

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS MORFOLOGICAS

ANALISIS MORFOMETRICO DE LAS ALTERACIONES OVARICAS
PRODUCIDAS TRAS LA ADMINISTRACION EMBRIONARIA DEL 4-PROPIL-
2-TIOURACILO EN GALLUS DOMESTICUS.

Memoria presentada en la
Facultad de Medicina de
Granada, para aspirar al
grado de Doctor, por:
Inmaculada Torres Torres.

Granada a cuatro de
Mayo de mil novecientos
noventa y dos.

UNIVERSIDAD DE GRANADA

ACTA DEL GRADO DE DOCTOR EN Medicina

Curso de 1991 a 1992

Folio 132 vto

Número 264

Reunido en el día de la fecha el Tribunal nombrado para el Grado de Doctor por D.^a Inmaculada Torres Torres, el aspirante leyó un discurso sobre el siguiente tema, que libremente había elegido: Análisis morfométrico de las alteraciones producidas tras la administración embriónica del 4-propil-2-tioracilo en gallus domesticus.

Terminada la lectura y contestadas las objeciones formuladas por los jueces del Tribunal, este le calificó de Apt. Cum laude por unanimidad

Granada 12 de Junio de 1992

EL PRESIDENTE,

El Secretario del Tribunal,

Fdo.: Juan de Dios García Soreiro

Fdo.: Francisco Revelles Marín

EL VOCAL,

EL VOCAL,

EL VOCAL,

Fdo.: A.ª TERESA PATUAC

Fdo.: Rafael Cuervo García-Valdovinos

Fdo.: _____

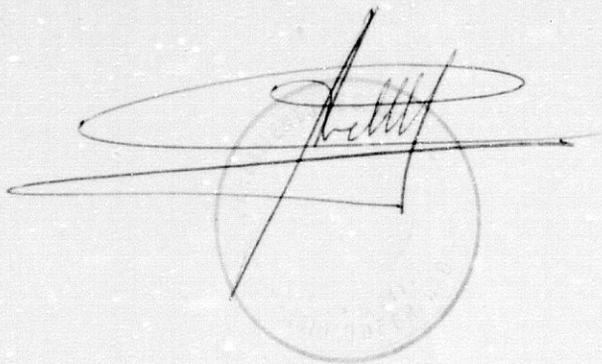
FIRMA DEL GRADUANDO,

Inmaculada Torres

JOSE ARCADIO RODA MORENO, CATEDRATICO DE ANATOMIA DEL
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS MORFOLOGICAS DE LA FACULTAD DE
MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA.

CERTIFICA: Que Doña Inmaculada Torres Torres, Licenciada en
Medicina y Cirugía, ha realizado bajo mi dirección el
Trabajo de investigación correspondiente a su Tesis
Doctoral "ANALISIS MORFOMETRICO DE LAS ALTERACIONES
OVARICAS PRODUCIDAS TRAS LA ADMINISTRACION EMBRIONARIA DEL
4-PROPIL-2-TIOURACILO EN GALLUS DOMESTICUS". La cual reúne
las condiciones necesarias para su presentación.

Y para que conste, en cumplimiento
de las disposiciones vigentes, expido el presente en
GRANADA, a 4 de Mayo de 1992.

A handwritten signature in dark ink is written over a circular stamp. The signature is stylized and appears to be 'J. Roda Moreno'. The stamp is faint and circular, with some illegible text inside.

AGRADECIMIENTOS

Mi más sincero agradecimiento a todos los miembros de la sección de MICROSCOPIA ELECTRONICA del departamento de Ciencias Morfológicas de esta Facultad, por su inestimable colaboración y ayuda en el aprendizaje de todos conocimientos y técnicas necesarias para el desarrollo de esta tesis doctoral.

A mi hijo Pedro

INDICE

INTRODUCCION.....	1
MATERIAL Y METODOS.....	35
RESULTADOS OBTENIDOS.....	69
DISCUSION Y COMENTARIOS.....	143
CONCLUSIONES.....	160
BIBLIOGRAFIA.....	163

INTRODUCCION

EL período embrionario constituye uno de los momentos biológicos que posee mayor dinamismo, caracterizándose por los estados iniciales de crecimiento gobernados a nivel celular, así como por hechos morfogénéticos determinados por procesos inductivos secuenciales, que marcan el diseño del embrión temprano. En estas fases imprecisas del desarrollo, la actividad funcional de los órganos y la capacidad defensiva del nuevo ser no está organizada, y por ello este se encuentra en la fase de mayor sensibilidad a los agentes externos y por tanto a tener una posibilidad mayor de padecer una dismorfogénesis.

