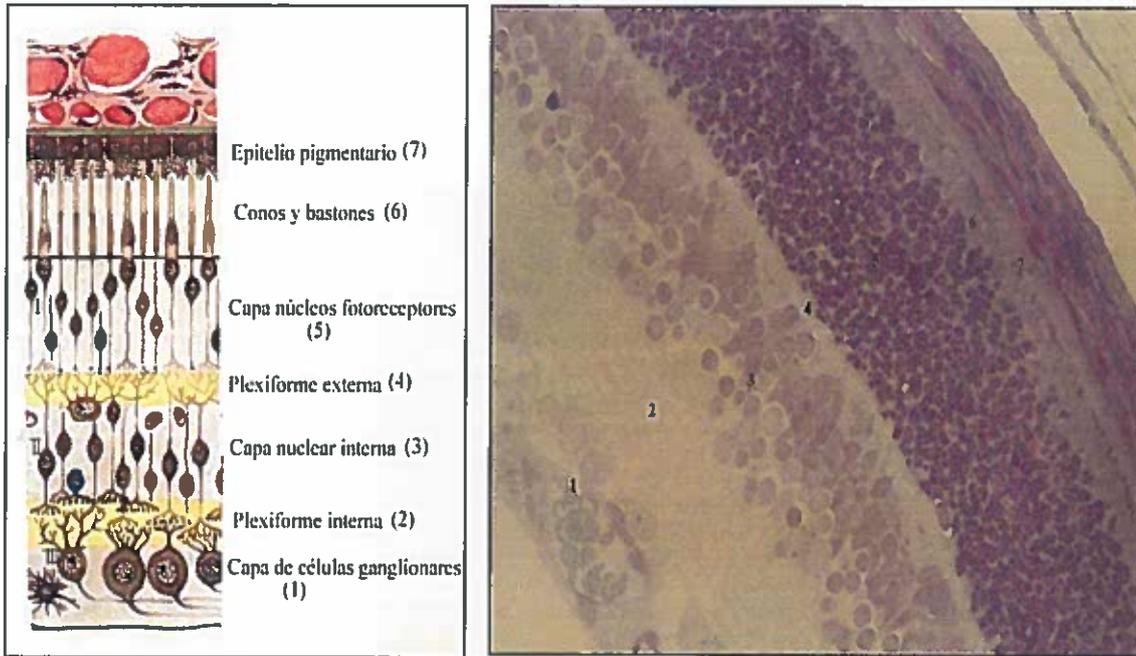


Fig. 19. Esquema de las capas retinianas y fotografía de un corte transversal de la retina observado mediante microscopio óptico. Los números indican las capas de la retina. Se hallaron las medidas del espesor de cada una de las capas y del total de la retina en cada uno de los días de experimentación para comparar entre grupos.

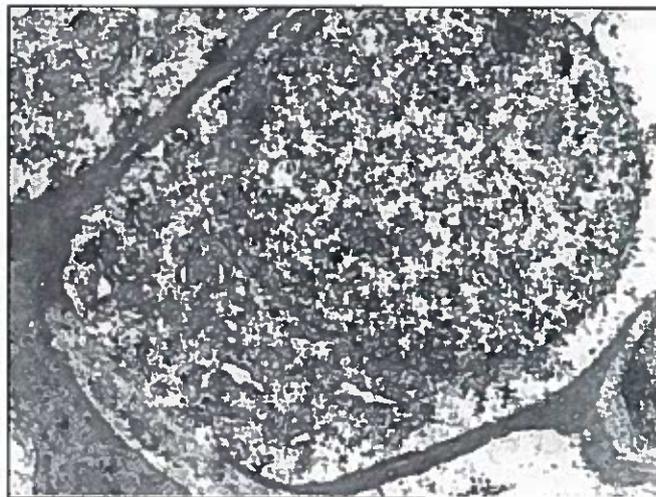


Figura 20. Célula ganglionar mediante examen a microscopía electrónica. Se efectuó el recuento celular por unidad de área y las medidas del área y volumen nuclear (programa BASIC).

1.i.-ESTUDIO ESTADISTICO

Los resultados obtenidos en cada uno de los experimentos se expresaron como: media \pm desviación típica de un número de animales escogidos al azar y cada uno de madre diferente. El examen a microscopía electrónica de transmisión permitió fotografiar las distintas capas retinianas. Nuestro estudio morfométrico y estereológico se ha centrado en las células ganglionares. Hemos efectuado el recuento celular en relación a la unidad de área hallando la densidad ganglionar. También hemos aplicado el programa BASIC (De la Paz y cols.,1986; Pinazo-Duran y cols., 1993, 1994, 1997) para estereología, hallando el volumen ganglionar y el estudio morfométrico de los núcleos y de los poros nucleares (Iborra y cols., 2000). Finalmente estudiamos características del desarrollo postnatal del macizo facial y globo ocular, reseñando el momento en el que los globos oculares se abrían espontáneamente en los dos grupos de ratas.

Se aplicó el test SPSS para analizar los datos y hallar la correlación entre dos características dadas. Para calcular el grado de significación entre los valores obtenidos de cada grupo los datos fueron procesados mediante el test “t” de Student y el test de Kolmogorov-Smirnov.

IV. RESULTADOS

RESULTADOS

1. ESTUDIO MACROSCÓPICO Y A MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO DE LAS CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE LA REGIÓN CRANEOFACIAL Y ESBOZO OCULAR DE LA RATA.

El examen macroscópico de las muestras “en fresco”, su observación en lupa binocular de luz fría, el análisis de las imágenes obtenidas mediante el microscopio electrónico de barrido y su procesamiento en el ordenador, así como el examen efectuado sobre las electro-micrografías, nos han permitido estudiar las características morfológicas de la región craneofacial a través de los estadios clave del desarrollo pre- y postnatal de la rata Wistar.

El macizo craneofacial del embrión varió constantemente de forma y tamaño, aumentando a lo largo del desarrollo. Una vez que el oftalmoencéfalo se evaginó del diencéfalo y emigró al exterior, la eminencia óptica apareció entre los mamelones frontal y latero-nasal y las eminencias maxilar y mandibular. En el embrión de 13 días (G13) del grupo de ratas control apreciamos el mamelón frontal, que se une al lateronasal y éste al maxilar. Entre ellos surgió la eminencia óptica, en cuya base apareció una pequeña prominencia que correspondía a las primeras etapas de la invaginación del cristalino, proceso resultante de la interacción entre la vesícula óptica y el ectodermo superficial.

Sin embargo observamos que la aparición de los mamelones en el GH se ajustó a una dinámica diferente, de manera que el mamelón nasal y el maxilar tendieron a reducir su diámetro vertical adoptando una forma achatada y el esbozo óptico parecía orientarse más horizontalmente. Además el primordio ocular presentó en los animales hipotiroideos una morfología similar pero un tamaño menor que en el grupo no tratado (GC), como podemos constatar al comparar las electro-micrografías de barrido en la figura 21.

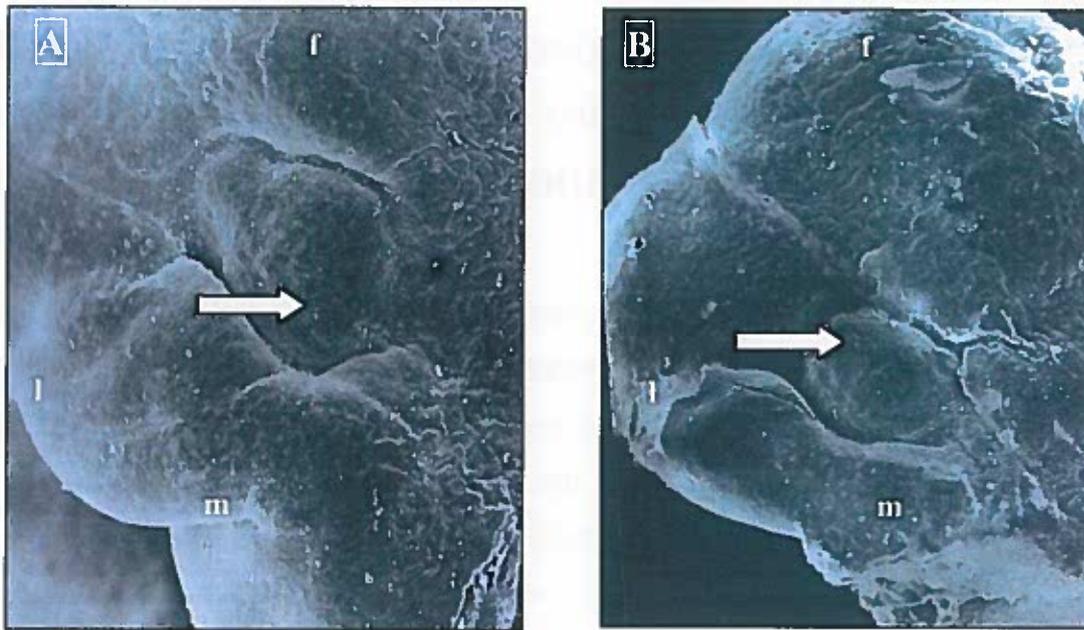


Fig. 21. Electro-micrografías de barrido de la región craneofacial del embrión de la rata Wistar en G13. Aumentos iniciales: 20x. A. GC vs B. GH. En ambos grupos el mamelón frontal queda señalado con la f y m indica el mamelón maxilar, mientras que l indica el mamelón latero-nasal. La flecha señala el primordio óptico. Se aprecia el tamaño inferior del primordio ocular en el GH.

Avanzando en el desarrollo, en el embrión de 15G observamos las características de la cara y del esbozo ocular, que a su vez contiene la vesícula cristaliniada y subyace a la primitiva córnea (ectodermo superficial). Los orificios nasales primitivos y el esbozo bucal fueron identificados, así como los límites entre la piel y el epitelio conjuntival (ambos derivados del ectodermo superficial) en la región correspondiente a los futuros párpados superior e inferior. Pudimos apreciar el esbozo de los cantos externo e interno y el primordio del fondo de saco conjuntival. Todas estas estructuras anexas al globo ocular presentan ya signos evidentes de su morfogénesis. Sin embargo, al comparar con el GH se objetivó un retraso en el desarrollo del macizo facial y esbozo ocular, principalmente basado en el establecimiento de la región fronto-orbitaria y latero-nasal, lo cual repercutió directamente en la aparición del esbozo ocular y en las características morfológicas de la hendidura palpebral, como demuestra la figura 22.

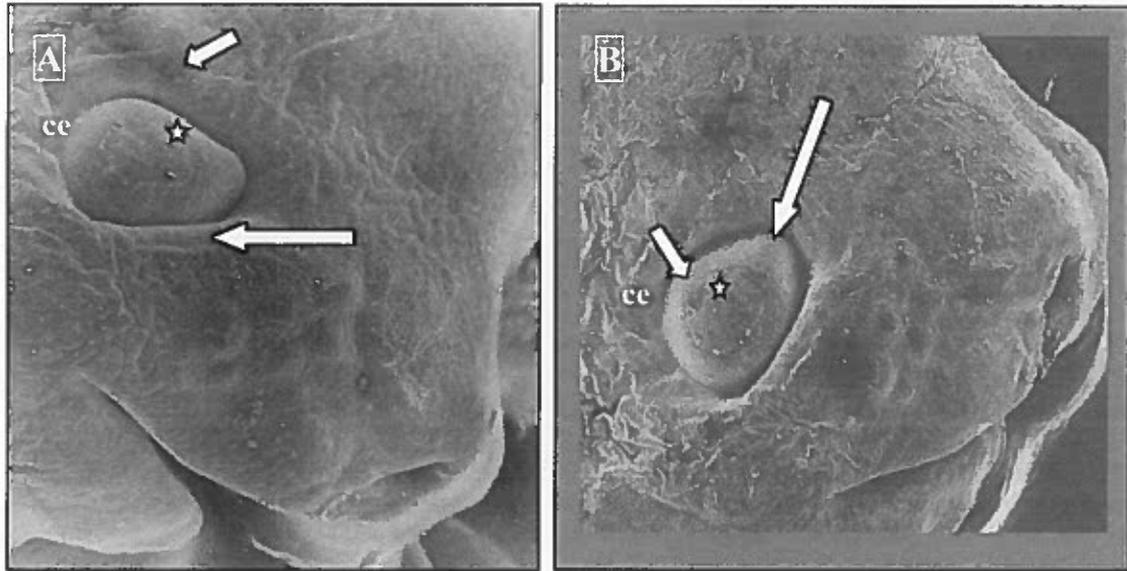


Fig. 22. Electro-micrografías de barrido de la región craneofacial del embrión de rata (G15). Aumentos iniciales: 20x. A. GC vs B.GH. En ambos grupos las flechas indican el primordio óptico y las flechas cortas los primitivos párpados superior e inferior. CE señala el canto externo de la hendidura palpebral. Los asteriscos señalan la primitiva córnea.

Como hemos visto anteriormente, las primeras características morfológicas del esbozo ocular y de los párpados pudieron apreciarse entre los días 13G y 15G. Sin embargo a partir de este periodo se produjo el mecanismo de cierre y fusión palpebral espontáneo que está descrito en la rata alrededor del día 16G. Hemos constatado el cierre de la hendidura palpebral que se produjo como consecuencia de la fusión de ambos párpados, superior e inferior, el día 18G, quedando en el medio un remanente de tejido en el lugar donde estaba concluyendo esta unión, exponente de una gran actividad celular. En contraste, cuando comprobamos los datos en el animal hipotiroideo comprobamos que todo este proceso está retrasado, de manera que el esbozo ocular era aún visible el día 18G, aunque ya comenzaba a disminuir el tamaño de la hendidura palpebral como consecuencia del crecimiento centripeto de ambos párpados superior e inferior para intentar unirse en la línea media (Figura 23).

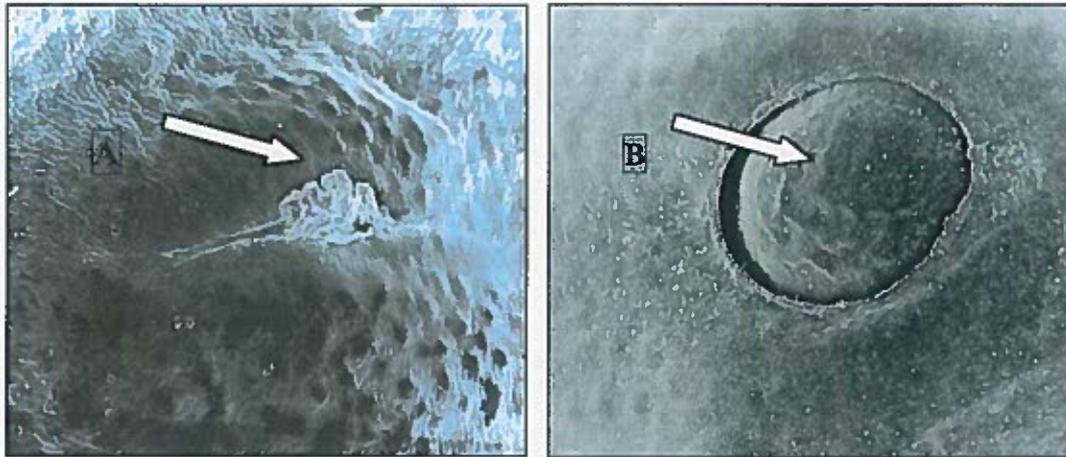


Fig. 23. Electro-micrografías de barrido de la región ocular de la rata (G18). Aumentos iniciales: 40x. Proceso embrionario de fusión palpebral. A. GC. La flecha indica el remanente de tejido con intensa actividad en la línea de fusión palpebral. B. GH. El primordio ocular (flecha) aún es visible porque el proceso de fusión palpebral está retrasado.

Este proceso de cierre-apertura palpebral ha sido analizado también en el animal postnatal, de forma que los fetos correspondientes a los días 19G y 21G tienen los párpados cerrados y asimismo los neonatos de 0P, 3P, 5P, 7P y 10P. El proceso de apertura palpebral es espontáneo y ocurrió al final de la segunda semana postnatal ($14,3 \pm 1.2$) en el GC, mientras que en el GH sufrió un retraso aproximado de dos a tres días (16.5 ± 0.9).

2. ESTUDIO DE LAS CARACTERÍSTICAS MORFOMÉTRICAS DEL DESARROLLO DE LA REGIÓN CRANEOFACIAL Y ESBOZO OCULAR DE LA RATA.

Hemos comparado el tamaño de la región cefálica de los animales del GC frente al GH durante todo el desarrollo prenatal. En ambos grupos fue aumentando con la evolución. Sin embargo, la apreciación de la diferencia de tamaño entre ambos grupos, (menor en el grupo tratado), ha sido concluyente para tres investigadores diferentes, habiendo efectuado el examen por separado. Las ratas tratadas con MMI a partir del día 9G y durante toda la gestación sufren un retraso en el desarrollo del macizo craneo-facial

IV.-RESULTADOS

que es más evidente durante la segunda y tercera semanas de desarrollo prenatal.



Fig. 24. Fotografía comparativa del desarrollo de la región craneal del embrión de rata Wistar en el grupo de animales no tratados (G 21 vs. G 13).

Hay que destacar que cualquier determinación de asimetría en la región craneal y región facial en el ser humano debe estar basada en análisis cuantitativos y éstos comparados con las medidas pareadas. Las posibles asimetrías que pudieran encontrarse entre la población sana no presentan defectos detectables a simple vista. De hecho, existen grandes diferencias entre las determinaciones antroposcópicas y antropométricas. Por ello creemos que en un modelo experimental y particularmente en nuestro caso, la comparación de los parámetros morfológicos entre los grupos de ratas debe también basarse en el estudio morfométrico.

Por lo tanto hemos determinado en el embrión de rata la distancia existente entre el esbozo del canal lagrimal (canto interno) y el esbozo nasal homolateral (aleta de la nariz) en ambos grupos, centrándonos en el estudio de los animales en los días G13, G15 y G18.

El resultado medio del eje oculo-nasal fue significativamente menor en el GH respecto al GC (Figura 25A). Asimismo, determinamos la distancia entre el esbozo del canal lagrimal y el esbozo bucal homolateral (comisura del hocico) en embriones de G13, G15 y G18 y el resultado medio de las medidas del eje oculo-bucal fue también significativamente inferior en el GH respecto del GC, como ocurrió con la determinación anterior (Figura 25B).

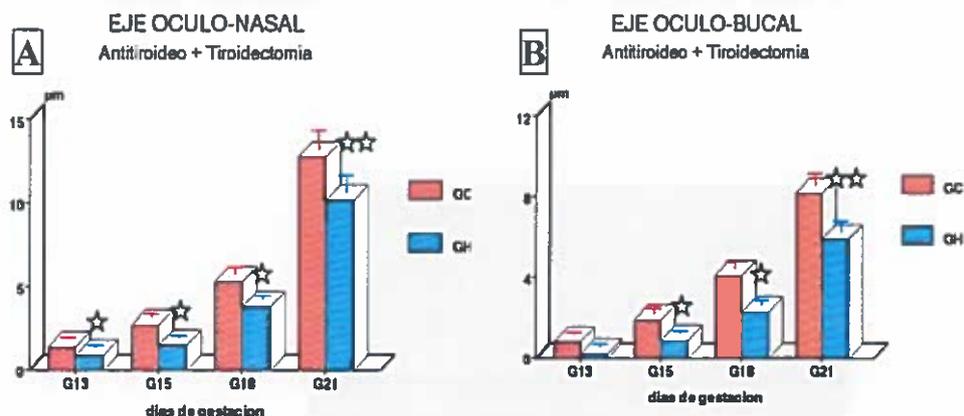


Fig. 25. Comparación de los parámetros morfométricos del desarrollo de la región facial de la rata Wistar. GC vs GH. Los datos son media \pm DS de 12 ratas. * y ** indican que los valores fueron estadísticamente significativos entre ambos grupos.

De forma similar, se efectuó el análisis morfométrico y estereológico de los parámetros del desarrollo del primordio óptico (esbozo ocular) y los resultados mostraron una diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos. El GH presentó valores inferiores al GC en los días 13G y 15G para el área (Figura 26A) y volumen medios (Figura 26B) del esbozo ocular.

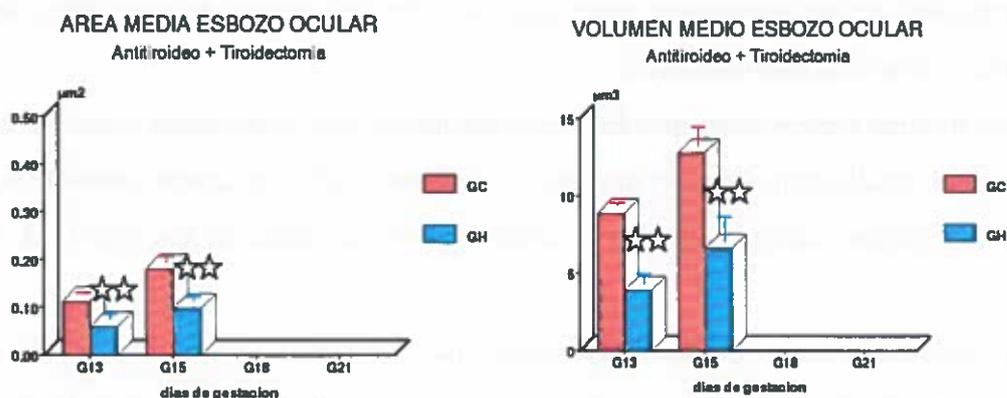


Fig. 26. Comparación de los parámetros del desarrollo del esbozo ocular de la rata Wistar. GC vs GH. Los datos son media \pm DS de 12 animales. * y ** expresan diferencias significativas entre los grupos.

Como se puede apreciar en la figura anterior, los días G18 y G21 no pudieron ser comparados como en el embrión más joven, puesto que en el GH los párpados aún no se

habían fusionado mientras que en el GC el primordio ocular ya estaba oculto por la fusión palpebral.

En el momento escogido para sacrificar al animal y enuclea los globos oculares se examinó la región craneofacial, globo ocular y anexos en los dos grupos. Los globos oculares se enuclearon y observaron bajo una lupa binocular de luz fría para buscar características morfológicas y diferencias significativas entre grupos. No se apreciaron malformaciones del globo ocular en ninguno de los dos grupos, salvo en algunos casos del GH (6% del total) en el que la extrema microftalmia aconsejó que se desecharan para este estudio.

Otro parámetro estudiado fue el peso ocular. Inmediatamente tras la enucleación los globos oculares se pesaron y el análisis estadístico de los datos reveló que los globos oculares aumentaron su peso a lo largo del desarrollo en ambos grupos, aunque en el GH los valores fueron significativamente inferiores al GC durante todo el estudio y no se observaron tendencias a alcanzar o igualar los valores de éstos, incluso cuando se considera que la rata comienza a abandonar el período de desarrollo, es decir el día 25P (Figura 27C).

En cuanto a la morfología, los ojos procedentes de ratas fetales eran más elípticos que los adultos y postnatalmente adquirieron una forma más esférica. Al final del período prenatal los globos oculares presentaron un tamaño antero-posterior menor que el vertical y éste a su vez menor que el horizontal. Conforme progresa el desarrollo este parámetro axial aumentó y se fue igualando al vertical, persistiendo el mayor tamaño para el eje horizontal durante las primeras semanas del período postnatal. También se apreció macroscópicamente la diferencia de tamaño entre el globo ocular procedente de ratas controles y de aquellos correspondientes al GH, lo cual fue evidente en todos los estadios del estudio.

Efectuamos además el estudio morfométrico del desarrollo pre- y postnatal del globo ocular, mediante la determinación de los valores de los diámetros medios axial (Figura 27B), vertical (Figura 27A) y horizontal (Figura 27D) de los ojos en ambos grupos bajo una lupa binocular de luz fría con calibrador. El análisis estadístico de los datos demostró una diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos, siendo mayores a los valores del GC a los del GH durante todo el desarrollo del globo ocular y no alcanzando en ningún momento los valores de los controles.

IV.-RESULTADOS

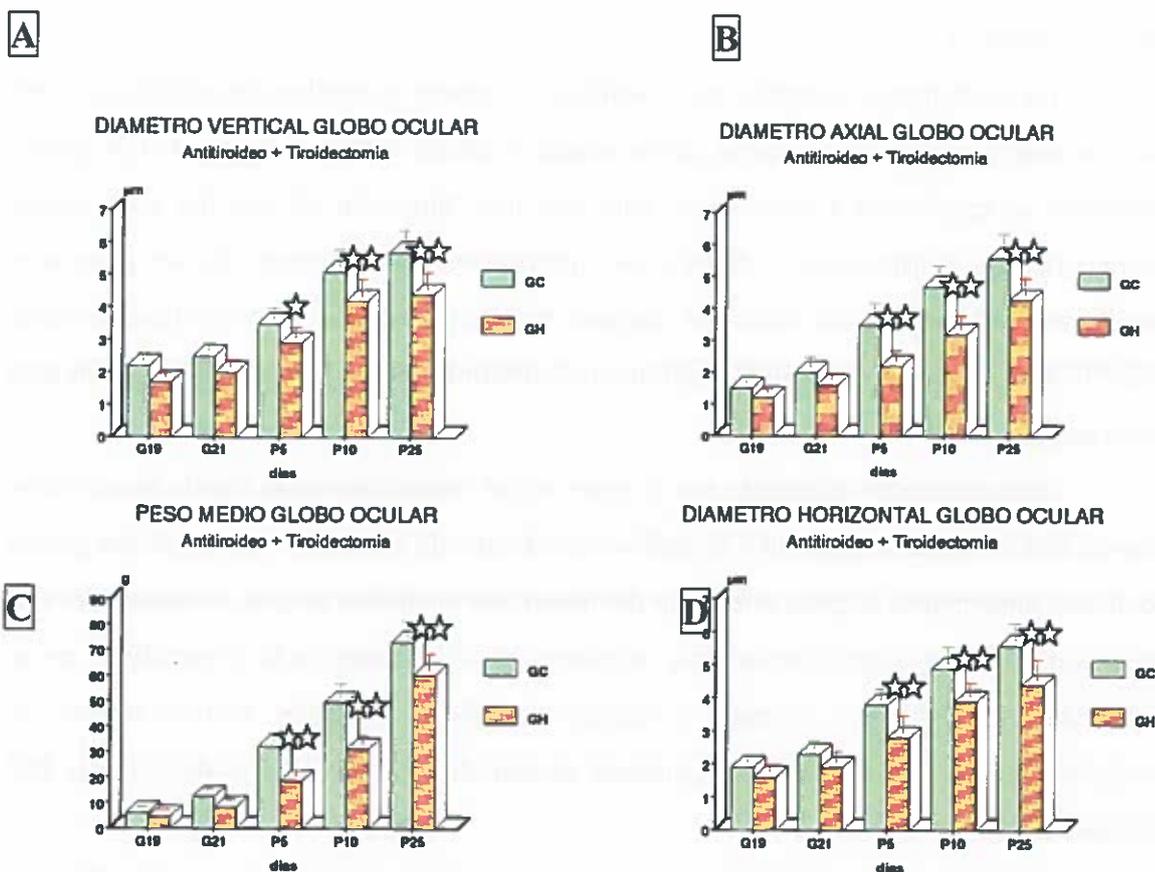


Figura 27. Parámetros comparativos del desarrollo pre- y postnatal del globo ocular de la rata Wistar. GC vs GH. Los datos son la media \pm DS de 16 ojos. * y ** indican diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos.

En cuanto al estudio de las características morfológicas del desarrollo del macizo craneo-facial y globo ocular en las ratas del grupo no tireoidectomizado (GMMI) que se utilizaron para analizar los posibles efectos teratogénicos del antitiroideo empleado en este estudio, los resultados indicaron que los animales siguieron un patrón de desarrollo similar a los del GH (tratados con MMI y tireoidectomizados) y no existían malformaciones graves de la región facial ni del esbozo ocular, aunque sí que se constató el retraso en el crecimiento de la región craneofacial así como del esbozo ocular siendo los valores para G13 y G15 muy similares a los encontrados para el GH.

3.- ESTUDIO A MICROSCOPIA ÓPTICA Y ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DEL DESARROLLO DE LA RETINA DE LA RATA.

El examen a microscopía óptica de las secciones seriadas transversales del globo ocular nos ha permitido analizar las características del desarrollo pre- y postnatal de la esclerótica, coroides y retina de la rata. Nuestro estudio se centra en el desarrollo de la retina.

En el animal adulto, la retina parecía comenzar más posteriormente, pero en los fetos y neonatos la retina comenzaba prácticamente a nivel del limbo esclero-corneal. Si disecamos cuidadosamente la retina "en fresco" con un pincel muy fino y la extendemos sobre un porta, podemos examinar la superficie de la misma. Así apreciamos un aumento claro del área media de la retina durante todo el desarrollo, aunque este aumento fue más notable entre los días 5P y 15P.

Por otra parte, el estudio morfológico de la sección transversal del globo ocular retroecuatorial efectuado en el feto "a término" y observado a microscopía óptica permite diferenciar las tres estructuras que lo componen, de fuera a dentro la esclerótica, coroides y retina, en contacto con la superficie vítrea. Sin embargo, las capas no presentan la morfología descrita en la literatura para la retina adulta. Además, la coriocapilar y la membrana de Bruch son también difícilmente distinguibles. El epitelio pigmentario es una lámina muy delgada y la capa de fotorreceptores está compuesta únicamente por los núcleos de éstos sin solución de continuidad con las capas nucleares internas. La capa plexiforme interna es muy delgada y su espesor similar al de la capa nuclear interna. En la zona más interna, hacia el vítreo, las células ganglionares son las más fácilmente identificables por su localización, tamaño y características morfológicas. Por lo tanto la principal característica de esta retina fetal es la presencia de una monocapa de retinoblastos que ocupa los dos tercios medios en los que la proliferación celular es el hecho más destacable y en la que pueden distinguirse los perfiles de las células ganglionares en la zona más interna.

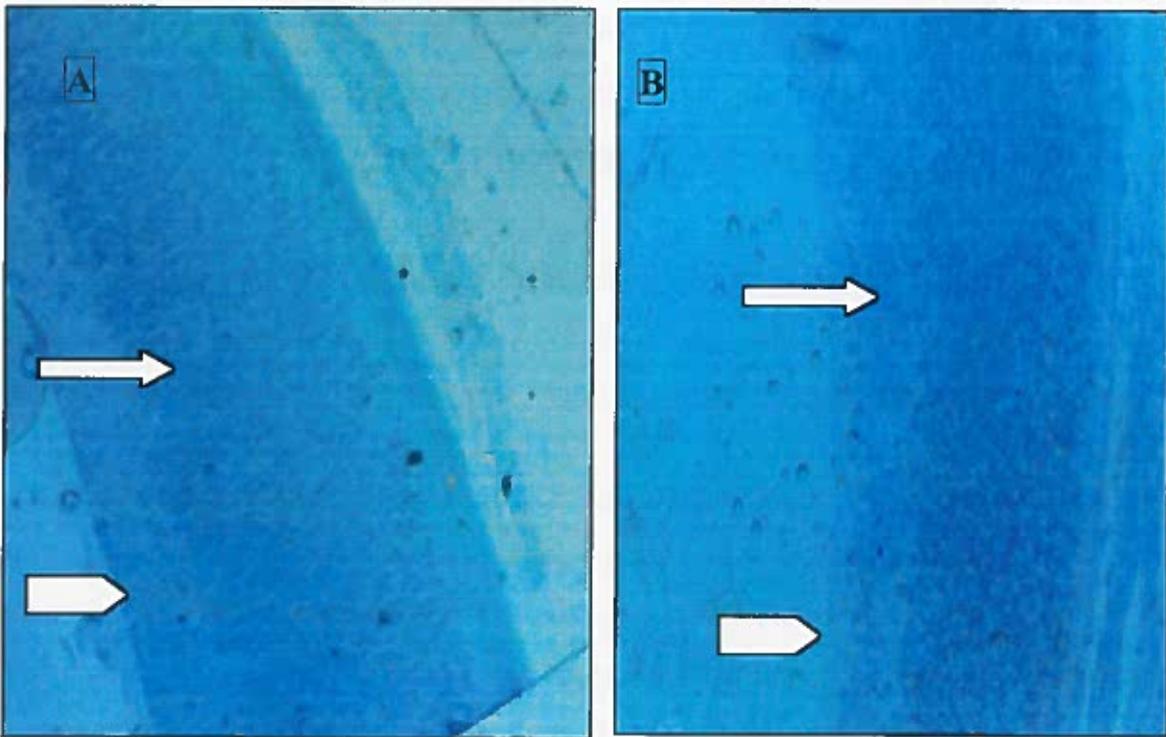


Fig. 28. Micrografías de la sección transversal del globo ocular de la rata en el feto "a término" (G21). Tinción azul de toluidina. Aumentos iniciales:20x. A) GC vs B) GH. Las flechas indican la monocapa de los retinoblastos en controles e hipotiroideos y la punta de flecha señala la superficie vítrea.

A partir del nacimiento el hecho más destacado es el establecimiento de las capas retinianas como consecuencia de la adquisición de la morfología definitiva de cada tipo celular y de las estructuras sinápticas retinianas.

De hecho, la capa de fotorreceptores (segmentos externos de los conos y bastones y la región de los núcleos) se desarrolla de una forma más contundente a partir del día 5P. En este periodo son también objetivables las membranas plexiforme externa e interna. Esta última aumenta su espesor durante el período postnatal. La capa nuclear interna muestra una disminución de su espesor desde el período prenatal hasta el día 21P y se distingue también la capa de células ganglionares, que experimenta un desarrollo precoz e intenso durante los períodos pre- y perinatal, tendiendo a estabilizar sus parámetros hacia el día 10P, siendo apreciable en este estadio la membrana limitante interna en contacto con la superficie vítrea.

IV.-RESULTADOS

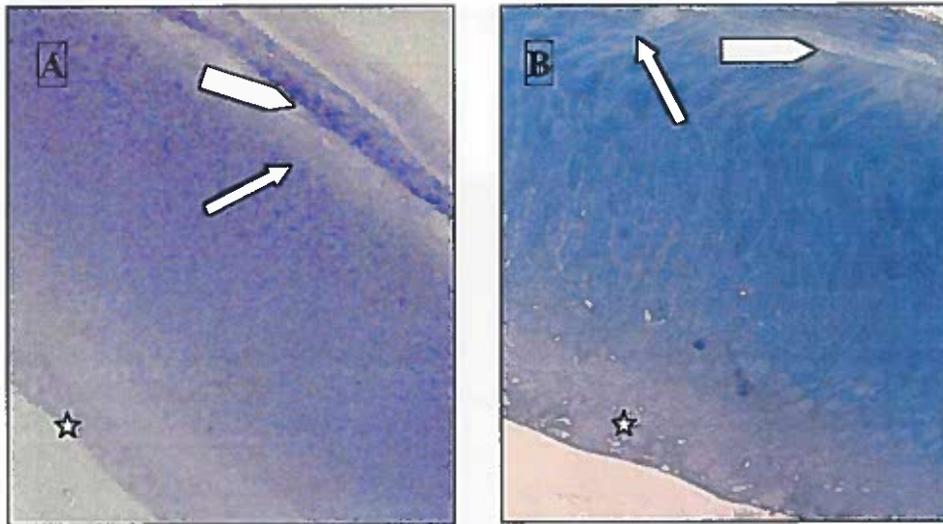


Fig. 29 Micrografías de la sección transversal del globo ocular de la rata. Período Postnatal (P5). Tinción azul de toluidina. Aumentos iniciales: 20x y 40x respect. A) GC vs B) GH. En ambos grupos las puntas de flecha señalan la esclerótica, mientras que las flechas indican los segmentos externos de los fotorreceptores y los asteriscos las células ganglionares y fibras del nervio óptico.

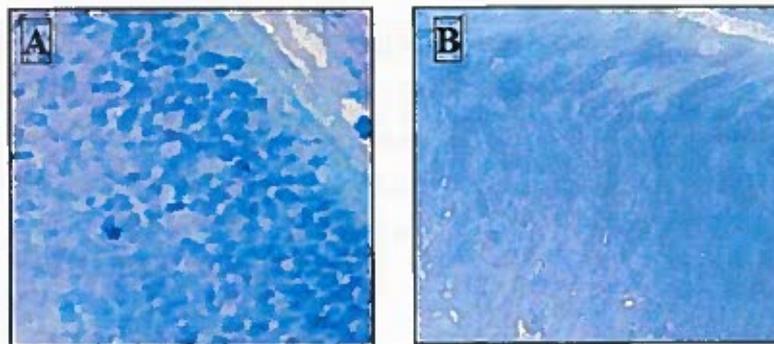


Fig. 30 Micrografías de la sección transversal de la retina de la rata. Detalle de la morfogénesis de los fotorreceptores en el estadio postnatal (P5). Tinción azul de toluidina. Aumentos iniciales: 40x y 60x respect. A) GC vs B) GH. Llama la atención el retraso en la organización espacial de los fotorreceptores. Los aumentos del GH son mayores para facilitar la observación de las características.

En los últimos estadios del desarrollo de la rata (P25), la morfología de la retina es similar a la de la retina adulta, identificándose todas las capas retinianas y los subsecuentes fenotipos celulares. Sin embargo, en las ratas hipotiroideas se apreciaron diferencias en el desarrollo morfológico en las diversas estructuras retinianas, particularmente en los fotorreceptores y en las capas de células ganglionares y fibras del

IV.-RESULTADOS

nervio óptico que sufrieron alteraciones temporo-espaciales durante la morfogénesis (figura 31).

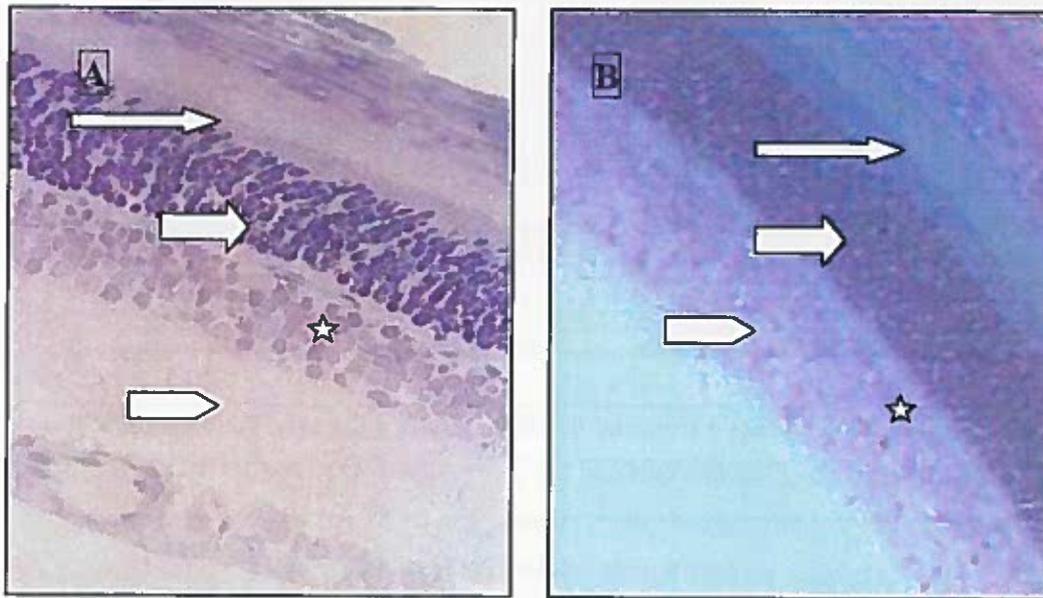


Fig. 31. Micrografías comparativas de la sección transversal de la retina de la rata. Tinción azul de toluidina. Aumentos iniciales 40x. Estadio P25. A. GC vs B. GH. Detalle de la morfología de los segmentos externos de fotorreceptores (flechas finas), capa nuclear externa (núcleos de los fotorreceptores) (flechas gruesas), membrana plexiforme externa (punta de flecha) y capa nuclear interna de células horizontales, bipolares y amacrinas (asterisco).

Igual que ocurrió con la comparación del tamaño de los ojos, al efectuar la extensión de la retina “in toto” sobre un porta objetivamos que el área de la retina en las ratas del GH era menor que el de la retina de los animales del grupo control y esta característica fue constante durante todos los días experimentales.