En estas circunstancias, cualquier sustancia

(medicamento) administrada a la madre, fundamentalmente en estos momentos tan comprometidos de la embriogénesis, puede ocasionar alteraciones, a veces irreversibles, de su normal organización biológica.

A finales del siglo XIX y principios del XX se tenía la impresión de que las sustancias medicamentosas, administradas a las gestantes, no podían ocasionar acción teratógena alguna al embrión ó feto, ya que, dichas sustancias, no podían alcanzar a éstos, debido a la bien desarrollada protección materna. Sin embargo, años después ha podido ser demostrado, que el papel protector de la placenta, no es más que un mito (APGAR, 1.964).

Uno de los primeros informes conocidos, referentes a teratogenicidad experimental inducida por productos químicos, fué publicado en 1.909 por LEHNERDT. Posteriormente, muchas investigaciones comprobaron que prácticamente, todas las sustancias químicas ensayadas daban lugar a malformaciones congénitas, y que la aparición e intensidad de las mismas dependían del momento en que el compuesto químico sorprendía al embrión, así como de la dosis y tiempo de duración del contacto que dicha sustancia había tenido con los tejidos embrionarios ó fetales.

Todo ello ha hecho, que un gran número de investigadores hayan centrado su atención sobre el tema de la posible acción teratogénica que diversas sustancias medicamentosas ejercen sobre las fases de embriogénesis, así también como la acción negativa que pueden ejercer sobre el embrión las disfunciones hormonales de las gestantes o la medicación correctora administrada a las mismas.

No obstante lo cual, tenemos que hacer constar que, desgraciadamente, las conclusiones de los estudios teratogénicos inducidos en animales de experimentación, al igual que otros efectos tóxicos, no son extrapolables al 100% en el ser humano, aunque también es cierto que supone el único punto de partida para el estudio de la teratogenicidad.

Nosotros, en el presente trabajo, centramos nuestra atención en el papel que ejerce la hormona tiroidea en el contexto morfofuncional y desarrollo del nuevo ser. Resulta a todas luces innecesario hacer un análisis exhaustivo de la importancia que ejerce la hormona secretada por el tiroides en el normal desarrollo del individuo, tanto en sus fases embrionaria ó fetal, como en la culminación morfofuncional durante la niñez.

Las disfunciones hormonales de las gestantes pueden también interferir el desarrollo normal del embrión. Tal es el caso de las mujeres hipotiroideas ó lo que resulta semejante, pacientes hipertiroideas a las que hay que corregir su disfunción administrándoles drogas antitiroideas, las cuales, tras atravesar la placenta, frenan el normal desarrollo y funcionalidad del tiroides embrionario ó fetal.

El papel que ejerce la tiroxina en la histogénesis, tanto de la organización ósea como muscular, su correlación con otras sustancias del complejo endocrino, así como su imprescindible acción sobre la normal organización estructural del SNC, y su conocida importancia en la adquisición de un adecuado desarrollo mental, es un hecho, por todos conocido y aceptado.

Una amplia bibliografía corrobora todo lo anteriormente expuesto, tanto desde el punto de vista clínico como experimental.

En el mundo clínico, desde hace medio siglo, se conoce que la hormona tiroidea es imprescindible para el desarrollo y maduración del SNC. Así, por ejemplo, los niños de madres hipotiroideas presentaban síntomas que van

desde el retraso corporal hasta anomalías en la constitución y maduración del SNC. Todo ello ha hecho que se hagan estudios clínicos en aquellas regiones donde se instauró un bocio endémico. Pero el intento terapéutico para corregir las alteraciones producidas por la deficiencia tiroidea, si bien han resultado satisfactorias a la corrección del retraso corporal no podemos decir lo mismo en lo que se refiere a la restauración morfofuncional del SNC (**TUSQUES, 1.956**).

Experimentalmente se ha demostrado que la hormona tiroidea no solo es imprescindible en la diferenciación y maduración tisular del Sistema Nervioso, sino también resulta tener un papel importantísimo en diversos procesos metabólicos (**TATA, 1.962-1.963**). Según este autor la hormona tiroidea crea un gradiente dinámico para la entrada de hormonas en los tejidos, llegando incluso, tras la disfunción de la misma, a ocasionar trastornos en el aspecto funcional de las membranas. Otra acción que ejerce la hormona tiroidea es la de activar la incorporación de aminoácidos de las proteínas, servir de acelerador en el desarrollo postnatal a la actividad enzimática del cerebro (**GRAVE, 1.973**), y estimular la síntesis del N.G.F.

(nerve growth factor) (WALKER, 1.979), provocando un aumento de la concentración del mismo y, consiguientemente, activando la maduración y el mantenimiento de neuronas adrenérgicas en el encéfalo.

Podemos decir que la acción de la tiroxina sobre el S.N.C. es bien patente. Así, por ejemplo, su presencia favorece la mielinización en los cultivos de neuronas de cerebelo (HAMBURG, 1.964 ; VAN WISBERGHE, 1.978 ; PASQUINI, 1.981). Favorece la actividad mitótica de las neuronas (FERGUSON, 1.966), ejerce una acción específica sobre la maduración fundamentalmente de las células de Purkinje (TUSQUES, 1.967).

Experimentalmente también se ha demostrado que la hormona tiroidea está implicada en el desarrollo de un amplio espectro bioquímico, fisiológico, y anatómico. Así, actúa favoreciendo la maduración de las células de Purkinje y la diferenciación de los distintos estratos del cortex cerebeloso, la formación de espinas dendríticas en el cortex visual en ratas (SHAPIRO, 1.973), y la regulación de la mielogénesis (FARROQUI, 1.977).

Los estados de hipotiroidismo provocados

experimentalmente por radiotiroidectomía han puesto de manifiesto una disminución sustancial en la actividad metabólica de la enzima succinato-deshidrogenasa en el cortex frontal del cerebro, y una menor depresión de la colinesterasa (**HAMBURG, 1.957**). Del mismo modo se ha encontrado que la tiroidectomía produce en el cerebelo una disminución significativa de las enzimas: SDH, GAD, GABAT y ATPasa (**GARCIA ARGAIZ, 1.967**).

Otras alteraciones metabólicas, causadas por el hipotiroidismo provocado, fueron una disminución en la velocidad de desaparición de los aminoácidos libres del plasma del cerebro (**GEEL, 1.967**), así como un aumento significativo de ADN en el cortex cerebral de la rata (**PASQUINI, 1.967**).

Alteraciones morfoestructurales han sido encontradas ámpliamente en animales tiroidectomizados, con especial significación en el tejido nervioso. **LEGRAND** (1.961;1.963) encuentra que la deprivación tiroidea ocasiona que la capa granular externa cerebelosa de la rata permanezca fetal, así como un retraso en la migración de los granos, inmadurez de las células de Purkinje en la organización de su arborización dendrítica.

Experiencias realizadas con drogas antitiroideas, administradas al embrión de pollo, han puesto en evidencia que provocan en estos un claro retraso de la eclosión (GROSSOWICZ, 1.946 ; ADAMS, 1.949 ; VIDAL, 1.952 ; ROMANOFF, 1.956 ; WISHART, 1.977 y RODA, 1.981a). Este hecho siempre ha ido acompañado de un retraso de la retracción del saco vitelino, hipertrofia e hiperplasia de la glándula tiroides y aumento en el peso de los adrenes y testículos.

Asímismo, se encuentran alteraciones en el peso del encéfalo y anomalías en la constitución laminar y cisuración del cerebelo (RODA, 1.981b y 1.982). Otros datos de los efectos importantes que ocasionan las drogas antitiroideas, fundamentalmente el PTU, cuando se administra en períodos tempranos del desarrollo, es la disminución del peso corporal, retraso en el tamaño de los miembros (ANDREWS, 1.945 ; MORLEY, 1.949 ; ROGLER, 1.959 ; MYANT, 1.966 ; KING, 1.974 ; LIPPE, 1.977 ; RODA, 1979 y 1.981). También se encuentran alteraciones en diferentes órganos con aumento de peso del tiroides (ADAMS, 1.951), atrofia adrenal y tiroidea (LAZO, 1.960 ; MARKS, 1.973), inhibición de la capacidad de regeneración de células hepáticas (GIRKIN, 1.961), disminución de la

captación de I^{131} por el tiroides (TANABE, 1.965) y retraso en el crecimiento epitelial (MASTERSON, 1.975).