Mediante el examen de las secciones transversales ultrafinas de la retina durante el desarrollo y mediante microscopía electrónica de transmisión hemos valorado las características ultraestructurales de la capa de fotorreceptores y también la capa de células ganglionares y fibras del nervio óptico.

Los fotorreceptores son las células sensoriales que transforman la luz en energía eléctrica mediante procesos bioquímicos. La morfología de los segmentos externos de los fotorreceptores aparece como en empalizada (pudiendo apreciarse las terminaciones

IV.-RESULTADOS

en la cara anexa al epitelio pigmentario en forma de conos y bastones) y estando anclados en la parte opuesta (la que mira a la superficie vítrea) por la membrana limitante externa que delimita la zona de los núcleos que ocupan la capa nuclear externa (o granulosa externa).

Los segmentos externos son la zona especialmente fotosensible de cada célula y contienen bien el fotopigmento rodopsina (en los bastones) o iodopsina (en los conos). Estos fotopigmentos se encuentran en unas estructuras denominadas laminillas o discos. Los discos están formados por un par de membranas paralelas que se unen y se continúan una con otra en sus extremos y limitan una cavidad muy estrecha. Los discos se van formando continuamente y añadiendo al extremo vítreo del segmento externo de la célula fotorreceptora (conos o bastones) y los más antiguos se desplazan en dirección a la esclera hasta el epitelio pigmentario donde las células los fagocitan.

Los segmentos internos de los fotorreceptores contienen las organelas para la producción de energía y la síntesis de proteínas. Presentan un gran número de mitocondrias de tamaño considerable.

Por el contrario la capa nuclear externa engloba a numerosos núcleos de conos y bastones, de tamaño medio y coloración oscura que se caracterizan por la presencia de acúmulos de cromatina condensada. La membrana limitante externa está formada por la condensación de citoplasmas de las células de Müller y forma una red alrededor de los fotorreceptores manteniéndolos en posición.

La comparación de las electro-micrografías entre los grupos permitió analizar todos estos detalles ultraestructurales. Aparentemente el número de mitocondrias que se contabilizaron en los segmentos internos de conos y bastones fue ligeramente inferior en el GH frente al GC. Por otra parte, la frecuencia de presentación de mitocondrias dañadas fue similar en ambos grupos. Un hallazgo constante en el GH fue el retraso en la formación de los segmentos externos (Figura 32B), ya que los discos no presentaban la estructuración que observamos en el GC (Figura 32A) en el mismo día experimental. Esto corrobora nuestras descripciones efectuadas a microscopía óptica y también los resultados del análisis morfométrico de las capas retinianas en ambos grupos.

Sin embargo las células que presentaban organelas alteradas y núcleos en fase de degeneración fueron observadas de manera esporádica en ambos grupos y no existiendo diferencias entre ellos no se pudo relacionar este hallazgo con la disponibilidad de

hormona durante el desarrollo.

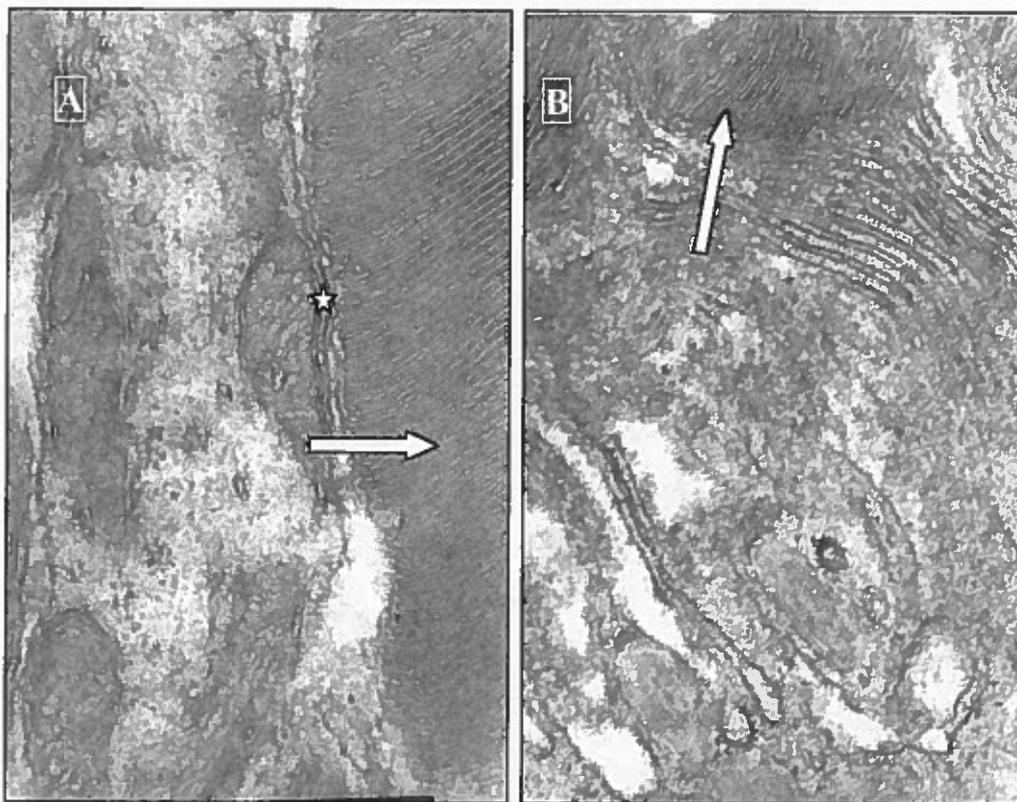


Fig. 32 Electro-micrografías de la sección transversal de la retina de la rata P5 Aumentos iniciales: 27500x A. GC versus B. GH. Sección de la capa de los segmentos externos de los fotorreceptores conteniendo los discos (flecha) y abundantes mitocondrias (asteriscos). En el GH se aprecia el retraso en la formación de los discos.

En cuanto a la capa de células ganglionares y fibras del nervio óptico, hemos apreciado en ambos grupos variaciones en el tamaño de las células ganglionares, que presentaban núcleos voluminosos, pálidos, redondeados con cromatina dispersa y un nucleolo visible. Las más abundantes fueron las de tamaño intermedio. Los citoplasmas son abundantes y contienen las organelas habituales (retículo endoplásmico rugoso, mitocondrias, neurofilamentos, aparato de Golgi yuxtanclear y ribosomas). Sus axones contienen neurotúbulos y múltiples mitocondrias dispuestas en filas, son amielínicos y no tienen extensiones colaterales y abandonan la retina a través de la papila óptica para formar los axones del nervio óptico. Las células y también las fibras del nervio óptico están rodeadas por las prolongaciones de las células de Müller y astrocitos. En esta capa también se encuentran astrocitos de núcleos irregulares y más oscuros y en cuyo

IV.-RESULTADOS

citoplasma y prolongaciones se pueden apreciar los filamentos intermedios del citoesqueleto y abundantes mitocondrias. El límite de la retina con la superficie vítrea lo constituye la membrana limitante interna, una verdadera membrana basal en la que se engarzan las prolongaciones de la glía de Müller.

La comparación de las electro-micrografías procedentes de ambos grupos nos ha permitido identificar los elementos celulares asumiendo una ligera reducción en el número de células ganglionares así como el menor tamaño de sus núcleos en las que correspondían al GH. (Figura 33B). No existieron diferencias entre el grupo hipotiroideo y el de animales no tratados en cuanto a la alteración ultraestructural de las organelas citoplasmáticas ni tampoco anomalías relevantes en el núcleo celular.

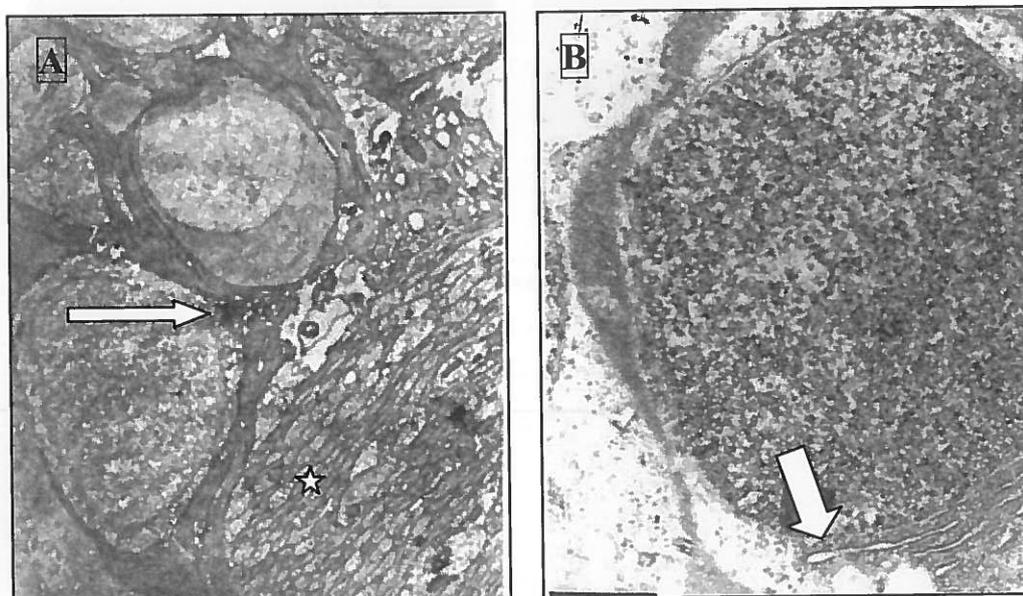


Fig. 33. Electro-micrografías de la sección transversal de la retina de la rata Estadío P5. A. GC (aumentos iniciales: 3.800 x) . Células ganglionares recubiertas por los procesos gliales (flecha en A) de dos tamaños diferentes. Las fibras del nervio óptico (asterisco) aparecen en la zona inferior derecha de la figura. B. GH (aumentos iniciales 5.400x). Se observa una célula ganglionar de núcleo voluminoso en la cual los perfiles citoplasmáticos de cisternas de retículo endoplásmico están ligeramente dilatadas (flecha).

El examen detallado y minucioso de la membrana nuclear de las células ganglionares nos permitió identificar los perfiles de las estructuras conocidas como poros nucleares (Figura 34). Estos aparecen como soluciones de continuidad de la membrana nuclear de las células ganglionares, con una periodicidad constante en todo el perímetro del núcleo.

IV.-RESULTADOS

Efectuando electro-micrografías a mayor aumento para salvar las dificultades de resolución de estas ultraestructuras, pudimos cuantificar el número de poros nucleares por unidad lineal de membrana (número de poros/ μm) así como hallar la medida correspondiente a la longitud de la solución de continuidad del poro en la membrana nuclear (luz del poro). Estos datos sugieren que hay una disminución real del número de poros en el GH frente al GC, aunque este parámetro referido a la unidad de membrana no era estadísticamente significativo (P15: 2.5 ± 0.3 vs 2.2 ± 0.3) poros/ μm , aunque sí que fue significativa la disminución de su tamaño en el GH respecto del GC (P15: 89.8 ± 4 vs 80.1 ± 4 / μm ; $p < 0.01$).

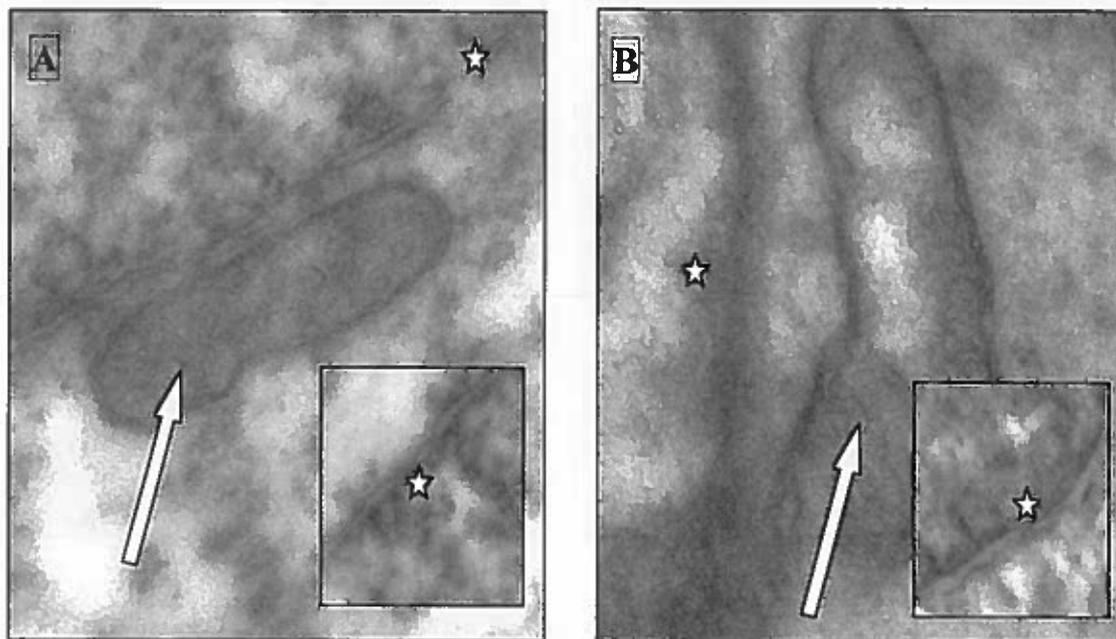


Fig. 34 Electro-micrografía de la sección transversal de la retina P5. A. GC (aumentos iniciales: 12500 x). Núcleo de la célula ganglionar y perfil de una mitocondria (flecha). Se aprecia la membrana nuclear en la cual se visualiza un poro (asterisco, 16000x en la figura superpuesta). B.- GH (aumentos iniciales: 12500x). Figura comparativa de la membrana nuclear y organelas citoplasmáticas indicando con la flecha una mitocondria (16000x detalle de un poro nuclear en la figura superpuesta).

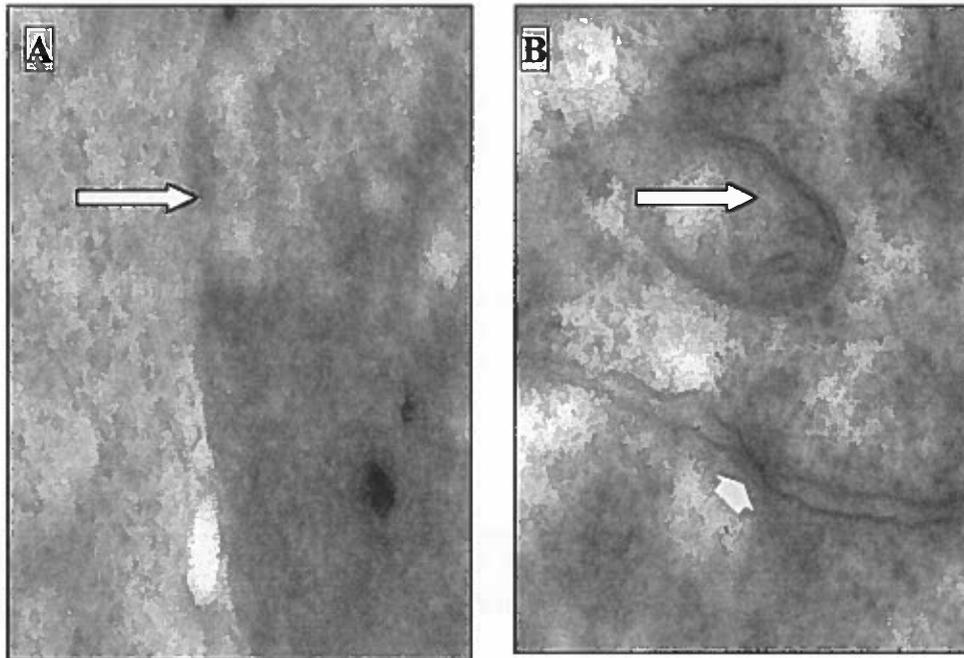


Fig. 35 Electro-micrografías de la sección transversal de la retina P15. A. GC (aumentos iniciales: 16000x). Núcleo de la célula ganglionar, en la cual se visualiza un poro (flecha) de la membrana nuclear. B. GH (aumentos iniciales: 16000x). Figura comparativa de la membrana nuclear y organelas citoplasmáticas. La flecha señala una mitocondria y la punta de flecha el poro nuclear bien visible.

4.- ESTUDIO DE LAS CARACTERÍSTICAS MORFOMÉTRICAS DEL DESARROLLO DE LA RETINA DE LA RATA.

Una vez efectuado el examen microscópico y analizadas las características ultraestructurales de la retina se procedió al estudio de los parámetros del desarrollo de la sección transversal del globo ocular de la rata. Este análisis fue llevado a cabo sobre las micrografías clasificadas según el grupo y día experimental y nos reveló el aumento del espesor total de la sección transversal del ojo durante el estadio prenatal y las dos primeras semanas tras el nacimiento. A partir de aquí parece existir una tendencia a la estabilización de los valores. Sin embargo, apreciamos una disminución significativa del espesor total de la sección transversal del globo ocular (Figura 36A) y también del espesor de la retina en las ratas del GH frente a las del GC (Figura 36B).

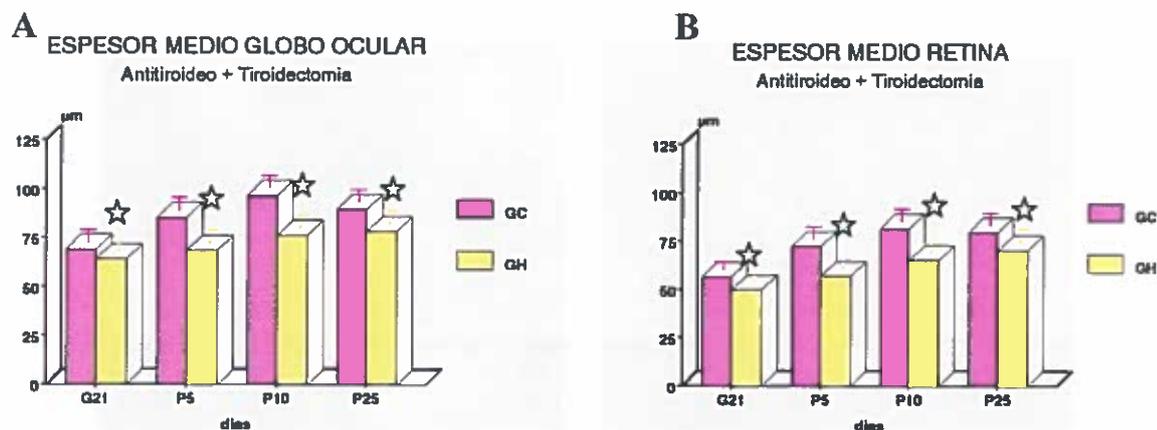


Fig. 36. Parámetros comparativos del desarrollo de la sección transversal del globo ocular de la rata. A. GC vs B. GH. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas entre grupos ($p < 0.01$).

Estos resultados fueron similares a lo largo de todos los días experimentales, tanto en la fase prenatal como en el nacimiento y al final del desarrollo de la rata.

El análisis de todas y cada una de las capas retinianas demostró que aquellas que presentaban mayor variación durante el desarrollo eran los fotorreceptores, nuclear interna y células ganglionares.

Así parece que la tendencia de la retina es disminuir su espesor conforme avanza en la maduración, ya que el espesor absoluto y relativo de las capas nucleares disminuye, mientras que aumentan las plexiformes.

Todos estos datos morfométricos fueron analizados en las micrografías clasificando las capas retinianas correspondientes: epitelio pigmentario, fotorreceptores, membranas plexiformes externa e interna, capas nucleares externa e interna, y pueden verse en los diagramas de la figura 37 y en la figura 38, correspondiente esta última al estudio de las células ganglionares.