Finalmente y de forma general podemos decir también que la hormona tiroidea ejerce su acción sobre otros diferentes órganos y sistemas, como lo demuestran los datos bibliográficos por nosotros consultados (TATA, 1.963 ; RASCIO, 1.967 ; FREEDLAND, 1.969 ; TOMMES, 1.977). Por lo que se refiere al crecimiento esquelético, la tiroxina también ejerce una acción estimuladora de la proliferación de osteoblastos y condroblastos, es decir, incrementa la osteogénesis y condrogénesis, la reabsorción del cartílago y la osificación endondral (BECKS, 1.946 ; EAYRS, 1.951 ; LEVAY, 1.969 ; MEGIAS, 1.988 ; RODA, 1.989).

Clínicamente se ha puesto de manifiesto que la hormona tiroidea es imprescindible, así mismo, para un normal desarrollo y función sexual. El hipertiroidismo puede ocasionar disminución de la libido e infertilidad. En mujeres hipertiroides es frecuente la presencia de trastornos de la menstruación (oligomenorrea y menorreas) de forma más esporádica se han podido detectar menos ó metrorragias (HERRERA-POMBO, 1.969). Esto parece demostrar que el incremento de hormona tiroidea

disminuye la respuesta ovárica a las gonadotropinas. En 1.975, **CHOPRA** encontró que en un 30% aproximadamente de los hombres que padecen hipertiroidismo presentaban ginecomastia; el estudio analítico de estos individuos muestra concentraciones mayores de lo normal en suero 17- β -estradiol, testosterona y LH, así como, elevadas concentraciones de hormona sexual unida a globulina (**BAGNASCO, 1.982**).

En los casos en que los individuos padecen hipotiroidismo se ha encontrado hipogonadismo, defecto en la producción de LH, presentando ciclos anovulatorios que conducen a la esterilidad, acompañados de meno ó metrorragias, pubertad precoz (**HERRERA-POMBO, 1.969**), infertilidad e impotencia en el hombre (**WORTMAN, 1.987**), etc.

Se ha podido observar que la hormona tiroidea modula la respuesta pituitaria a la GnRH para la LH, solamente, en pacientes hipertiroides de ambos sexos (**VALENTI, 1.977**). Los efectos de la hormona tiroidea sobre los ovarios es significativa en cuanto al aumento del peso del órgano y las mitosis de los ovocitos, pero no respecto a otros parámetros (**CSABA, 1.980**).

Experimentalmente se ha visto que la acción que ejerce la gonadotropina sobre el ovario izquierdo de pollo recién nacido es mayor que la que ejerce la TSH; dicha acción se manifiesta por el aumento del número de células de la capa granular (**SHAHIN, 1.980**).

Estudios realizados de la proteína transportadora de las hormonas sexuales (ShBG), en sujetos normales y en enfermos con hipo ó hiperfunción tiroidea (**ABELLA-PEREZ, 1.981**), han dado como conclusión que la glándula tiroidea juega un papel importante en el mantenimiento de los valores de ShBG en plasma y que la hiper ó hipofunción del tiroides se manifiesta, en el 100% de los casos, por la existencia de valores bajos o altos respectivamente, en la tasa de la proteína transportadora de hormonas sexuales.

Las hormonas gonadotrópicas (LH y FSH) tienen una relación química con la hormona tirotrópica TSH, ya que, ambas poseen igual subunidad α y difieren sólo en la subunidad β . Se ha visto en pollos recién eclosionados que la TSH y las gonadotropinas promueven el desarrollo gonadal (**SHAHIN, 1.982 y 1.985**). Se ha podido observar que la administración de una simple dosis de gonadotropinas o TSH administradas al embrión de pollo en los días 12 a 15

de incubación provocaban una aceleración del desarrollo gonadal, incrementando el número de espermatogonias y células de Sertoly en los cordones seminíferos y el número de células granulares en folículo ovárico. Parece ser que el efecto similar de ambas hormonas sobre el desarrollo de las gónadas masculina ó femenina se debe a que poseen estructura química similar, y por lo tanto, pueden sustituirse una a otra.

Las moléculas de TSH y las gonadotropinas tienen también un claro efecto sobre el peso de los testículos, así como en el diámetro y estructura de los tubos seminíferos.

Se ha estudiado el paso de las hormonas tiroideas maternas hacia el feto a través de la placenta en mamíferos, y se ha podido observar que la placenta (humana y de rata) contiene en su interior cadenas con actividad desiodinasa (PT₄asa) para la T₃ y T₄. Su actividad hace decrecer el paso de T₃ y T₄ a través de la barrera placentaria y, por lo tanto, influye activamente en la circulación fetal de la hormona tiroidea (FAY, 1.984).

Por lo visto anteriormente, de forma general, una

buena función tiroidea es imprescindible para el normal desarrollo y maduración del organismo. Dentro de este contexto, centramos nuestra atención en aquellas alteraciones que experimentan las personas que padecen disfunciones tiroideas en el campo del desarrollo, maduración y función de los órganos sexuales, tanto masculinos como femeninos. Los datos que nos suministra la clínica respecto a la imprescindible acción que ejerce la hormona tiroidea con relación a los órganos sexuales, los podemos agrupar en los dos tipos de disfunción siguiente: hipertiroidismo e hipotiroidismo. No obstante, existen alteraciones tiroideas subclínicas que, de forma temporal pueden motivar en la gestante un estado transitorio de hipotiroidismo que va a ser detectado tras una analítica convencional de la actividad funcional tiroidea, de duración aproximada de $8,5 \pm 2,4$ semanas de gestación, para regresar después a la normalidad $17,9 \pm 7,1$ semanas (KAMIJO, 1.990). Por fortuna, este posible hipotiroidismo de Hasimoto que padece la mujer embarazada, transitoriamente, no repercute por los datos que conocemos, en alteración alguna fetal.

Una hiperfunción tiroidea, entre otros datos clínicos, se hace patente porque los individuos presentan disminuida su libido y la fertilidad. Aparte de ello, las

mujeres padecen trastornos de la menstruación, sobre todo oligomenorrea y períodos amenorréicos y, de forma más ó menos esporádica, se han podido detectar meno ó metrorragias. Todo ello parece demostrar que el aumento de hormona tiroidea frena la respuesta ovárica a la gonadotropina.

En hombres hipertiroideos, se ha detectado, además, un volumen testicular normal y algunas veces presencia de ginecomastia. El contenido de esperma era generalmente bajo, lo que indica un fallo en la actividad funcional de las células de Leydig y, por tanto, una alteración de la espermatogénesis (KIDD, 1.979). Encontrándose un aumento en los niveles serológicos de hormonas sexuales unidas a globulinas (RIDWAY, 1.989).

El aumento de hormona tiroidea parece hacer, a la pituitaria gonadotrófica, hipersensitiva al factor estimulante de la gonadotropina exógena (ROJDMARK, 1.988), ello explicaría el hecho de que, en pacientes tirotóxicos, las células de Leydig respondan de manera más precisa al factor estimulante de la gonadotropina exógena.

Por lo que se refiere a los estados de

hipotiroidismo, aunque todavía no es conocido el grado de severidad de la deficiencia tiroidea materna para que pueda causar daño en el cerebro fetal, se conoce, sin embargo, que el índice de hipofunción tiroidea es suficientemente alto, especialmente en embarazadas, lo que demanda la consiguiente investigación del desarrollo mental de la descendencia de dichas mujeres para practicar el efecto terapéutico oportuno (KLEIN, 1.991).

Una de las alteraciones que se han podido detectar clínicamente, consecutivas a un hipotiroidismo, es un caso de ambigüedad genital en una chica de trece años con hipotiroidismo primario (RAMAYYA, 1.982). El cual iba acompañado de retraso del crecimiento somático, piel enrojecida, presentando además, dificultad para el aprendizaje. Sometida a terapia tiroidea regresaron a la normalidad todos sus síntomas e incluso, nueve semanas después del inicio del tratamiento, presentó su menarquia.

LEE (1.974), presenta un caso de una joven hipotiroidea que mostraba precocidad sexual y un aumento en suero de TSH. Al volver a la normalidad los niveles de TSH, tras opoterapia tiroidea, regresó también la precocidad sexual. Ello sugiere que el mecanismo de precocidad sexual

que se presenta en algunos casos de hipotiroidismo resulta todavía oscuro, siendo al parecer resultado de un aumento de LH y FSH. El aumento de la secreción de gonadotropinas acontece cuando el hipotiroidismo y la hipersecreción de TSH son muy marcadas, y no retornan a su nivel basal, hasta tanto no lo haya hecho la TSH.