IV.-RESULTADOS

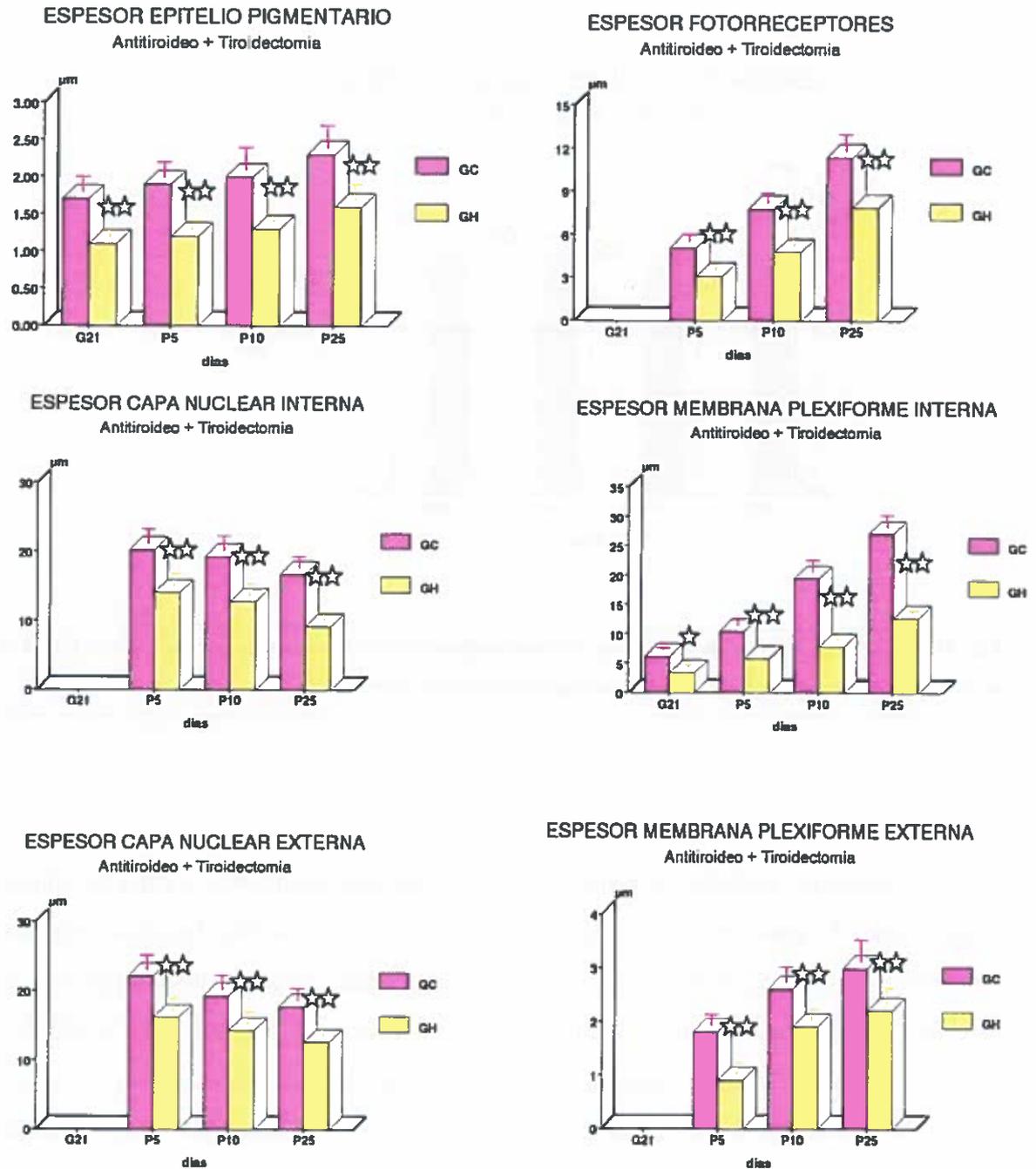


Fig. 37. Parámetros comparativos del desarrollo de la retina de la rata. GC vs GH. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos ($p < 0.01$ y $p < 0.001$, respectivamente).

ESPESOR CELULAS GANGLIONARES

Antitiroideo + Tiroidectomia

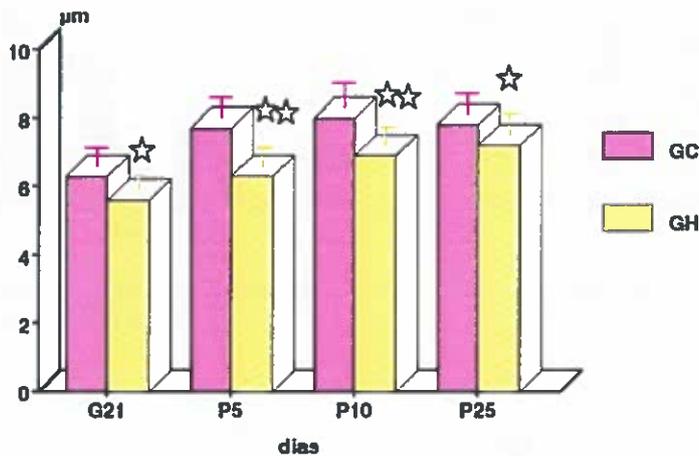


Fig. 38. Medida del espesor de la capa de células ganglionares de la retina de la rata. GC vs GH. Un asterisco indica un valor de $p < 0.02$ y dos asteriscos indican un valor de $p < 0.001$.

Finalmente, también efectuamos el análisis estereológico sobre la capa de células ganglionares. El parámetro que determina de forma más específica las características morfométricas del desarrollo celular es el volumen nuclear. Nosotros hemos aplicado la densidad de volumen (medida en μm^3) que es si cabe más singular. Los resultados demuestran que las células ganglionares, que son las primeras en abandonar el ciclo celular para comenzar a diferenciarse en etapas tempranas del desarrollo, estabilizan su densidad de volumen nuclear hacia el día 10P. Sin embargo, en el GH los valores de este parámetro fueron significativamente inferiores a los de las ratas controles en todos los días estudiados y no alcanzaron los valores mostrados por las células de los animales no tratados en ningún punto de experimentación, incluso en etapas más avanzadas de la morfogénesis, como en P25 (pudiendo apreciar estos datos en la tabla 7).

Tabla 7. Densidad de volumen nuclear de las células ganglionares retinianas

Células ganglionares μm^3

	GC	GH
P ₅	$0,5 \pm 0,01 \times 10^{-3} **$	$0,4 \pm 0,01 \times 10^{-3} **$
P ₁₀	$0,8 \pm 0,02 \times 10^{-3} **$	$0,7 \pm 0,02 \times 10^{-3} **$
P ₂₅	$0,6 \pm 0,04 \times 10^{-3} **$	$0,5 \pm 0,01 \times 10^{-3} **$

5. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN Y DISTRIBUCIÓN DEL RHT EN LA RETINA DE LA RATA CONTROL (GRUPO NO TRATADO) DURANTE EL DESARROLLO.

Conociendo que los efectos fisiológicos de las HT se inician por la unión a receptores nucleares específicos que unen T_3 con alta afinidad y con una capacidad limitada y sabiendo que los niveles del receptor nuclear para T_3 en los tejidos están en relación directa con los efectos que la HT ejerce sobre ellos (y teniendo en cuenta que las HT ejercen algunas acciones no nucleares, sobre todo en relación con estructuras mitocondriales), se acepta que la mayor parte de las acciones dependen de la presencia de receptores nucleares específicos en los órganos diana.

Al estar codificados por dos genes distintos (α y β) localizados en los cromosomas 17 y 3 respectivamente, existen varias isoformas del receptor. En este trabajo analizamos principalmente la expresión y localización en la retina de la rata de las familias α y β . Utilizamos anticuerpos específicos frente a esas isoformas.

El gen α (*c-erbA α*) va a procesar las isoformas α_1 , α_2 y α_3 de las cuales la única con capacidad para unir HT es la isoforma α_1 . Por otra parte, el gen β (*c-erbA β*) va a dar lugar a las isoformas β_1 y β_2 .

IV.-RESULTADOS

Mediante inmunofluorescencia hemos detectado en la retina de rata Wistar del GC, la presencia del RHT α_1 el día 21E. El patrón de expresión fue uniforme y comprendía todas las capas retinianas.

La reacción mostrada por esta isoforma del RHT α_1 fue gradualmente más intensa desde el día 5P (figura 39) hacia los días 15P y 25P en los que presentó una tendencia a la estabilización.

Por el contrario, las isoformas β_1 y β_2 fueron prácticamente indetectables en el período perinatal, aunque la inmunofluorescencia fue ya positiva el día 5P (figura 40), aumentando su expresión en etapas posteriores. Pese a que la fluorescencia fue mayor en las capas más internas (plexiforme y ganglionares), los fotorreceptores y células de la capa nuclear interna (amacrinas, horizontales y bipolares) también presentaron inmunorreacción positiva para estas isoformas.

En las figuras 41 y 42 se puede analizar con detalle el patrón de expresión de las isoformas α_1 y β_1 en un estadio clave del desarrollo de la retina de la rata, esto es en P10. Vemos el patrón nuclear y también perinuclear (posiblemente mitocondrial).

Finalmente hemos constatado que en la retina madura, concretamente en P25, las isoformas predominantes eran las α y β , aunque estabilizándose la expresión de las α (figuras 43 y 44).

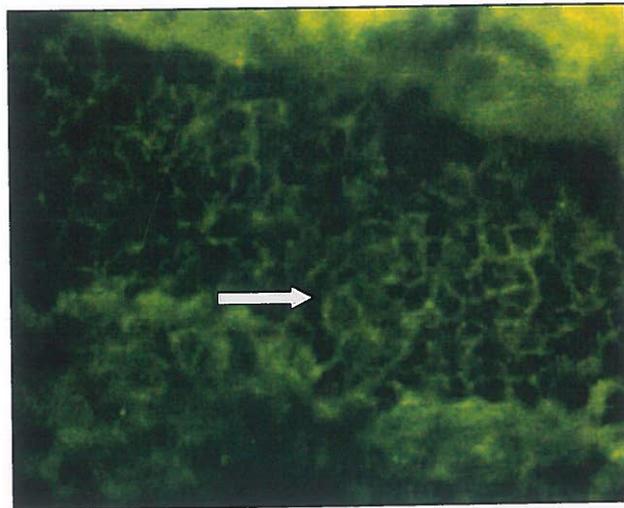


Fig. 39. Inmunofotografía de la expresión y localización del RHT en la capa nuclear externa de la retina de la rata (núcleos de los fotorreceptores). Período postnatal (P5). Aumentos iniciales 60x. 1^{er} anticuerpo anti RHT α 1 y 2^o anticuerpo FITC anti mouse-IgG. La fluorescencia era fuertemente positiva para los núcleos y perikaria (flecha).

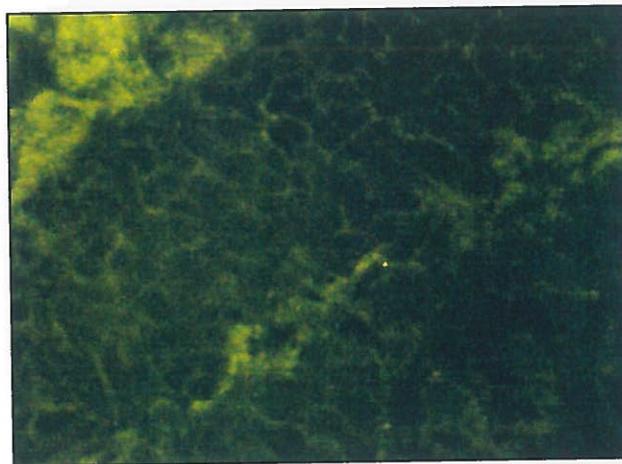


Fig. 40 Inmunofotografía de la expresión y localización del RHT en la capa nuclear externa de la retina de la rata. P5. Aumentos iniciales:60x 1^{er} anticuerpo anti RHT β 1 y 2^o anticuerpo FITC anti mouse-IgG. Período postnatal (P5). La fluorescencia fue positiva, aunque ligeramente menor que la de la isoforma α .

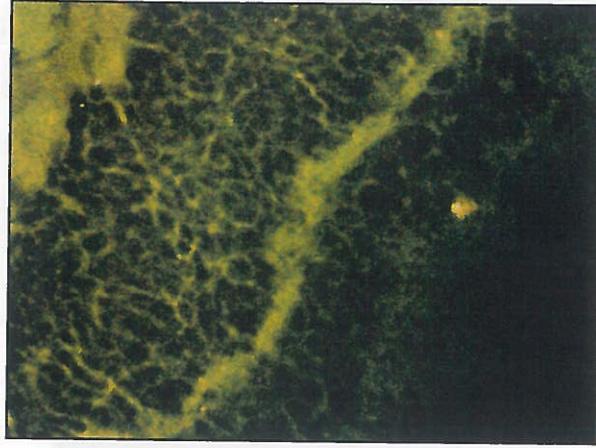


Fig. 41 Inmunofotografía de la expresión y localización del RHT en las capas nucleares de la retina.
Aumentos iniciales: 60x Periodo Postnatal (P10). 1^{er} anticuerpo anti RHT α 1 y 2^o anticuerpo FITC anti mouse-IgG. La fluorescencia fue mayor en los núcleos y perikaria de los fotorreceptores y en la membrana plexiforme externa que en las neuronas de la capa nuclear interna (horizontales, bipolares y amacrinas) y ligeramente más intensa que en estadios perinatales.

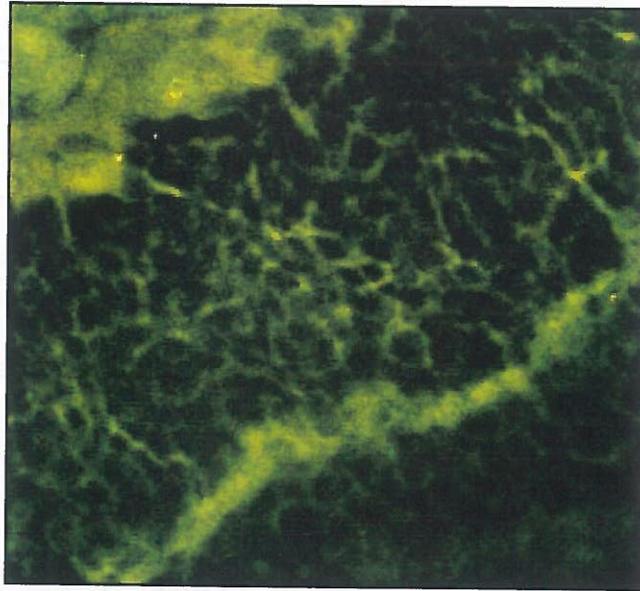


Fig. 42 Inmunofotografía de la expresión y localización del RHT en las capas nucleares de la retina.
Periodo postnatal (P10). Aumentos iniciales: 60x. 1^{er} anticuerpo anti RHT β 1 y 2^o anticuerpo FITC anti mouse-IgG. La fluorescencia fue intensa en la capa nuclear externa y membrana plexiforme externa y superior a la obtenida en estadios perinatales.



Fig. 43 Inmunofotografía de la expresión y localización del RHT en la retina de la rata. Período postnatal (P25). Aumentos finales 40x. 1^{er} anticuerpo anti RHT β 1 y 2^o anticuerpo FITC anti mouse-IgG. 40x.. La fluorescencia fue intensa en todas las capas pero destacó más en las internas.

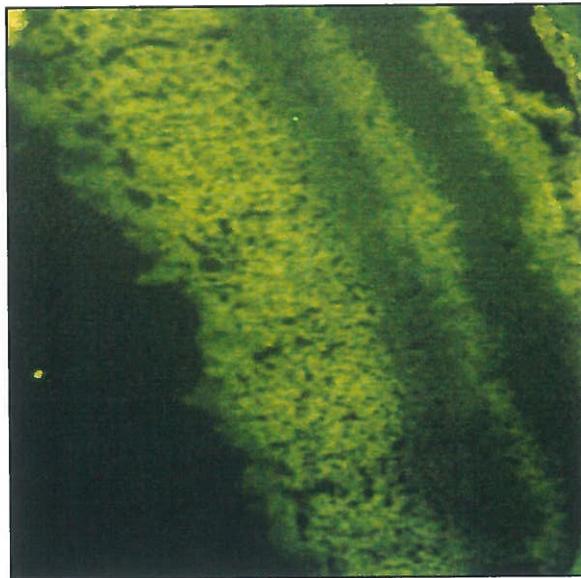


Fig. 44 Inmunofotografía de la expresión y localización del RHT en la retina de la rata. Período postnatal (P25) . Aumentos iniciales: 40x. 1^{er} anticuerpo anti RHT α 1 y 2^o anticuerpo FITC anti mouse-IgG. 40x. La fluorescencia fue positiva para toda la retina, aunque las capas nucleares presentaron menos inmunoreacción que en estadios anteriores.

V. APENDICE

APENDICE

Aunque la relación entre las HT con la morfogénesis y la regulación del desarrollo ha resurgido en los últimos años y ha sido objeto de estudio para diversos grupos de investigación relacionados con la ontogénesis del sistema nervioso y los órganos neurosensoriales (Balasz 1976; Mitsuhashi y cols., 1988; Lee y Mahdavi 1993; Matsuo 1993; Morreale de Escobar y cols., 1993; Barres y cols., 1994a; Berko-Flint y cols. 1994; Brent 1994; Iglesias y cols., 1994; Slack 1994; Shawlot y Behringer 1995; Bernal y Guadaño Ferraz 1998; Muñoz y Bernal 1997), el interés por las funciones que las HT pueden desempeñar en la morfogénesis del sistema visual y en el establecimiento de la visión no ha obtenido la misma respuesta en la literatura, especialmente cuando la búsqueda se concreta en publicaciones clínicas o epidemiológicas. En la última década, solo algunos trabajos experimentales han analizado variaciones en el desarrollo del globo ocular y los tejidos anexos y del nervio óptico en relación a la biodisponibilidad de HT (Stein y cols., 1991; Leung y cols., 1992; Matsuo 1993; Mavilio 1993; Barres y cols., 1994 a, Quiring y cols., 1995) y entre ellos las descripciones de nuestro propio grupo (Pinazo-Durán y cols., 1997; Gamborino y cols., 1998, Pinazo-Durán y cols., 1999a y b; Sevilla y cols., 2000; Gamborino y cols., en revisión). En lo que respecta a la oftalmología clínica, hay publicaciones que relacionan la disfunción tiroidea con la presencia de patología ocular como el glaucoma (Smith y cols., 1992), la uveitis (Nakao y cols., 1994) y el queratocono (Lang y Naumann, 1991), pero no hay estudios que hayan analizado el estado refractivo y la homeostasis tiroidea. Por todo ello nos planteamos efectuar dos estudios clínicos oftalmológicos en relación a la función tiroidea y la visión.

- En primer lugar pretendemos analizar el estado refractivo, la visión y la función tiroidea en el adulto.
- En segundo lugar nos planteamos efectuar un estudio oftalmológico en niños diagnosticados de HPCN, en relación al desarrollo del órgano de la visión y estudiar su función visual.

1.- ESTUDIO DE LA REFRACCIÓN EN RELACION A LA FUNCION TIROIDEA

Puesto que la formación y posterior evolución de las ametropías (defectos de refracción del globo ocular: miopía, hipermetropía, astigmatismo y presbicia) ha sido estudiada en función de muy diversos factores entre ellos genéticos, ambientales (Smith y cols., 1980, Wallman y cols., 1978), endocrinos, y la diversidad genotípica y fenotípica de dichas ametropías ha favorecido (hasta el momento) el desconocimiento de las bases celulares y moleculares que intervienen en la génesis y evolución de los defectos de refracción, nosotros nos preguntamos si la disfunción tiroidea del adulto podría tener alguna relación con la presentación de las ametropías, principalmente en la miopía y en la hipermetropía, obviando el astigmatismo y la presbicia para nuestros propósitos.

Diseñamos un trabajo clínico prospectivo en 165 pacientes de ambos sexos y edades comprendidas entre los 15 y los 75 años que acudieron a las consultas de oftalmología para un control ocasional, sin padecer enfermedades sistémicas ni defectos severos de refracción y que accedieron a ser incluidos en el estudio (Bosch y cols., 1998). Tras la anamnesis inicial y la valoración de los criterios de inclusión/exclusión, 142 pacientes (32% varones vs 68% hembras) fueron seguidos durante los años 1994 y 1995 y clasificados en:

- 1) 97 pacientes amétropes (GA), subclasificados en los que padecían miopía (SM; n=51) y los hipermétropes (SH; n=46).
- 2) 45 pacientes emétropes (GC).