Datos clínicos referentes a precocidad sexual han sido encontrados en la investigación clínica por diversos autores . Así, **HEMADY** (1.978), en un estudio realizado en jóvenes que presentaban hipotiroidismo, acompañado de precocidad sexual, la TSH y la PRL (Prolactina), estaban elevadas en todos los casos. Otros casos de precocidad sexual han ido asociados a ovarios multiquísticos en niñas hipotiroideas primarias (**LINDSAY, 1.980**). También la precocidad sexual acompañada de galactorrea y quiste ovárico han sido síntomas acompañantes de estados hipotiroideos (**EVERS, 1.981**), dichos síntomas han regresado en parte con el tratamiento tiroideo adecuado, e incluso, disminuyendo considerablemente el volumen del quiste. Hay evidencia de que la pubertad precoz aparecida en el hipotiroidismo juvenil, puede ser el resultado de una hipersecreción de prolactina.

Otro dato a favor de esta influencia entre tiroides y gónadas nos la ofrece en la clínica el estruma ovárico que contiene tejido glandular, sebáceo, dentario y tiroideo, que a veces, puede incluso cursar con una hipersecreción de hormona tiroidea y con un auténtico hipertiroidismo. En el hipotiroidismo se ha visto un defecto evidente de la producción de LH, por lo que, con frecuencia se dan ciclos anovulatorios que conducen a la esterilidad y ciclos que se acompañan de metro ó menorragias (**HERRERA-POMBO, 1.969**).

En el mismo sentido de hipotiroidismo asociado con amenorrea y galactorrea, son muchos los autores que describen casos clínicos de pacientes que presentan esta asociación. **SHAHSHAHNI** (1.978), presenta un caso de una mujer de 30 años. (**RODRIGUEZ, 1.979**). **BONET** (1.981), estudia 150 mujeres, de edades comprendidas entre 25 y 34 años, con más de dos años de infertilidad primaria ó secundaria debida a anovulación ó insuficiencia lútea, a las que se les practicó un estudio endocrinológico, dando como resultado, el hallazgo de 20 casos de hipotiroidismo; tras tratamiento tiroideo, mejoró considerablemente la fase lútea. **BALLESTER, 1.981 ; EVERS, 1.981 ; HEYBURN, 1.986**, publica un caso clínico de una paciente que presentaba

amenorrea, galactorrea y agrandamiento suprasellar de la pituitaria. **WILANSKY**, 1.989, publicó un estudio de 67 mujeres aparentemente eutiroides de las cuales 15 presentaban menorragia, con un test de estimulación de la TRH mostraron un hipotiroidismo poco severo, caracterizado por pequeñas elevaciones de los niveles basales con la hormona estimulante del tiroides y niveles bajos de tiroxina en suero, lo que justifica, el estudio de la función tiroidea en las menorragias (**FISH**, 1.988).

En la literatura médica, hay casos descritos de hipotiroidismo primario asociados a galactorrea y amenorrea postpartum, (**ROSS**, 1.968) constituyendo éstos una entidad clínica distinta de las galactorreas y amenorreas postpartum de Chiari-Fronmel, por el hecho de que al ser tratados con tiroxina regresaban los síntomas y la paciente volvía a la normalidad. La asociación de galactorrea con hipotiroidismo primario en estos casos nos recuerda el mecanismo de solapamiento hormonal. Algunos autores piensan que esta anormalidad se establece como consecuencia de una inhibición de los centros hipotalámicos que controlan las hormonas liberadoras de PRL y LH.

En el mismo sentido (**BAYLISS**, 1.969), presenta un

caso de una mujer de 26 años de edad que padece amenorrea y galactorrea persistente postpartum, en asociación con un hipotiroidismo primario, alteraciones que regresaron después de ser tratada con tiroxina. Es conocido que, si bien, estas alteraciones son fisiológicas durante la preñez, cuando se prolongan más allá de los límites normales del puerperio, son consideradas patológicas, entrando a formar parte, no sólo, de alteraciones hipotiroideas, sino también, formando cortejo de otros síndromes.