El examen oftalmológico se protocolizó en los siguientes apartados, a) determinación de agudeza visual sin corrección, b) exploración de la motilidad ocular, c) refracción y autorrefracción con/sin cicloplejia, d) biomicroscopía de los segmentos anterior y medio ocular, e) determinación de la presión intraocular, f) oftalmoscopia.

El examen bioquímico se efectuó tras la extracción de sangre de cada uno de los pacientes bajo las mismas condiciones (entre las 8-10 horas y ayuno durante un mínimo de 8 horas) y los parámetros preestablecidos fueron la determinación sérica de a) TSH, b) T₃, c) T₄ libre y d) T₄ total.

En todos los casos de disfunción tiroidea, el diagnóstico de certeza fue avalado por un especialista en endocrinología y/o especialista en medicina interna. Algunos de los

pacientes precisaron tratamiento y seguimiento de su proceso endocrinológico, ya que lo desconocían hasta el momento de efectuar este estudio.

La edad media de toda la muestra fue 41 ± 15 años.

El 16% del total de pacientes del GC fueron diagnosticados como hipertiroideos frente al 28% del GA. Y en relación a los subgrupos de estos últimos pacientes amétropes eran igualmente hipertiroideos 24% de los miopes y 34% de los hipermétropes (figura 45).

El 11% del total de pacientes del GC fueron diagnosticados de hipotiroideos frente al 22% del GA. Y en este grupo, el 27% de los miopes y el 18% de los hipermetropes fueron igualmente diagnosticados como hipotiroideos (figura 45).

El 73% del GC eran pacientes eutiroides mientras que en el GA solamente eran eutiroides el 48%. De este grupo de pacientes amétropes eutiroides, el 49% eran miopes y 48% hipermétropes (figura 45).

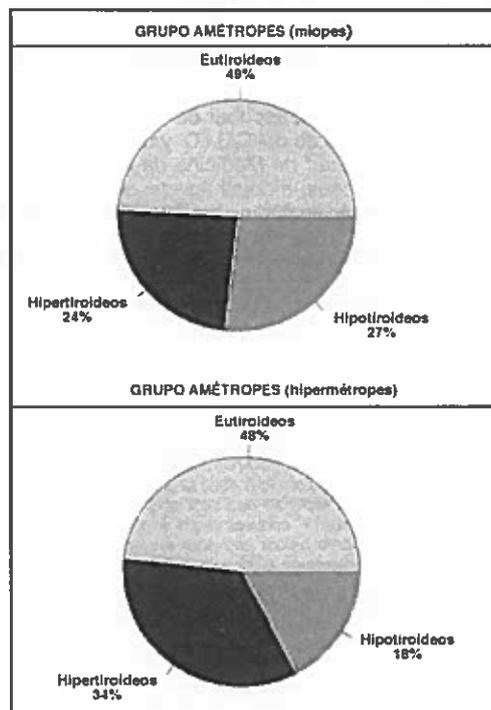


Fig.45 Relación entre función tiroidea y refracción en los grupos de pacientes amétropes.

V.-APENDICE

La media de las determinaciones para la TSH fue $3,49 \pm 5,9$ μ U/ml en el GA y de $1,95 \pm 1,41$ μ U/ml en el GC, siendo los valores de referencia de 0,35 a 5,50 μ U/ml. Además en el SM los valores medios fueron $4,38 \pm 7,32$ μ U/ml y en el SH de $2,60 \pm 4,65$ μ U/ml.

La media de las determinaciones para T₃ fue de $1,85 \pm 1,70$ ng/ml para el GA y de $1,78 \pm 1,69$ ng/ml para GC, siendo los valores de referencia entre 0,8 a 2,2 ng/ml. En el subgrupo SM los valores medios fueron $1,80 \pm 1,38$ ng/ml y para el SH de $2,1 \pm 2,05$ ng/ml.

La media de las determinaciones efectuadas para T₄ libre fue de $1,91 \pm 1,26$ ng/dl en el GA y de $1,68 \pm 1,69$ ng/dl en el GC, mientras que los valores de referencia estaban entre 0,7 a 1,9 ng/dl. El subgrupo SM presentó una media de $1,59 \pm 1,16$ y el SH $1,44 \pm 2,03$ ng/dl.

La media de determinaciones para T₄ total fueron para el GA de $8,25 \pm 4,55$ μ g/dl y para el GC de $8,52 \pm 4,08$ μ g/dl. Los subgrupos SM y SH presentaron respectivamente medias de $7,34 \pm 2,96$ μ g/dl y de $9,16 \pm 6,15$ μ g/dl.

Todos estos parámetros bioquímicos están resumidos en la tabla 8.

Tabla 8 . Comparación de los niveles plasmáticos de tirotropina (TSH) tiroxina (T₄ total y T₄ libre) y triyodotironina (T₃) entre pacientes miopes, hipermétropes y controles amétropes. Los valores son media \pm DS (entre paréntesis el número de pacientes). * p<0.05 y ** p<0.01

Grupos de Pacientes	CONTROLES	MIOPESES	HIPERMÉTROPES
TSH (μ U/ml)	$1,99 \pm 0,22$ (45)	$4,50 \pm 1,04$ * (51)	$2,75 \pm 0,72$ (45)
T ₄ total (μ g/dl)	$8,35 \pm 0,63$ (25)	$7,57 \pm 0,59$ (20)	$9,90 \pm 1,30$ (24)
T ₄ libre (ng/dl)	$1,52 \pm 0,17$ (26)	$1,59 \pm 0,19$ (36)	$2,18 \pm 0,25$ * (31)
T ₃ (ng/ml)	$1,46 \pm 0,12$ (39)	$1,83 \pm 2,1$ (45)	$2,18 \pm 0,24$ ** (42)

El análisis estadístico de la muestra nos reveló la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre los valores de TSH del GC y subgrupo SM ($p=0,0240$) y entre los valores de T_4 libre de SH y GC ($p=0,0173$) y de T_4 total entre SM y SH ($p=0,0581$), como puede apreciarse en la figura 46.

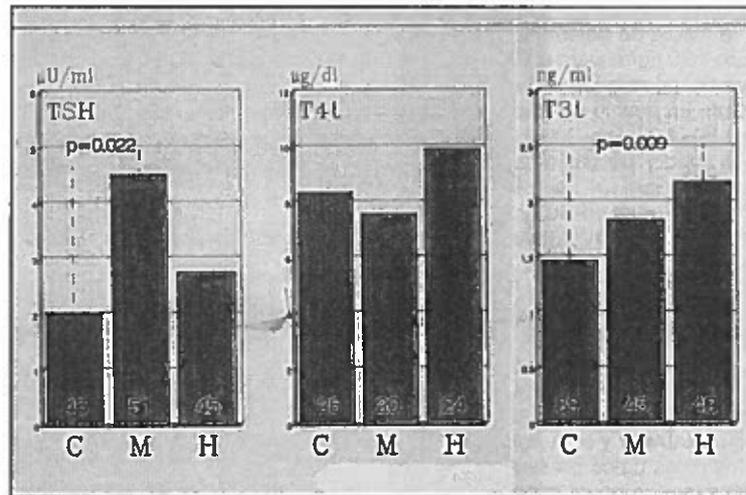


Fig .46 Comparación de las concentraciones de TSH, T_4 total, T_4 libre y T_3 entre pacientes miopes, hipermétropes y controles amétropes. Las diferencias más significativas se encontraron para la TSH en el SM y para T_4 libre y T_3 en el SH.

El análisis de la correlación demostró valores altamente significativos para TSH vs T_4 libre y T_4 total en el GA y concretamente en ambos subgrupos SM y SH y también de T_3 frente a T_4 libre y T_4 total en el SH.

Estudiando globalmente los datos hemos observado que la cifra de pacientes distiroideos en el GA era el doble que en el GC y que la incidencia de la distiroidosis era bastante similar entre los miopes y los hipermétropes, aunque no deja de llamar nuestra atención el hecho de que entre los sujetos hipermétropes el hipertiroidismo afectaba al doble de pacientes que el hipotiroidismo. Basándonos en estos resultados podríamos sugerir que existe una relación entre la presentación de hipermetropía y el hipertiroidismo. No obstante, no podemos imbricar mecanismos concretos por los que la HT influye en el estado de las ametropías, y especulamos que aunque los datos de nuestro estudio indican claramente una relación entre la función tiroidea y el estado refractivo, desconocemos las bases celulares o moleculares sobre las que se produce esta

interrelación. Es cierto que los diferentes mecanismos que controlan el crecimiento del globo ocular hacia la emetropía son diferentes en el ser humano que en los animales de experimentación y éstos difieren incluso entre especies (Wallman y cols., 1987; Schaffel y cols., 1988; Mc Brien y cols., 1993; Rada y Mathews 1994; Shin y cols., 1994). Posiblemente ésta sea la razón por la que aún no se ha podido establecer un modelo claro para la génesis de la miopía o la hipermetropía. Conociéndose que los receptores de la HT son factores de transcripción modulados por ligandos, los cuales a su vez pertenecen a una superfamilia que incluye receptores nucleares para otras moléculas como los esteroides, vitamina D₃, AR, prostaglandinas y ácidos grasos (Evans 1988; Muñoz y cols., 1988; Rentoumis y cols., 1990; Lazar 1993; Yen, 1994; Mangelsdorg y cols 1995) y puesto que los receptores de la HT se unen a T₃ con una afinidad diez veces mayor que a T₄ y por otra parte el hipertiroidismo altera la secreción de la hormona del crecimiento (Valcavi y cols., 1993) podríamos postular que las alteraciones en la disponibilidad de HT inducirían fácilmente anomalías en la expresión génica en relación al tamaño del globo ocular y podría incluso influir en la capacidad de acomodación, y uno de los posibles mecanismos para que esto se produjese estaría basado en la alteración de la distribución de los RHT en el globo ocular en relación a la disfunción de la glandula tiroides, bien en el sentido de hipertiroidismo o hipotiroidismo.

2. ESTUDIO DE LA FUNCION VISUAL EN NIÑOS CON HIPOTIROIDISMO CONGENITO.

Es bien cierto que muchos de los mecanismos que conducen a las malformaciones congénitas y a las anomalías del desarrollo aún constituyen un enigma. Su incidencia, a pesar de ello sigue siendo muy elevada. Fuentes oficiales de la Conselleria de Sanitat de la Generalitat Valenciana nos han confirmado que las malformaciones congénitas son la segunda causa de muerte neonatal en nuestra Comunidad y que una parte de las mismas tiene un origen desconocido. Hasta hace unas décadas no fue establecida una clara relación causal entre la disminución en la disponibilidad de HT durante el desarrollo prenatal y el daño cerebral irreversible causado al organismo en formación (Balazs 1976; Eayrs 1968; Shapiro 1968; Hayek y cols., 1973; Morreale de Escobar y Escobar

del Rey 1980; Porterfield y Hendrich 1993; Lázarus 1993). Aunque hasta hace pocos años existían zonas endémicas de cretinismo en nuestro país (por ejemplo la comarca extremeña de Las Hurdes en Cáceres presentaba una incidencia muy elevada de cretinismo), gracias a los programas de prevención gestacionales y perinatales en la actualidad el HPCN afecta a 1 de cada 3000 niños Españoles nacidos vivos y éstas cifras se comparan con las obtenidas en otros países Europeos se observa que todas son bastante similares, oscilando entre 1 de cada 2000-4000 nacidos vivos. No obstante, la incidencia se multiplica vertiginosamente en los países subdesarrollados, principalmente en el sudeste asiático y en ciertas áreas de Africa y sudamérica.

Hoy en día es difícil encontrar en la Comunidad Valenciana niños que hayan escapado al control de los programas de prevención de HPCN y si los niños han llegado a ser diagnosticados, más pronto o más tarde han sido también sometidos a tratamiento y vigilancia estricta, por lo que no presentarían el cuadro de cretinismo florido.

Debido a la ausencia de publicaciones que analicen la función visual y las características oftalmológicas de los niños afectados de hipotiroidismo congénito, decidimos efectuar un estudio retrospectivo en niños diagnosticados de HPCN en servicios de neonatología en los últimos años. Catorce de los pacientes registrados pudieron ser localizados y se les citó en las consultas de oftalmología para realizarles una anamnesis y exploración oftalmológica que incluía a) determinación de la agudeza visual sin corrección, b) exploración de la motilidad ocular, c) refracción/ autorrefracción bajo cicloplejia, d) exploración del segmento anterior y medio en el biomicroscopio, e) exploración del fondo de ojo. Además se registraron datos sobre la edad de diagnóstico y se confirmó que presentaban al nacimiento cifras elevadas de TSH y muy bajas de T₄ libre, T₄ total y T₃; se revisaron los tratamientos administrados y el seguimiento endocrinológico efectuado. Finalmente se seleccionó un grupo de 10 niños que se ajustaron a los criterios de selección/exclusión para el estudio de las manifestaciones oculares en el HPCN (GH) y se les comparó con un grupo control pareado compuesto por 10 niños que no presentaban disfunción tiroidea ni enfermedades sistémicas acompañantes y que tenían la misma edad y sexo que los del grupo estudio, clasificados en 50% varones y 50% hembras (GC).

Todos los niños del GH presentaron HPCN, aunque fueron sometidos a tratamiento hormonal sustitutivo de forma precoz.

La edad media actual de los niños fue de 5.8 ± 1.7 años (rango de 3 a 10 años), siendo la mitad varones y la mitad hembras.

Ninguno de los niños seleccionados del GH presentó un retraso mental evidente aunque sí se detectaron anomalías psicomotoras como hipotonía y dificultad en el habla y en la forma de expresarse. 37% de los niños del GH precisaban ayuda escolar frente a 10% de los del GC.

El examen del macizo craneofacial reveló la presencia de cejas prominentes en un caso, epicantus en 3 casos (30%) y puente nasal ancho en 2 casos. Además 4 niños padecían estrabismo (40%) y 2 tenían nistagmus.

El examen del fondo de ojo no presentó anomalías evidentes en los niños del GC, aunque en el GH 2 niños mostraban una retina muy delgada con vascularización coroidea aparente y además 1 niño presentó vasos retinianos sinuosos, aunque no patología significativa.

La refracción efectuada a cada uno de los niños de ambos grupos demostró que el 90% de los niños del GH eran amétropes (GA) presentando el 70% hipermetropía de más de 2D y 10% miopía de más de 1D, frente al GH que estaba constituido por 60% amétropes (GA) de los cuales 50% eran hipermétropes y 10% miopes (Tabla 9).

Tabla 9. Relación entre el HPCN y la refracción en los grupos de niños estudiados.

G A	Hipermétropes	Miopes
G H	70%	10%
G C	50%	10%

La agudeza visual (explorando cada ojo con corrección óptima) fue bastante similar entre grupos, siendo la media para los ojos derechos de los pacientes de 0.7 ± 0.2 en el GH frente al 0.9 ± 0.1 en el GC y para los ojos izquierdos de 0.9 ± 0.1 en el GH frente a 1 ± 0.05 en el GC.

Los resultados de la agudeza visual corregida en el ojo derecho y ojo izquierdo para

ambos grupos pueden analizarse en la figura 47.

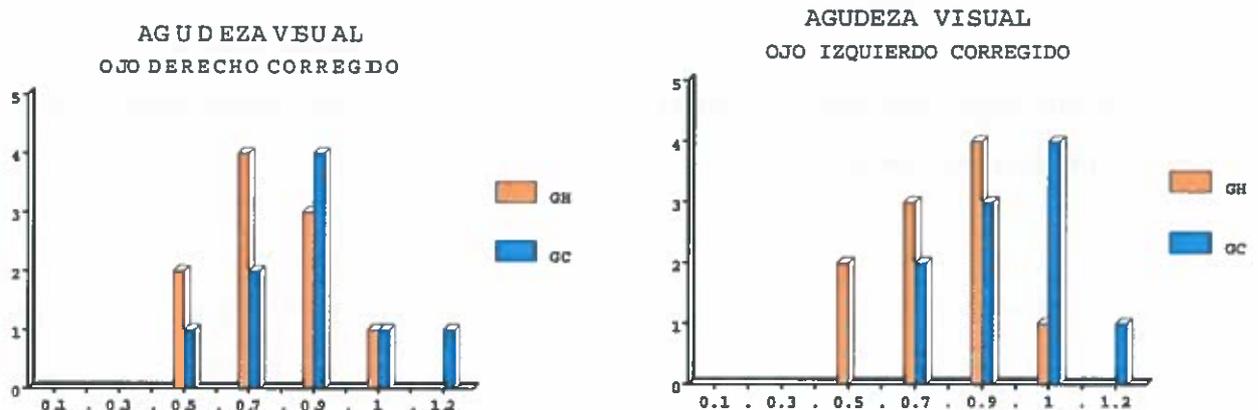


Fig. 47 Diagrama de resultados de la exploración de la agudeza visual (optotipos E Schnellen) para el ojo derecho y el ojo izquierdo, con corrección óptima, para ambos grupos de niños.

De todo ello se deduce que aunque los niños estuvieron expuestos a bajos niveles de HT durante su desarrollo prenatal, el establecimiento de un tratamiento precoz es indispensable para el desarrollo y mantenimiento psicomotor y la morfogénesis y la función de los órganos sensoriales. Es por ello que ninguno de los niños del GH presentó afectación severa del síndrome del HPCN y las manifestaciones clínicas del cretinismo no eran floridas, aunque sí pudieron apreciarse las anomalías del comportamiento y trastornos leves del aprendizaje, los signos leves de disgenesia craneofacial (cejas prominentes, epicantus, puente nasal ancho) y las manifestaciones oculares que aunque de carácter moderado se presentaron en el GH con una incidencia mayor al GC y entre las cuales destacaron el estrabismo, la disminución del espesor retiniano y las anomalías del trayecto de los vasos de la retina, siendo dichos trastornos manifestaciones leves de un cuadro disgenésico, común no solo al cretinismo sino a muchos síndromes teratogénicos y malformaciones congénitas de etiología desconocida (Fisher y Klein, 1981; Miller y Mc Kinna 1996; Silva Araujo y cols., 1993; Strömmland y cols, 1991; Lazarus, 1993; Porterfield y Hendrich 1993; Strömmland y Pinazo-Durán 1994).

Todos estos datos confirman nuestra idea inicial de que la imposibilidad de encontrar un número significativo de niños afectados de HPCN que muestren el cuadro clínico patognomónico por no haber sido tratados, junto a las limitaciones éticas de la

experimentación humana lógicamente abogan por el uso de los modelos experimentales para analizar los efectos del HPCN en el desarrollo del SNC y de los órganos neurosensoriales y también identificar moléculas y genes que regulados por HT durante el desarrollo tengan una función esencial en la morfogénesis ocular y subsecuentemente en el establecimiento de la visión.

VI. DISCUSSION

DISCUSION

1.-LA HORMONA TIROIDEA EN EL DESARROLLO DE LA REGION CRANEOFACIAL Y DEL GLOBO OCULAR.

La morfología del desarrollo es un tema fundamental cuando se pretenden establecer los mecanismos intrínsecos que acompañan a diversas malformaciones que afectan a la región cefálica. Todos los órganos derivan del tejido epitelial y del mesénquima, produciéndose durante la morfogénesis ramificaciones, invaginaciones y evaginaciones, así como complejas inter-relaciones tisulares, hasta que alcanzan su forma y función definitivas. Estos hechos se conocen bien desde hace varias décadas y tras superar la recesión ocurrida en este campo entre 1950-1980, han ido desarrollándose múltiples posibilidades técnicas, particularmente en los años más recientes en el campo de la microtecnología computarizada y análisis de imágenes, lo que ha contribuido a alcanzar información esencial para comprender los procesos de morfogénesis y remodelación de la región craneo-facial, del SNC y de los órganos sensoriales.

Los resultados morfológicos y morfométricos obtenidos a lo largo del estudio del desarrollo embrionario del macizo craneofacial y del globo ocular de la rata Wistar utilizando el modelo de HPCN descrito en el presente trabajo, muestran tanto el retraso como la alteración en los patrones de formación de los mamelones frontal, latero-nasal, maxilar y mandibular y la alteración en la orientación del esbozo óptico. Otros trabajos similares que analizaban la exposición del embrión a agentes medioambientales (radiaciones ionizantes, oxígeno hiperbárico) y sustancias químicas (etanol, metrotexate, ácido retinoico, etc) también demuestran la susceptibilidad de la región facial hacia cualquier elemento exógeno o endógeno que actúe durante el desarrollo, incluyendo el primordio ocular (Lammer y cols., 1985; Cook y cols., 1986; Wedden, 1987; Sulik y cols, 1988; Matsuo, 1993). Descripciones de dismorfogénesis craneofacial, asimetría hemifacial y otras anomalías menores como alteraciones en la implantación del pabellón auricular, nariz hipoplásica, puente nasal excesivamente ancho, surco nasolabial prominente, anomalías labiales, epicantus, etc, se han efectuado en niños que presentaban el cretinismo (Shapiro, 1968; Hayek y cols, 1973; Fisher y Klein, 1981; Morreale y cols, 1980, 1985, 1990).

Con el modelo experimental de HPCN empleado aquí no hemos hallado malformaciones graves de la región cefálica, como las agenesias o disgenesias

VI.- DISCUSIÓN

mandibulares, anoftalmos y criptoftalmos que también han sido descritas en cuadros síndromicos que presentaban entre sus manifestaciones clínicas el hipotiroidismo (Bierich y cols, 1991; Elliot y cols., 1993). Por el contrario, hemos hallado de forma habitual la reducción del tamaño de la cabeza, y la alteración morfológica y morfométrica de los parámetros del desarrollo del macizo facial de la rata, datos similares a los descritos en niños que presentaban el cretinismo (Morreale de Escobar y cols., 1980, 1985, 1990; Fisher y Klein, 1981).

Por otra parte, hay descripciones previas (tanto clínicas como experimentales) de anomalías oculares asociadas a la disfunción tiroidea congénita (Shapiro, 1968; Adams y cols, 1989; Sarlieve y cols 1989; Bierich y cols., 1991; Elliot y cols., 1993; Barres y Raff 1994 b), aunque son muy escasas y además en ninguna de ellas se incluyen estudios sobre la función visual. Afortunadamente, hoy en día es difícil que en las sociedades occidentales aparezcan niños hipotiroideos congénitos que no hayan sido detectados por los programas de prevención y sufran el cretinismo en su forma clínica florida. Por ello diseñamos un trabajo preliminar con el fin de estudiar la influencia de la disfunción tiroidea congénita sobre el desarrollo de la visión. Analizamos a 10 niños diagnosticados en el nacimiento de hipotiroidismo congénito-neonatal con edades comprendidas entre 3 y 10 años (media 5.8 ± 1.7 años), pero que fueron tratados precozmente de forma adecuada y se incorporaron a un programa de vigilancia de su enfermedad metabólica. Los datos obtenidos del estudio de estos niños fueron comparados con los que obtuvimos de un grupo de niños control de la misma edad y sexo. Los resultados demostraron que la agudeza visual óptima monocular de los niños del grupo hipotiroideo, aunque ligeramente inferior, no difería significativamente de los controles. No existían características dismórficas craneofaciales graves. Sin embargo dos niños del grupo de hipotiroideos presentaban epicantus marcado y presentaron estrabismo el 40% de los hipotiroideos frente a un 10% de los controles. La incidencia de retraso mental fue nula, aunque varios niños del grupo afecto del problema congénito necesitaban ayuda extraescolar. Nuestros datos se pueden interpretar en el sentido de que el hipotiroidismo congénito tratado precozmente presenta una sintomatología mucho menos importante que el no tratado, reduciéndose significativamente la afectación del SNC y el retraso mental así como las malformaciones craneofaciales. De ahí la importancia de los programas de prevención gestacional y perinatal en la búsqueda de metabolopatías y

VI.- DISCUSIÓN

malformaciones congénitas. Estos resultados se presentaron como comunicación oral solicitada al Congreso del European Paediatric Ophthalmology Group (Dublin 1998) y al Congreso de la Sociedad Española de Biología del desarrollo (Barcelona 1999).

Volviendo al hecho de que no hayamos encontrado malformaciones severas en los animales procedentes del GH y analizando este hecho, especulamos que podría deberse a que el hipotiroidismo se ha inducido mediante la administración del antitiroideo de síntesis MMI a partir del día 9G. Siendo que la mayoría de manifestaciones de dismorfogénesis facial se asocian a la acción de las noxas en el periodo crítico de gastrulación que abarca los días 7-8G en la rata, como indican varios estudios sobre teratología (Cook y cols., 1986; Wedden, 1987; Sulik y cols, 1988; Silva Araujo y cols., 1993; Strömmland y cols., 1991; Pinazo-Durán y cols., 1993; Strömmland y Pinazo-Durán 1994) nuestro modelo podría quedar exento de este tipo de complicaciones más severas del proceso de embriogénesis. Además un trabajo muy específico relaciona la disminución de los valores plasmáticos de HT y la acción del alcohol con la aparición de dismorfogénesis craneofacial en el curso del síndrome alcohólico fetal (Portolés y cols., 1988).

Analizando los posibles efectos teratogénicos del antitiroideo de síntesis MMI, nuestros resultados se superponen a los comentarios anteriores, ya que no hemos detectado alteraciones graves de la morfogénesis craneo-facial y del esbozo ocular utilizando esta sustancia química, al comparar estos animales tratados con los controles correspondientes (GMMI versus GC2). Por lo tanto podemos afirmar que la administración de MMI a partir del día 9 del período prenatal y durante toda la gestación no induce "per sé" procesos graves de dismorfogénesis craneofacial ni del globo ocular. Quedaría por analizar el posible efecto embriopático que podría inducir esta sustancia química si se administrase durante la primera semana de gestación, incluyendo el período crítico de gastrulación.

Por otra parte, el retraso en el desarrollo del macizo craneofacial y del esbozo óptico que hemos observado en el presente estudio, es paralelo al retraso en el desarrollo del peso y tamaño del globo ocular. La disminución de los valores correspondientes al peso, y la reducción en las medidas de los diámetros vertical, horizontal y antero-posterior o axial fue muy significativa en el grupo de animales tratados frente a los controles de la misma edad cronológica (GH versus GC). Esta disminución fue observada a lo largo de

todo el desarrollo y los valores nunca alcanzaron los de los controles, incluso cuando se estudiaron las fases más avanzadas de la evolución, es decir hacia P15 y P25, en la fase en la que el animal ya se considera que ha abandonado el periodo de lactancia. De hecho los periodos críticos del desarrollo de la rata en los que se necesitaría un nivel concreto y adecuado de HT abarcan la primera y segunda semana de gestación y la primera semana tras el nacimiento (que corresponden al primero y al tercer trimestre de desarrollo intrauterino humano). Se ha descrito que la mayor parte de los genes que se regulan por HT son sensibles a la misma solamente durante este periodo crítico que se denomina “brain growth spurt” (Dobbing y Sands, 1979) en el cual entre otras tiene lugar la gliogénesis, mielinogénesis y sinaptogénesis, siendo además particularmente importante para el desarrollo del macizo craneofacial y de estructuras neurosensoriales que se afectan selectivamente en el curso del HPCN (Mastaglia y cols, 1978; Morreale de Escobar y cols., 1990, 1992, 1993).

Este retraso en el peso y en el crecimiento del globo ocular, que hemos detectado en relación a la disminución de la disponibilidad de HT, es común a muchos síndromes teratogénicos, como el síndrome de la talidomida (Strömmland y cols., 1991), síndrome alcohólico fetal (Strömmland 1985; Gottesfeld y Silverman 1990; Pinazo-Durán y cols., 1993; Strömmland y Pinazo-Durán, 1994), síndrome gestacional de la intoxicación por quinina (Miller y McKinna 1996; Mc Kinna 1996), síndrome fetal de la cocaína (Silva Araujo y cols., 1993) y que también aparece en otras anomalías del desarrollo (Sulik y cols., 1988; Harto y cols., 1999; Nuckolls y cols., 1999) y en modelos de animales transgénicos diseñados con el fin de valorar las anomalías del desarrollo (Götz, 1995).

En este sentido podemos especular que la HT actuaría como un mediador para la expresión de genes implicados en la morfogénesis del ojo, principalmente factores de crecimiento y mitógenos más específicos, como el factor de crecimiento nervioso, el factor de crecimiento fibroblástico, la activina (miembro de la familia del factor transformador del crecimiento β) y el ácido retinóico (Walker y cols., 1979; Levi Montalcini, 1987; Matsuo, 1993). La HT y por supuesto cada factor de crecimiento tiene su correspondiente receptor (o receptores) localizados en la superficie celular o en el núcleo. Los receptores nucleares son factores transcripcionales que se unen directamente a secuencias específicas del DNA genómico y regulan la transcripción de otros genes.

De ahí que los niveles bajos de HT induzcan la subexpresión de los genes que

VI.- DISCUSIÓN

se expresan como consecuencia de sus mecanismos de acción y por ende de los factores de crecimiento necesarios para llevar a cabo todos los procesos celulares y tisulares, de forma que la morfogénesis ocular no va a seguir los patrones normales.

De todos modos, existen autores que sugieren que la HT más que ejercer una influencia directa, actuaría en muchos casos como un elemento sincronizador de todos estos factores, o lo que es lo mismo modulando la aparición temporo-espacial de los mismos (Muñoz y Bernal, 1997; Bernal y Guadaño Ferraz 1998).

Teniendo en cuenta todos estos hechos, cualquier anomalía en la disponibilidad de HT durante la ontogénesis podría provocar el retraso en el desarrollo y alteraciones en la morfogénesis del macizo craneo-facial, de la órbita y del globo ocular, como hemos descrito en el transcurso del presente estudio.

2. LA HORMONA TIROIDEA EN EL DESARROLLO DE LA RETINA.

El desarrollo de la retina es paralelo al de otras estructuras del SNC y similar al de los órganos neurosensoriales. La retina es el verdadero órgano de la visión y cualquier alteración en su morfología inducirá deficiencias en la función visual.

Analizando sus características, nuestros resultados morfométricos obtenidos del GC concuerdan con diversos estudios que señalan la secuencia temporo-espacial de aumento del tamaño del globo ocular y de la retina durante el desarrollo (Prada y cols., 1981; Boycott y cols., 1991; Reichenbach y cols, 1991; Pinazo-Durán y cols, 1993; Saude, 1993; Nishimura 1980).

En este trabajo hemos descrito el incremento en el área media de la retina desde el día 21G hasta el 25P, coincidiendo en lo esencial con los resultados de otros autores (Beach y Jacobson 1979; Prada y cols., 1981; Zimmerman y cols, 1988; Reichenbach y cols., 1991).

Se ha demostrado que la retina presenta una actividad proliferativa considerable, incluso tras el nacimiento (Reichenbach y cols., 1991; Prada y cols., 1991). Esto podría deberse a la intensa actividad que desempeñan en las últimas etapas de proliferación los distintos tipos celulares, glía de Müller, astrocitos y células bipolares, que son los últimos en desarrollar a este nivel. Particularmente en el ratón, los conos, células amacrinas, células horizontales y células ganglionares se producen prenatalmente

VI.- DISCUSIÓN

mientras que las células bipolares y células de Müller son principalmente de aparición postnatal. Únicamente los conos pueden producirse tanto pre- como postnatalmente. Y esto ocurre también en la retina de la rata Wistar.

Las células ganglionares son las primeras en abandonar el ciclo celular y comenzar a diferenciarse (Zimmerman y cols., 1988; Prada y cols., 1991; Saude 1993). En nuestro estudio hemos observado que la retina sigue aumentando su tamaño durante el período perinatal, aún habiendo concluido este último período proliferativo. Además pudimos constatar el hecho de que algunas capas retinianas aumentaban su espesor aún tras el nacimiento, estabilizando los valores alrededor del día 15P. Quizá esto pudiera deberse a la actuación de ciertos mecanismos remodeladores dirigidos o llevados a cabo por las células gliales retinianas (Ramírez y cols., 1994; Triviño y cols., 1997; Triviño y cols., 2000), fase que correspondería a la denominada “*brain growth spurt*” y que se extiende en la rata desde el final del período prenatal hasta el día 10P aproximadamente (Dobbing y Sands, 1979). Es posible que tanto factores endógenos (genéticos, hormonales) como exógenos (estímulo luminoso, apertura palpebral espontánea y otros) puedan estar implicados en el proceso de crecimiento retiniano postnatal y todos ellos relacionados a su vez de una forma directa con las necesidades de preparación morfológica y fisiológica de todas las estructuras para que tenga lugar el comienzo de la función visual según los patrones establecidos.

El cerebro de los vertebrados responde a una gran variedad de hormonas y otros mitógenos, como factores del crecimiento y corticoides, entre otros. A nivel ocular, cualquier alteración ocurrida tanto en el tiempo como en el espacio puede infringir un retraso en el proceso de diferenciación y proliferación de uno o varios tipos celulares y por consiguiente en el establecimiento de las capas retinianas y la aparición de los fenotipos celulares definitivos, lo que acontece en la retina de ratas controles aproximadamente entre los días 15P y 25P.

A tenor de nuestros resultados actuales y basándonos en nuestros experimentos previos (Gamborino y cols., 1998; Pinazo-Durán y cols., 1999a; Sevilla y cols., 2000) y otros en fase de publicación (Gamborino y cols.), y habiendo observado el retraso evidente en el desarrollo de la morfología retiniana y en la estratificación de las capas correspondientes, podemos especular que la morfogénesis de la retina depende directamente de unos niveles plasmáticos apropiados de HT, no sólo durante las fases

VI.- DISCUSIÓN

tempranas, sino también en las más tardías de la ontogénesis. En este sentido, Macaione y colaboradores (1984) demostraron que la administración de tiroxina en ratas durante el período postnatal inducía un efecto trófico sobre los procesos de sinaptogénesis y maduración neuronal, acelerando el proceso de neuroretinogénesis en comparación con un grupo de ratas no tratadas.

Apoyando nuestra hipótesis de que la HT es esencial para el desarrollo retiniano, está la presencia del RHT en la retina del pollo (Sjoberg y cols., 1992) y en la retina de la rata (Nicola, 1994), como hemos descrito también en el transcurso de este trabajo y en otros estudios preliminares de nuestro grupo (Gamborino y cols 1998; Pinazo-Durán y cols., 1997; Pinazo-Durán y cols., 1999 a; Sevilla y cols., 2000).

La isoforma del RHT predominante durante la gestación y también en el período perinatal fue la $\alpha 1$, mientras que en el período postnatal las isoformas mayoritarias del RHT fueron las $\beta 1/\beta 2$. Esto coincide con las distribuciones descritas en el globo ocular del pollo y de la rata por (Yusta y cols., 1988; Sjöberg y cols., 1992; Nicola, 1994) y en otras estructuras del SNC (Muñoz y Bernal 1997; Bernal y Guadaño Feraz 1998). Cada una de las isoformas tendría una función específica durante el desarrollo de las estructuras nerviosas.

¿Cómo explicaríamos el mecanismo de acción de la HT en la neuroretinogénesis?

Los miembros de la superfamilia de receptores nucleares, independientemente de su origen, comparten un mecanismo de acción común como factores de transcripción dependientes de ligando. Como hemos comentado anteriormente, los efectos transcripcionales de estos receptores resultan de su interacción directa con pequeñas secuencias de reconocimiento específicas en el DNA, en las regiones reguladoras de los genes diana, denominadas "elementos de respuesta a hormona" (T3RE). Sabiendo que en la rata los niveles de HT aumentan normalmente hasta el día 17G permaneciendo constantes hasta el nacimiento y que los niveles del RHT aumentan gradualmente en dos ondas que marcan sus valores máximos los días 6P y 15P (Perez-Castillo y cols., 1985) y trasladando todos estos conceptos a la retina en desarrollo, proponemos que la disminución de los valores de HT circulantes provocarían una serie de fenómenos a nivel molecular cuya repercusión inmediata será la alteración en los procesos de diferenciación y proliferación celulares y el retraso en la adquisición de los tipos celulares definitivos y de la morfología anatómica y funcional de la retina que en estas condiciones sería

VI.- DISCUSIÓN

incompatible con una buena función visual, incluyendo la percepción de colores, adaptación luz/obscuridad, agudeza visual, visión del contraste, etc., que dependen no solo de la integridad anatómico-funcional de las células y tejidos del globo ocular, de la vía óptica y de los centros superiores, sino también de la coordinación y fusión de la visión de ambos ojos para lograr la estereopsis (Buser e Imbert 1993; Saude 1993).

Finalmente, hemos constatado la alteración del volumen nuclear de las células ganglionares en el GH respecto del GC. La observación de este dato ha sido constante a lo largo del desarrollo. Esto implicaría una disminución de la actividad celular en el grupo de animales tratados, inducida por la privación de hormona en periodos clave de la morfogénesis. Este dato nos pareció realmente interesante, ya que no ha habido descripciones previas en este sentido, aunque sí hay trabajos que reflejan la alteración del número de dendritas en las células piramidales del cortex visual en ratas a las que se indujo el hipotiroidismo (Ruiz Marcos y cols., 1980) y todo ello parece sugerir que el crecimiento y la morfología de las neuronas, y en nuestro caso de las células ganglionares, es realmente muy sensible a variaciones biológicas tiroideo-dependientes, como demuestran las alteraciones en las pruebas electrofisiológicas como el electroencefalograma y los potenciales visuales evocados en pacientes con hipotiroidismo (Raiti y cols., 1971; Mastaglia y cols., 1978).

Intentando pormenorizar estos detalles y mediante el examen a microscopía electrónica de transmisión hemos analizado la estructura de la membrana nuclear y concretamente nos hemos centrado en los poros nucleares. Estos son interrupciones de la membrana nuclear que permiten el intercambio de macromoléculas entre el núcleo y el citoplasma en ambas direcciones. En una reciente publicación de nuestro laboratorio en la que se han estudiado los mecanismos de transcripción "in vivo" en las células ganglionares de la retina de la rata, se ha descrito que los transcritos se mueven desde el núcleo al citoplasma y que la proporción de éstos era del 64% y del 36% respectivamente (Pinazo-Durán y cols., 1999 b), habiéndolos identificado mediante técnicas de inmunocitoquímica. Por otra parte, Iborra y cols (2000) han estudiado el transporte de ARN a través de los poros nucleares utilizando células HeLa para que se incorporase al ciclo celular y fuera exportada en el ARN hacia el citoplasma y así poder localizarla mediante técnicas inmunocitoquímicas y examen en microscopio electrónico de transmisión. Además, en nuestros resultados actuales del estudio ultraestructural de la

VI.- DISCUSIÓN

sección transversal de la retina a microscopía electrónica hemos observado que hay un número menor de poros nucleares por unidad de longitud de membrana en el GH, aunque este resultado no fue significativo. Hay que tener en cuenta que un mayor número de poros se ha relacionado con mayor actividad transportadora de la célula en cuestión (Schumm, 1997; Iborra y cols., 2000). Sin embargo, los resultados del examen morfométrico efectuado en la membrana nuclear de las células ganglionares, indican que el tamaño del poro es significativamente menor en el GH que en el GC. Estos hallazgos ultraestructurales podrían interpretarse en relación a la disminución de la disponibilidad de HT durante el desarrollo, de hecho, al ser estos poros más pequeños dificultarían la homeostasis nucleo-citoplasmática del ARN y en consecuencia la síntesis protéica también estaría disminuída en relación al GC (Schum 1997). Este posible efecto secundario que la deficiencia de HT tendría sobre los mecanismos de transcripción a nivel de la retina, están siendo estudiados en la actualidad por nuestro grupo investigador.

3. LAS HT Y SU POSIBLE RELACION CON LAS PATOLOGIAS OCULARES.

Tras el análisis exhaustivo que hemos efectuado a lo largo de este trabajo sobre la relación entre las HT y el desarrollo del macizo craneofacial, de la órbita y del globo ocular y apoyándonos en las distintas publicaciones que hemos ido revisando y en los resultados de nuestro estudio sobre la refracción y la función tiroidea desarrollado ampliamente en el apartado apéndice de esta tesis, cabría preguntarse si de algún modo esto podría tener una aplicación clínica.

Hemos descrito que la HT desempeña una función trófica esencial en la morfogénesis craneofacial, en la formación del globo ocular y en la neuroretinogénesis, de modo que extrapolando cuidadosamente nuestros datos experimentales al ser humano podríamos plantearnos las siguientes cuestiones:

1. Puesto que la falta de HT durante el desarrollo produce un retraso de la morfogénesis de las distintas estructuras oculares y puesto que existen pruebas evidentes de la existencia del RHT a nivel ocular ¿podría intentarse el tratamiento actuando sobre el RHT en ciertos procesos de disgenesia orbitaria?.