Como bien ha sugerido **ROSS** (1.968), los bajos niveles de tiroxina circulante, podrían inhibir parte del hipotálamo, que produce el factor liberador de LH y el factor inhibidor de la PRL. Esta podría ser la causa de la disminución de la hormona liberadora de la LH por la pituitaria y el incremento de la producción de PRL y como resultado de ello amenorrea y galactorrea. Ello hace probablemente que el estado de postpartum sea un prerrequisito para esta situación.

Es un hecho bien conocido el efecto que ejerce el tiroides sobre las glándulas sexuales, ya que eminentemente se observa en enfermas con disfunción tiroidea que poseían trastornos menstruales con bastante regularidad,

oligomenorrea, menorragias ó metrorragias. Incluso con más ó menos base científica ha habido una época en que se utilizaban extractos tiroideos como medio terapéutico de la esterilidad.

La importancia que tiene la hormona tiroidea para el normal desarrollo y maduración, tanto somático, como del SN, durante la fase embrionaria y fetal, como postnatal, no solamente se ha visto, a través, de la observación clínica, sino utilizando, métodos que tuvieran como finalidad el disminuir la actividad tiroidea. En este sentido son diversas las experiencias utilizadas, ya que comprenden tanto métodos físicos (tiroidectomía y radiotiroidectomía) como métodos químicos, los cuales consisten en la administración de preparados químicos (drogas antitiroideas que provocan una deprivación en la actividad funcional del tiroides). La importancia capital de este segundo método reside en el hecho de ser la fórmula terapéutica más usualmente utilizada en aquellos enfermos que padecen hipertiroidismo.

En esta línea se han utilizado diversas drogas antitiroideas para observar la distinta capacidad que tienen cada una de ellas para frenar la función de la glándula. Una de las primeras drogas utilizadas para tal

fin y de forma usual, ha sido la tiourea. La cual ha provocado un hipotiroidismo manifiesto, cuya intensidad depende de la concentración de la sustancia y de la edad a la que es inyectada al embrión.

Sin embargo las drogas más utilizadas para combatir el hipertiroidismo son el tiouracilo y sus derivados (Metil-tiouracilo, Propil-tiouracilo y Metimazol). De todos ellos los que se han empleado con mayor frecuencia es el PTU, ya que, además de ser un potente antitiroideo, tiene la ventaja de tener menor toxicidad, tanto desde el punto de vista experimental como clínico. Es uno de los medicamentos de elección en el hipertiroidismo de la embarazadas (SERUP, 1.978 ; KAMPMANN, 1.980 ; CHERON, 1.981). No obstante, hay que hacer constar, como dato de gran interés, el aumento de la mortalidad celular que padecen los animales de experimentación sometidos a estados de hipotiroidismo químico. Hechos que han sido constatados (RABIE, 1.977), tras la administración de PTU en la rata neonatal, el cual observó en el cerebelo un incremento de mortalidad celular a nivel de la capa granular externa. Junto a estos datos experimentales habría que añadir otros referentes a la morfología y función de las gónadas, fundamentalmente en aves.

El hipotiroidismo prenatal resultante de haber practicado una tiroidectomía ó de haber administrado una droga antitiroidea, provocó en los animales de experimentación, retraso del crecimiento, así como de la diferenciación y desarrollo del SNC. Por otra parte, cuando se provoca un hipertiroidismo, tras la administración de tiroxina, se produce una alteración en la evolución normal del embarazo, que se acompaña la mayoría de las veces de alteraciones congénitas. Se ha demostrado, tras amplia investigación en ratas, que un desarrollo prenatal normal requiere una actividad normal también de la glándula tiroidea (GOMMERS, 1.967), ya que su disfunción, fundamentalmente el hipotiroidismo, provoca daños fetales en un elevado número de casos.

Hay que tener en cuenta en el momento de administrar drogas antitiroideas a gestantes hipertiroides, que suelen atravesar rápidamente la barrera placentaria, fundamentalmente el tiouracilo, ocasionando un descenso en la actividad tiroidea del nuevo ser.

Por lo que se refiere a la terapéutica del hipertiroidismo en las embarazadas, la utilización de las drogas antitiroideas han desplazado la cirugía, aunque poseen el riesgo de interferir en la actividad

morfofuncional del tiroides fetal, ya que, estos antitiroideos de síntesis, atraviesan la barrera placentaria, como hemos comentado antes. La utilización de PTU es preferible al metimazol, por ser más activo que este último y estar unido a una proteína transportadora más pesada y pobremente soluble en solución acuosa, que se ioniza a un pH de 7,4, por lo cual dificulta en cierto modo su paso por la placenta (COOPER, 1.984).