Y por otra parte ¿podría la aplicación de antitiroideos o bloqueadores del RHT a nivel local inducir una estabilización del aumento del globo ocular con la edad y por tanto una estabilización de la miopía axial en sus inicios?

2. Puesto que la falta de HT durante el desarrollo produce un retraso en la neurorretinogénesis, ¿podría existir alguna relación entre el déficit de RHT a nivel ocular y distintas distrofias retinianas (como la distrofia de conos) a pesar de que los niveles plasmáticos de las HT fueran normales?

Estas y otras cuestiones similares que aún permanecen sin esclarecer, podrían ser motivo de una serie de estudios siguiendo esta misma línea de investigación ocular.

VII. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1.- Del estudio del desarrollo embrionario del macizo craneofacial de la rata Wistar en un modelo de HPCN se deduce que:

1.1 El HPCN induce un retraso en el desarrollo de las estructuras faciales y la alteración en los patrones de morfogénesis.

1.2 Utilizando este modelo de HPCN no hemos hallado ninguna malformación severa del macizo craneofacial.

2.- Del estudio morfológico y morfométrico del desarrollo embrionario del globo ocular en la rata Wistar en un modelo de HPCN se deduce que:

2.1 El HPCN provoca un retraso en el crecimiento y desarrollo del esbozo óptico, de los tejidos anexos y de la órbita.

2.2. El HPCN provoca una disminución del tamaño y peso del globo ocular que se perpetúa en fases avanzadas de la evolución postnatal.

3.- El estudio morfológico y morfométrico del desarrollo embrionario de la retina en la rata Wistar en un modelo de HPCN sugiere que:

3.1 La disfunción tiroidea congénita cursa con un retraso en el proceso de diferenciación y proliferación de los distintos componentes celulares de la retina y en el establecimiento de su morfología definitiva.

3.2 El HPCN induce una disminución del área y espesor medio de la retina que se perpetúa en fases avanzadas de la evolución postnatal.

3.3 El HPCN induce la disminución del volumen nuclear de las células ganglionares, tanto en el periodo prenatal como durante el desarrollo postnatal, no alcanzando en ninguno de los días experimentales los valores de las retinas procedentes de animales no tratados.

3.4 El HPNC provoca una reducción del número y de la luz de los poros de la membrana nuclear de las células ganglionares, de forma que esta alteración ultraestructural puede repercutir negativamente en la efectividad de transporte nucleo-citoplásmico y por consiguiente en la actividad celular.

VII.- CONCLUSIONES

4.- El estudio de la expresión y distribución del RHT en la retina durante el desarrollo de la rata Wistar no sometida a deprivación hormonal (GC) demuestra que las isoformas se expresan y distribuyen a lo largo de todas las capas retinianas, con un patrón de expresión nuclear y mitocondrial similar al del cerebro, siendo las formas α predominantes durante las etapas pre- y perinatal y las β las existentes en etapas más avanzadas del desarrollo y en el animal adulto.

Como conclusión final podemos argumentar que **la HT es indispensable durante el desarrollo pre- y postnatal del globo ocular y su función sería la de modular tanto los procesos de diferenciación y proliferación celular como mecanismos de interacción celular y tisular, favoreciendo la sinaptogénesis y la efectividad de la función visual. Especulamos que su mecanismo de acción en la retina en desarrollo puede ser mediante la unión a receptores específicos nucleares y mitocondriales, favoreciendo la síntesis protéica y regulando la expresión de genes implicados en la neuroretinogénesis.**

Todos los resultados del modelo experimental de HPCN pueden extrapolarse, con sumo cuidado, a las descripciones de dismorfogénesis craneofacial en el curso del cretinismo.

VII. BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

Adams PM, Stein SA, Palnitkar M, Anthony A, Guerrity L, Shanklin DR (1989) Evaluation and characterization of the hypothyroid hyt/hyt mouse. En: Somatic and behavioral studies. *Neuroendocrinol* 49:138-145.

Almazan G, Honegger P, Matthieu JM (1985) Triiodothyronine stimulation of oligodendrocyte differentiation and myelination. *Dev Neurosci* 7:45-54.

Asami T, Touru K, Uchiyama M (1995) Effects of l-thyroxine on serum lipid profiles in infants with congenital hypothyroidism. *J Pediatrics* 127:812-814.

Balazs R (1976) Hormones and brain development. En: Perspectives in brain research. *Progress in Brain Research* (M.A. Corner y D.F. Swabb, eds.). Amsterdam Elsevier North Holland. Vol 45 pp. 139-159.

Barres BA, Lazar MA, Raff MC (1994 a) A novel role for thyroid hormone, glucocorticoids and retinoic acid in timing oligodendrocyte development. *Development* 120: 1097-1108.

Barres BA, Raff MC (1994 b) Control of oligodendrocyte number in the developing rat optic nerve. *Neuron* 12:935-942.

Beach DA, Jacobson M (1979) Patterns of cell proliferation in the retina of the clawed frog during development. *J Comp Neurol* 183:603-614.

Becker CG, Becker T, Schmidt A, Roth G (1994) *Develop Brain Res* 79:140-146.

Berko-Flint Y, Levkowitz G, Vardimon L (1994) Involvement of c-Jun in the control of glucocorticoid receptor transcriptional activity during development of chicken retinal tissue. *EMBO J* 13:646-654.

Bernal J, Guadaño-Ferraz A (1998) Thyroid hormone and the development of the brain. *Current Opinion Endocrinol Diab* 5:

Bierich JR, Christie M, Heinrich JJ, Martinez AS (1991) New observations on mid-line defects: Coincidence of anophthalmos, microphthalmos and cryptophthalmos with hypothalamic disorders. *Eur J Pediatr* 150:246-249.

Bosch R, Calvet J, Zaragoza A, Gamborino MJ, Portoles M, Pinazo-Duran MD (1998) Refracción y disfunción tiroidea. *Arch Soc Esp Oftalmol* 73:39-48.

Boycott BB, Wässle H (1991) Morphological classification of bipolar cells of the primate retina. *Europ Jour Neurosci* 3:1069-1088.

Brent GA (1994) The molecular basis of thyroid hormone action. *New England J Med* 331:847-853.

Buser P, Imbert, M (1993) Genesis and elaborations of signals in the retina. En: *Vision*. Bradford eds., The MIT Press (Cambridge); pp 202-230.

Calvo RM, Obregon MJ, Ruiz de la Oña, Escobar del Rey F y Morreale de Escobar G (1990) Congenital hypothyroidism as studied in rats. Crucial role of maternal thyroxine but not 3,5,3' triiodothyronine in the protection of the fetal brain. *J Clin Invest* 86: 889-899.

Cavallaro T, Martone RL, Dwork AJ, Schon EA, Herberr J (1990) The retinal pigment epithelium is the unique site of transthyretin synthesis in the rat eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 31:497.

Connolly WES, Deschênes J, Goldstein D, Rizzo L, Burnier Jr MN (1994) MHC CLASS I expresion in patients with myopia. ARVO abstracts. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35:1415-1422.

Contempré B, Jauniaux E, Calvo R, Jurkovic D, Campbell S, Morreale de Escobar G (1993) Detection of thyroid hormones in human embryonic cavities during the first trimester of pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 77:1719-1722.

VIII.-BIBLIOGRAFIA

Cook CS, Sulik KK (1986) Sequential scanning electron microscopic analyses of normal and spontaneously occurring abnormal ocular development in C57Bl/6J mice. *Scan Electron Microsc* 3:1215-1227.

Cook CB, Kakaeska I, Lechan RM, Koenig RJ (1992) Expression of thyroid hormone receptor β 2 in rat hypothalamus. *Endocrinology* 130:1077-1079.

Costaridis P, Horton C, Zeitlinger J, Holder N, Maden M (1996) Endogenous retinoids in the zebrafish embryo and adult. *Developmental Dynam* 205:41-51.

Cruz M (1988) Patología tiroidea. En *Tratado de Pediatría*. Espaxs ed. (España) Vol I pp. 852-866.

Damm K y Evans RM (1993) Identification of a domain required for oncogenic activity and transcriptional suppression by v-erbA and thyroid-hormone receptor α . *Proc Natl Acad Sci* 90:10.668-10.672.

Dang CV y Lee WMF (1989) Nuclear and nucleolar targeting sequences of c-ErbA, c-Myb, N-Myc, p53, HSP 70 and HIV TAT proteins. *J Biol Chem* 264:18.019-18.023.

De la Paz P, Barrio JP, Renau-Piqueras J (1986) A basic program for determination of numerical density of cytoplasmic compartments. II Analisis of elipsoid and cylindrical particles. *Comput Biol Med* 16:273-277.

Delange F, Camus M, Winkler M, Dodion J, Ermans AM (1976) Serum thyrotrophin determination on day 5 of life as screening procedure for congenital hypothyroidism. *Arch Dis Child* 52:89-96.

De Visscher M (ed) (1980) The thyroid gland. Raven Press New York.

Dobbing J, Sands J (1979) Comparative aspects of the brain growth spurt. *Early Hum Dev* 3:79-83.

Duester G (1994) Retinoids and the alcohol dehydrogenase gene family. En: Toward a molecular basis of alcohol use and abuse (Jansson B, Jörnvall H, Rydberg U, Terenius L, y Vallee BL eds.) Basel, Switzerland pp. 280-290.

Dussault JH, Ruel J (1987) Thyroid hormones and brain development. *Ann Rev Physiol* 49:321-334.

Dwork AJ, Cavallaro T, Martone RL, Goodman DS, Schon EA, Hervert J (1990) Distribution of transthyretin in the rat eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 31:489-496.

Eayrs JT (1968) Developmental relationship between brain and thyroid. En: *Endocrinology and human behavior* (R.P. Michael Ed.). London: Oxford University Press pp. 239-255.

Elliot J, Maltby EL, Reynolds B (1993) A case of delection 14 (q.22.1-q.22.3) associated with anophthalmia and pituitary abnormalities. *J Med Genet* 30:251-252.

Evans RM (1988) Steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 240:889-895.

Evans BI, Beck KE, Fernald RD (1994) Thyroxine effects on putative rod progenitor cells in the developing teleost retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35 (suppl): 1.512.

Fisher DA y Klein AH (1981) Thyroid development and disorders of thyroid function in the newborn. *N Engl J Med* 304:702-712.

Fitzgerald MJT, Fitzgerald M (1994 a) Initial differentiation of the germ layers. En: *Human Embryology*, Bailliere Tynhall ed. (London) pp. 28-32.

Fitzgerald MJT, Fitzgerald M (1994 b) Head and Neck: General features of brain development. En: *Human Embryology*, Bailliere Tynhall ed. (London) pp. 193-210.

Fondell JD, Roy AL, Roeder RG (1993) Unliganded thyroid hormone receptor inhibits formation of a functional preinitiation complex: Implications for active repression. *Genes and Dev* 7:1400-1410.

Forrest D, Hallböök F, Persson H, Vennström B (1991) Distinct functions for thyroid hormone receptors α and β in brain development indicated by differential expression of receptor genes. *EMBO J* 10:269-275.

Frieden E y Just JJ (1970) Hormonal responses in amphibian metamorphosis. *Biochemical Actions of Hormones*, Litwack G. (ed.), Academic Press, New York, pp 1-52.

Gaetano C, Matsumoto K, Thiele CJ (1991) Retinoic acid negatively regulates p34cdc2 expression during human neuroblastoma differentiation. *Cell Growth Differ* 2: 487-493.

Gamborino MJ, Hernandez-Yago J, Muñoz A, Renau-Piqueras J, Pinazo-Duran MD Analysis of maternal risk factors for craniofacial and eye development. Congenital-Neonatal hypothyroidism. *Int J Dev Biol* (en proceso de revisión).

Gamborino MJ, Hernandez-Yago J, Muñoz A, Pinazo-Durán MD (1998) ¿Afecta la disfunción tiroidea al desarrollo ocular?. *Arch Soc Oftalmol* 73:575-584.

Glass CK, Holloway JM (1990) Regulation of gene expression by the thyroid hormone receptor. *Biochem Biophys Acta* 1032:157-176.

Gottesfeld Z, Silverman P (1990) Developmental delays associated with prenatal alcohol exposure are reversed by thyroid hormone treatment. *Neurosci Letters* 109:42-47.

Götz W (1995) Transgenic models for eye malformations. *Ophthalmic Genet* 16:85-104

Goldberg Y, Glineur C, Gesquiere JC y cols (1988) Activation of protein kinase C or cAMP-dependent protein kinase increases phosphorylation of the c-erbA-encoded thyroid hormone receptor and of the v-erbA-encoded protein. *EMBO J* 7:2425-2433.

Green S, Kumar V, Theulaz I, Wahli W y Chambon P (1988) The n-terminal DNA-binding "zinc-finger" of the estrogen and glucocorticoid receptors determines target gene specificity. *EMBO J* 7:3037-3044.

Guyton AC (1985) Hormonas tiroideas. En *Tratado de fisiología médica*. Interamericana ed. (España) pp.1101-1108.

Hayek A, Maloof F, Crawford JD (1973) Thyrotropin behaviour in thyroid disorders of childhood. *Pediatr Res* 7:28-33.

Harto MA, Aviño JA, Rodriguez V, Serra I, Hernandez M, Menezo JL (1999) Clinical anophthalmos and orbital cyst. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus* 36:227-228.

Hodin RA, Lazar MA, Wintman BI, Darling DS, Koenig RJ, Larse PR, Moore DD, Chin WW (1989) Identification of a thyroid hormone receptor that is pituitary-specific. *Science* 244:76-79.

Horlein AJ, Naar AM, Heinzl T, Gloss B, Kurokawa R, Ryan A, Kamei Y, Soderstrom M, Glass CK, Rosenfeld MG (1995) Ligand-independent repression by the thyroid hormone and mediated by nuclear receptor co-repressor. *Nature* 377:397-404.

Huijmans DP, Lamers WK, Los JA, Strakee J (1986) Toward computerized morphometric facilities: a review of 58 software packages for computer-aided three dimensional reconstruction, quantification and picture generation parallel serial sections. *Anat Rec* 216:449-470.

Iborra FJ, Jackson D, Cook PR (2000) The path of RNA through nuclear pores: apparent entry from the sides into specialized pores. *J Cell Science* 113:291-302.

Iglesias T, Llanos S, López-Baraona M, Perez-Aranda A, Rodriguez-Peña A, Bernal J, Höhne A, Seliger B, Muñoz A (1994) C-erb A and v-erb A modulate growth and gene expression of a mouse glial precursor cell line. *Cell growth Differ* 5:697-704.

Iglesias T, Llanos S, López-Barahona M, Seliger B, Rodriguez-Peña A, Bernal J, Muñoz A. (1995) Induction of platelet-derived growth factor B/c-sis by the v-erb oncogene in glial cells. *Oncogene* 9:1-8.

Iñiguez MA, Rodriguez-Peña A, Ibarrola N, Aguilera M, Muñoz A, Bernal J (1993) Thyroid hormone regulation of RC3, a brain-specific gene encoding a protein kinase-c substrate. *Endocrinology* 133:467-473

Izumo S, Mahdavi V (1988) Thyroid hormone receptor α isoforms generated by alternative splicing differentially activate myosin HC gene transcription. *Nature* 334:539-542.

Jongbloed WL, Kalicharan D, Worst JGF (1993) The microscope in ophthalmological research. *Eur Microscopy Anal* 1:13-16. anophthalmos and orbital cyst. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus* 36:227-228.

Karnovsky MJ (1971) Use of ferrocyanide-reduced osmium tetroxide in electron microscopy. *J Cell Biol* 51:146

Kaufman MH (1992) The atlas of mouse development. (Harcourt, Brace and Jodanovich eds.) Academic Press Vol I pp. 393-407.

Klein RZ, Arnold MB, Bigos ST, Brink S, Brown J, Brown R, Brown T y cols. (1994) Correlation of cognitive test scores and adequacy of treatment in adolescents with congenital hypothyroidism. *J Pediatr* 124:383-387.

Koenig RJ, Lazar MA, Hodin RA, Brent GA, Larsen PR, Chin WW, Moore DD (1989) Inhibition of thyroid hormone action by a nonhormone binding *c-erbA* protein generated by alternative mRNA splicing. *Nature* 337:639-631.

Kurokawa R, Yu VC, Näär A, Kyakumoto S, Han Z, Silverman S, Rosenfeld MG, Glass CK (1993) Differential orientations of the DNA-binding domain and carboxy-terminal dimerization interface regulate binding site selection by nuclear heterodimers. *Genes Dev* 7:1423-1435.

VIII.-BIBLIOGRAFIA

Lammer EJ, Chen DT, Hoar RN (1985) Retinoic acid embryopathy. 313:837-841.

Lang GE, Naumann GOH (1991) Keratokonus bei Alagille Syndrom. Klin Monatsbl Augenheilk 198:555-557.

Lazar MA, Hodin RA, Darling DS, Chin WW (1988) Identification of a rat c-ErbA α -related protein which bind deoxyribunucleic acid but does not bind thyroid hormone. Mol Endocrinol 2:893-901.

Lazar MA, Hodin RA, Chin WW (1989) Human carboxi-terminal variant of α -type c-ErbA inhibits trans-activation by thyroid hormone receptors without binding thyroid hormone. Proc Natl Acad Sci USA 88:7771-7774.

Lazar MA (1993) Thyroid hormone receptors: multiple forms, multiple possibilities. Endocrine Rev 14:184-193.

Lazarus JH (1993) Treatment of hyperthyroidism and hypothyroidism in pregnancy. J Endocrinol Invest 16:391-402.

Lechan RM, Qi Y, Berrodin TJ, Davis KD, Schwartz HL, Strait KA (1993) Immunocytochemical delineation of thyroid hormone receptor β 2-like immunoreactivity in the rat central nervous system. Endocrinology 132:2461-2469.

Lee Y, Mahdavi V (1993) The D- domain of the thyroid hormone receptor-alpha 1 specifies positive and negative transcriptional regulation fuctions. J Biol Chem 268: 2021-2028.

Leonard JL (1990) Identification and structure analysis of triiodothyronine deioinases. Thyroid gland, Greer, MA (ed) Raven Press, New York pp 285-305.

Leung WM, Nathaniel VE, Nathaniel EJ (1992) A morphological and morphometric analysis of the optic nerve in the hypothyroid rat. Exp Neurol 117:51-58.

Levi-Montalcini R (1987) The nerve growth factor 35 years later. *Science* 237:1.154-1.162.

Lin KH, Ashizawa K, Cheng SY (1992) Phosphorylation stimulates transcriptional activity of human TR β 1 thyroid hormone receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:7737-7741.

Lopez-Baraona M, Miñano M, Mira E, Iglesias T, Stunnerberg H, Rodriguez-Peña A, Bernal J, Muñoz A (1994) Retinoic acid posttranscriptionally up-regulates proteolipid protein gene expression in C6 glioma cells. *J Biol Chem*

Lopez-Barahona M, Fialka I, González-Sancho JM, Asunción M, González M, Iglesias T, Bernal J, Beug H, Muñoz A (1996) Thyroid hormone regulates stromelysin expression, protease secretion and the morphogenetic potential of normal polarized mammary epithelial cells. *EMBO J* 14:1145-1155.

Mac Fault R, Grant DB (1977) Early detection of congenital hypothyroidism. *Arch Dis Child* 52:87-88.

Macaione S, Di Giorgio R, Nicotina P, Ientile R (1984) Retina maturation following administration of thyroxine in developing rats: Effects of polyamine metabolism and glutamate decarboxylase. *J Neurochem* 43:303-315.

Mc Brien NA, Moghadamm HO, Reeder AP (1993) Atropine reduces experimental myopia and eye enlargement via nonaccommodative mechanism. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34:205-215.

Mc Caffery P, Tempst P, Lara G, Drager UC (1991) Aldehyde dehydrogenase is a positional marker in the retina. *Development* 112:693-702.

McKinna AJ (1996) Quinine induced hypoplasia of the optic nerve. *Can J Ophthalmol* 1:261-266.

Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schütz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P, Evans RM (1995) The nuclear receptor superfamily: The second decade. *Cell* 83:835-839.

Mastaglia FL, Black JL, Collins DWK, Gutteridge DH, Yuen RWM (1978) Slowing of conduction in visual pathway in hypothyroidism. *Lancet* 1:387-388.

Mateos JM, Satorre J, Olea JL, Secades JR Vila J, Sevilla J, Laso E (1993) Orbitopatía distiroidea. Valoración y tratamiento. *Arch Soc Españ Oftalmol* 64: 409-416.

Matsuo T (1993) The genes involved in the morphogenesis of the eye. *Jpn J Ophthalmol* 37:215-251.

Mavilio F (1993) Regulation of vertebrate homeobox-containing genes by morphogens. *Eur J Biochem* 212:273-278.

Mellström B, Naranjo JR, Santos A, Gonzalez AM, Bernal J (1991) Independent expression of the a and b c-erb-A genes in developing rat brain. *Mol Endocrinol* 5:1339-1350.

Miller MT, Israel McKinna AJ (1996) Quinine induced hypoplasia of the optic nerve. *Can J J, Cultone J (1981)* Fetal alcohol syndrome. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus* 18:6-15

Mitsubishi TG, Tennyson GE, Nikodem VM (1988) Alternative splicing generates messages encoding rat c-ErbA proteins that do not bind thyroid hormone. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:5804-5808.

Morreale de Escobar G, Escobar del Rey F (1980) Brain damage and thyroid hormones. En: *Neonatal thyroid screening*. (G.N. Burrow y J.H. Dussault Eds.). New York Raven Press. pp. 25-50.

Morreale de Escobar G, Pastor R, Obregon MJ, Escobar del Rey (1985) Effects of maternal hypothyroidism on the weight and thyroid hormone content of rat embryonic tissues, before and after onset of fetal thyroid function. *Endocrinology* 5:1.890-1.900.

Morreale de Escobar G, Obregon MJ, Escobar del Rey F (1988) Transfer of thyroid hormones from the mother to the fetus. En: *Research in congenital hypothyroidism*. De-long F, Fischer DA y Gliener D. (eds.) Plenum Press New York 15-28.

Morreale de Escobar G, Calvo R, Obregon MJ, Escobar del Rey F (1990) Contribution of maternal thyroxine to fetal thyronine pools in normal rats near term. *Endocrinology* 126:2765-2767.

Morreale de Escobar G, Calvo R, Obregón MJ y Escobar del Rey F (1992) Homeostasis of brain T3 in rat fetuses and their mothers: effects of thyroid status and iodine deficiency. *Acta Med Aust* 19:110-116.

Morreale de Escobar G, Obregón MJ, Calvo R, Escobar del Rey F (1993) Effects of iodine deficiency on thyroid hormone metabolism and the brain in fetal rats: the role of the maternal transfer of thyroxin. *Am J Clin Nutr Suppl* 57:280S-285S.

Muñoz A, Zenke ND, Gehring U, Sap J, Beug H, Vennström B (1988) Characterization of the hormone-binding domain of the chicken c-ErbA/thyroid hormone receptor protein. *EMBO J* 7:155-159.

Muñoz A, Rodriguez-Peña A, Perez Castillo A, Ferreiro B, Sutcliffe G, Bernal J (1991) Effects of neonatal hypothyroidism on rat brain gene expression. *Mol Endocrinol* 5:273-280.

Muñoz A, Wrighton C, Seliger B, Bernal, Beug H (1993) Thyroid hormone receptor/c-erb A: control of commitment and differentiation in the neuronal/chromaffin progenitor line PC12. *J Cell Biol* 21:423-438.

Muñoz A y Bernal J (1997) Biological activities of thyroid hormone receptors. *E.J. Endocrinol* 137:433-445.

Nakao K, Ohba N, Otsuka S, Okubo A, Yanagita T, Hashimoto N, Arimuro H (1994) Uveítis asociada a HTLV-1 e hipertiroidismo. *Ophthalmology* 38:56-61.

Neigel M, Rootman J, Belkin RI, Nugent RA, Drance SM, Beattie CW, Spinelli JA (1988) Dysthyroid optic neuropathy. *Ophthalmology* 95:1515-1521.

Nicola NA (1994) Guidebook to cytokines and their receptors. Oxford University Press. Oxford .

Nishimura Y (1980) Determination of the developmental pattern of retinal ganglion cells in chick embryos by golgi impregnation and other methods. *Anat Embryol* 158: 329-347.

Nuckolls GH, Shum L, Slavkin HC (1999) Progress towards understanding craniofacial malformations. *Cleft Palate Craniof* 36:12-26

Nunez J (1984) Thyroid hormone synthesis, the mechanism of phenoxyether formation. *Methods in enzymol* 107:476-488.

Olmedo M, Muñoz JI, Rodriguez MJ, Carracedo A, Gómez-Ulla de Irazazábal FJ, Sánchez Salorio M (1993) Marcadores genético-moleculares en miopía. *Arch Soc Esp Oftalmol* 65:393-398.

Oppenheimer JH, Schwartz HL, Mariash CN, Kinlaw WB, Wong NCW, Freake HC (1987) Advances in our understanding of thyroid hormone action at the cellular level. *Endocr Rev* 8:288-308.

Oppenheimer JH, Schwartz HL, Strait KA (1994) Thyroid hormone action 1994: the plot thickens. *Eur J Endocrinol* 130:15-24.

Perez Castillo A, Bernal J, Ferreiro B, Pans T (1985) The early ontogenesis of thyroid hormone receptor in the rat fetus. *Endocrinology* 117:2457-2461.

VIII.-BIBLIOGRAFIA

Perez Moreiras JV (1995) Oftalmopatía tiroidea En: Monografías de la Sociedad Española de Oftalmología. (Ciba Vision y SEO eds.) Madrid.

Pinazo-Duran MD, Renau-Piqueras J, Guerri C (1992) Analisis morfométrico y estereológico de la macrogliogénesis y mielinogénesis en el nervio óptico de la rata Wistar. *St. Ophthalmol* 11:31-34.

Pinazo-Durán MD, Renau-Piqueras J, Guerri C (1993) Developmental changes in the optic nerve related to ethanol consumption in pregnant rats. *Teratology* 48:305-322.

Pinazo-Durán MD, Renau-Piqueras J, Guerri C (1994) Estudio ultraestructural de la gliogénesis, mielinización y desarrollo axonal en el nervio óptico de la rata. *Arch Soc Españ Oftalmol.* 67:13-19.

Pinazo-Durán MD, Lindros KO, Renau-Piqueras J, Iborra FJ (1995) Localización de la aldehído deshidrogenasa mitocondrial (ALDH 2) en la retina y coroides de la rata y su función en el catabolismo de productos de la peroxidación. *Arch Soc Españ Oftalmol* 69:441-450.

Pinazo-Duran MD, Gamborino MJ, Hernandez-Yago J, Muñoz A (1997) Desarrollo embrionario del macizo craneofacial y del globo ocular. Análisis a microscopía electrónica de barrido. *Arch Soc Esp Oftalmol* 72:817-828.

Pinazo-Durán MD, Sevilla E, Gamborino MJ, Bort A, García-Verdugo JM, Muñoz A (1999 a) Does thyroid hormone regulate the acquisition of retinal cell phenotypes? *Ophthalmic Res* 31:152 (abstr)

Pinazo-Durán MD, Azorín I, Salom J, Renau-Piqueras J, Iborra FJ (1999 b) Aproximación al estudio "in vivo" de los mecanismos de transcripción en la retina de la rata. *Arch Soc Esp Oftalmol* 74:631-638.

Ploem JS (1986) Applications of fluorescence in the biomedical sciences (Lansing Taylor D, Waggoner AS, Murpy RF, Lanni F, Birge RR eds.) Alan Liss New York 289-302.

VIII.-BIBLIOGRAFIA

Porterfield SP, Hendrich CE (1993) The role of thyroid hormones in prenatal and neonatal neurological development. Current perspectives. *Endocrine Rev* 14:94-106.

Portoles M, Sanchis R, Guerri C (1988) Thyroid hormone levels in rats exposed to alcohol during development. *Horm Metab Res* 20:267-270

Prada C, Puelles L, Génis-Galvez JM (1981) A golgi study on the early sequence of differentiation of ganglion cells in the chick embryo retina. *Anat Embryol* 161:305-317.

Prada C, Puga G, Perez-Mendez L, Lopez TR, Ramirez G (1991) Spatial and temporal patterns of neurogenesis in the chick retina. *Eur J Neurosci* 3:559-569.

Prati M, Calvo R, Morreale de Escobar G (1992) L-thyroxine and 3,5,3'-triiodothyronine concentrations in the chicken egg and in the embryo before and after the onset of thyroid function. *Endocrinol* 130:2651-2659.

Quiring R, Walldorf Y, Kloter U, Gehring WJ (1995) Homology of the eyeless gene of drosophila to the small eye gene in mice and aniridia in humans. *Science* 265:785-789.

Rada JA, Matthews AL (1994) Visual deprivation upregulates extracellular matrix synthesis by chick scleral chondrocytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35:2436-2447.

Raiti S, Newns GH (1971) Cretinism: early diagnosis and its relation to mental prognosis. *Arch Dis Childhood* 46:692-694.

Ramirez JM, Triviño A, Ramirez AI, Salazar JJ, García-Sánchez J (1994) Immunohistochemical study of human retinal astroglia. *Vision Res* 34:1935-1946.

Reichenbach A, Schnitzer A, Friedrich W, Ziegert G, Brückner G, Schober W (1991) Development of the rabbit retina. Size of eye and retina and postnatal cell proliferation. *Anat Embriol* 183:287-297.

Rentoumis A, Krishna V, Chatterjee K, Madison LD, Datta S, Gallagher DG, De-groot LJ, Jameson JL (1990) Negative and positive transcriptional regulation by thyroid hormone receptors isoforms. *Mol Endocrinol* 4:1522-1531.

Ribeiro RCJ, Kushner PJ, Apriletti JN, West BL y Baxter JD (1992) Thyroid hormone alters in vitro DNA binding of monomers and dimers of thyroid hormone receptors. *Mol Endocrinol* 6:1142-1152.

Rosen E, O'Donnell AL, Koenig RJ (1991) Protein-protein interactions involving erbA superfamily receptors: through the TRAP door. *Mol Cell Biol* 78:C83-C88.

Ruiz-Marcos A, Sanchez-Toscano F, Escobar del Rey F, Morreale de Escobar G (1980) Reversible morphological alterations of cortical neurons in juvenile and adult hypothyroidism in the rat. *Brain Res* 185:91-102.

Samuels HH (1983) Identification and characterization of thyroid hormone receptors and action using cell cultures techniques. En: Oppenheimer JH, Samuels HH (eds.). *Molecular Basis of Thyroid Hormone Action*. Academic Press, New York pp.35-65.

Sap J, Muñoz A, Damm K, Goldberg Y, Ghysdael J, Leutz A, Beug H, Vennström B (1986) The c-erbA protein is a high affinity receptor for thyroid hormone. *Nature* 324: 635-640.

Sarlieve L, Bernard F, Labourdette G, Yusta B, Pascual A, Luo M y cols. (1989) Investigation of myelogenesis in vivo: transient expression of triiodothyronine nuclear receptors in secondary cultures of pure rat oligodendrocytes. En: *Iodine and the brain* (R.G. Delong, J Robbins, P.G. Condliffe, Eds.). New York Academic Press 113-130.

Saude T (1993). Embriology En: *Ocular Anatomy and Physiology*. Blackwell Scientific Publications (Oxford) pp. 151-161.

Schaffel F, Glasser A, Howland HC (1988) Accommodation refractive error and eye growth in chickens. *Vision Res* 28:639-657.

VIII.-BIBLIOGRAFIA

Schumm (1997) Core concepts in clinical molecular biology. Lippincott-Raven Publishers. New York.

Schwartz HL, Strait KA, Ling NC, Oppenheimer JH (1991) Quantitation of rat tissue thyroid hormone binding receptor isoforms by immunoprecipitation of nuclear triiodothyronine binding capacity. *J. Biol Chem* 267:11794-11799.

Schwartz HL, Lazar MA, Oppenheimer JH (1994) Widespread distribution of immunoreactive thyroid hormone β 2 receptor (TR β 2) in the nuclei of extrapituitary rat tissues. *J Biol Chem* 269:24777-24782.

Sevilla E, Gamborino MJ, Bort AR, Garcia-Verdugo JM, Muñoz A, Pinazo-Durán MD (2000) Regulación por hormona tiroidea de la organización citoarquitectural de la retina. *Rev Neurol* 30:248 (abst)

Shapiro S (1968) Some physiological biochemical and behavioral consequences of neonatal hormone administration, cortisol and thyroxine. *Gen Comp Endocrinol* 10:214-220.

Shawlot W, Behringer RR (1995) Requirement for Lim 1 in head-organizer function. *Nature* 375:425-430.

Shin YF, Fitzgerald MEC, Reyner A (1994) The effects of choroidal or ciliary nerve transection on myopic eye growth induced by goggles. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35:3691-3701

Sidney HI (1989) Enfermedades tiroideas. En Harrison : Principios de Medicina Interna. Interamericana ed (Mexico). Vol II pp. 2116-2138.

Silva JE, Leonard JL, Crantz FR, Larsen PR (1982) Evidence for two tissue-specific pathways for in vivo thyroxine 5'-deiodination in the rat. *J Clin Invest* 69:1176-1184.

Silva Araujo A, Salgado-Borges J, Cardoso V, Silva MC, Castro-Correia T, Tavares MA (1993) Changes in the retinal ganglion cell layer and optic nerve of rats exposed neonatally to cocaine. *Exp Eye Res* 56:199-206.

Sjoberg M, Vennstrom B, Forrest D (1992) Thyroid hormone receptors in chick retinal development: differential expression of mRNAs for a and N-terminal variant α and N-terminal variant β receptors. *Development* 114:39-47.

Slack JMW (1994) Inducing factors in *Xenopus* early embryos. *Curr Biol* 4:116-126.

Smith V (1976) Desarrollo de los órganos de los sentidos. En *Anatomía Humana*. FACTA ed.(España) Vol I pp. 181-186.

Smith EL, Maguire GW, Watson JT (1980) Axial lengths and refractive errors in kittens reared with and optically induced anisometropia. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 19:1.250-1.255.

Smith KD, Tevaarwerk GJM, Allen LH (1992) Reversal of poorly controlled glaucoma on diagnosis and treatment of hypothyroidism. *Can J Ophthalmol* 27:345-347.

Stein SA, McIntire DD, Kirkpatrick LL, Adams PM, Brady ST (1991) Hypothyroidism selectively reduces the rate and amount of transport for specific SCb proteins in the hyt/hyt mouse optic nerve. *J Neurosci Res* 30: 28-41.

Stein SA, Oates EL, Hall CR, Grumbles RM, Fernandez LM, Taylor NA y cols. (1994) Identification of a point mutation in the thyrotropin receptor of the hyt/hyt hypothyroid mouse. *Mol Endocrinol* 8:129-138.

Strömland K (1985) Ocular abnormalities in the fetal alcohol syndrome. *Acta Ophthalmol* 63 (supl):171 1:261-266.

Strömland K, Miller MT, Cook C (1991) Ocular teratology. *Surv Ophthalmol* 75:429-446.

VIII.-BIBLIOGRAFIA

Strömmland K y Pinazo-Durán MD (1994) Optic nerve hypoplasia: Comparative effects in children and rats exposed to alcohol during pregnancy. *Teratology* 50:100-111

Sulik KK, Cook Cs, Webster WE (1988) Teratogens and craniofacial malformations: relationships to cell death. *Development* 103:213-231.

Sweeney LJ (1998) Basic concepts in embryology. (Mc Graw-Hill eds) New York.

Thompson CC, Evans RM (1989) Trans-activation by thyroid hormone receptors: Functional parallels with steroid hormone receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:3494-3498.

Tilton RG, Pugliese G, Chang K, Speedy A, Province MA, Kilo C y cols. (1989) Effects of hypothyroidism on vascular ¹²⁵I albumin permeation and blood flow in rats. *Metabolism* 38:471-478.

Tong G, Jeyakumar M, Tanen MR, Bagchi MK (1996) Transcriptional silencing by unliganded thyroid hormone receptor β requires a soluble corepressor that interacts with the ligand-binding domain of the receptor. *Mol Cell Biol* 16:1909-1920.

Triviño A, Ramirez JM, Ramirez AI, Salazar JJ, Garcia Sanchez J (1997) Comparative study of astrocytes in human and rabbit retinae. *Vision Res* 37:1707-1711.

Triviño A, Ramirez JM, Salazar JJ, Ramirez AI (2000) Human retinal astroglia. A comparative study of adult and the 18 month postnatal developmental stage. *J Anat* 196:61-70.

Uchihara T, Kondo H, Akiyama H, Ikeda K (1995) Single laser three color immunolabeling of a histological section by laser scanning microscopy: Application to senile plaque related structures in post-mortem human brain tissue. *J Histochem Cytochem* 43:103-106.

Valcavi R, Dieguez C, Zini M, Muruais C, Casanueva F, Portioli I (1993) Influence of hyperthyroidism on growth hormone secretion. *Clin Endocrinol* 38:515-522.

Walker P, Weichsel ME Jr, Fisher DA, Guo SM, Fisher DA (1979) Thyroxine increases nerve growth factor concentration in adult mouse brain. *Science* 204:427-429.

Wall JR y How J (1990) Graves' Ophthalmopathy. En: *Current issues in endocrinology and metabolism* (Wall y How eds.). Blackwell scientific publications. Oxford . pp 1-196.

Wallman J, Turkel J, Trachtman J (1978) Extreme myopia produced by modest changes in early visual experience. *Science* 201:1249-1251.

Wallman J, Gottlieb MD, Rajaram V, Fugate-Wetzel LA (1987) Local regional regions control local eye growth and myopia. *Science* 237:73-77.

Waterman RE (1974) Embryonic and fetal tissues of vertebrates En: *Principles and techniques of scanning electron microscopy. Biological applications;* (Hayat M.A. Ed.). pp. 93-110.

Wedden SE (1987) Epithelial-mesenchymal interactions in the development of chick facial primordia and the target of retinoid action. *Development* 99:341-351.

Weinberger C, Thompson CC, Ong ES, Lebo R, Gruol DJ, Evans RM (1986) The *erbA* gene encodes a thyroid hormone receptor. *Nature* 324:641-646.

Wickman MG, Worthen DM (1974) Scanning and transmission electron microscopy of single tissue specimens. En: *Principles and techniques of scanning electron microscopy. Biological Applications* (Hazat ML ed.) Vol 2 pp. 60-71.

Williams PL y Warwick R (1985) Glándula tiroides. En *Gray Anatomía*. Salvat ed. (España) Vol II pp 1588-1592.

VIII.-BIBLIOGRAFIA

Yen PM, Sugawara A, Chin WW (1992a) Triiodothyronine (T3) differentially affects T3-receptor/retinoic acid receptor and T3-receptor/retinoic X receptor heterodimer binding to DNA. *J Biol Chem* 267:23248-23252.

Yen PM, Darling DS, Carter RL, Forgione M, Umera PK, Chin WW (1992b) Triiodothyronine (T3) decreases binding to DNA by T3-receptor homodimers but non receptor-auxiliary protein heterodimers. *J Biol Chem* 267:3565-3568.

Yen PM, Chin WW (1994) New advances in understanding the molecular mechanisms of thyroid hormone action. *TEM* 5:65-72.

Yoshida A, Hsu L C, Dave V (1992) Retinal oxidation activity and biological role of human cytosolic aldehyde dehydrogenase. *Enzyme* 46:239-244.

Yusta B, Besnard F, Ortiz Caro J, Pascual A, Aranda A, Sarliewe L (1988) Evidence for the presence of nuclear triiodothyronine receptors in secondary cultures of pure rat oligodendrocytes. *Endocrinology* 122:2278-2284.

Zimatkin SM, Rout UK, Koivusalo M, Buhler R, Lindros KO (1992) Regional distribution of Low-Km Mitochondrial aldehyde dehydrogenase in the rat central nervous system. *Alcoholism Clin Exp Res* 16:1.162-1.167.

Zimmerman RP, Polley HEH, Fortney R (1988) Cell birthdays and and rate of differentiation of ganglion and horizontal cells of the developing cats retina *J Comp Neurol* 274:77-90.