En cuanto a la dosis administrada de PTU a la madre es variable, en cuanto a la frecuencia de aparición de bocios neonatales es del 10%. Es decir, no existe relación dosis-respuesta, ya que una dosis pequeña puede estar asociada a bocio neonatal, mientras que dosis más amplias no dan efectos secundarios fetales.

Las complicaciones fetales en madres hipertiroideas tratadas con PTU ú otras drogas de síntesis durante el período de gestación son francamente abundantes. De ello hay constancia bibliográfica de multitud de casos descritos por diversos autores.

REDMOND (1.978), aconseja utilizar como tratamiento del hipertiroidismo el propanolol como sustitutivo del PTU, ya que, el primero de ellos hace volver muy rápidamente a

la normalidad la tirotoxicosis; sin embargo está totalmente contraindicado en las embarazadas, ya que es mucho más agresivo para el feto que el PTU. En el último decenio, y para paliar las alteraciones fetales que ocasiona la administración de PTU en la toxicosis de madres embarazadas, se ha ensayado la administración de esta misma droga asociada a I (KASAY, 1.980), ó bien, a la tiroxina (SOLOMON, 1.981). Sin embargo, sigue siendo difícil el tratamiento de la enfermedad hipertiroidea durante el embarazo, ya que se ha demostrado que la terapia de asociación de drogas antitiroideas con hormona tiroidea, no previene en gran medida las posibles alteraciones causadas en el feto, debido a que la hormona tiroidea no pasa suficientemente bien a través de la barrera placentaria, mientras que la droga antitiroidea lo hace con mayor facilidad (HOFF, 1.981).

En un estudio realizado en 23 embarazadas con tirotoxicosis (CHAHAL, 1.981): 19 de ellas, fueron tratadas con drogas antitiroideas (PTU) más suplemento de hormona tiroidea; una de las embarazadas fué solamente tratada con drogas antitiroideas y a tres de ellas se les practicó una tiroidectomía parcial durante el embarazo. Con el primer tratamiento se encontraron solamente un caso de bocio

neonatal y el 23% de los fetos restantes presentaron inmadurez y peso de RN inferior al normal. No se encontraron cretinismo ni tirototoxicosis fetal.

MARTINEZ (1.981), en un estudio clínico por él realizado, intentó demostrar que el PTU produce una gran incidencia de complicaciones en la gestante. Por consiguiente aconseja, para evitar el hipotiroidismo fetal, suspender el tratamiento antitiroideo al primer síntoma de embarazo y mantener a la gestante ligeramente hipertiroidea.

Posteriormente **STOCKIGT** (1.989), sugiere, antes de administrar drogas antitiroideas a madres gestantes, el hacer un estudio detenido de la paciente y observar: si el diagnóstico es correcto; el grado de severidad del desorden; la causa del exceso de hormonas; y por último, estudiar factores tales como la edad de la paciente, tamaño del bocio, enfermedades asociadas, los tratamientos previos que ha tenido y la preferencia del paciente en la elección del tratamiento (químico ó físico). Si el hipertiroidismo que padece la gestante es de carácter severo, basándose para este diagnóstico, más en el juicio clínico que en las características bioquímicas, generalmente no hay muchas alternativas que tomar, pues se hace necesario el uso de

drogas antitiroideas, en tratamiento de choque, y pasar a la paciente al estado eutiroideo lo más rápidamente posible. Para ello hay numerosos protocolos de utilización de estas drogas, solas ó en conjunción con cirugía ó I radiactivo, etc.

No obstante, las madres gestantes hipertiroideas a las que se les administra PTU ó cualquier otro antitiroideo, así como una tiroidectomía subtotal, presentan: una mayor incidencia en abortos, prematuridad, mortalidad perinatal y en algunos casos tirotoxicosis neonatal (**MENSMANT, 1.974 ; LORCY, 1.979 ; POTTER, 1.980**).

En este sentido las revisiones clínicas son abundantes, indicando todas ellas la incidencia del hipotiroidismo fetal inducido por el tratamiento de drogas antitiroideas administradas a las madres en período de gestación (**WORLEY, 1.974 ; JONCKHEER, 1.976 ; SERUP, 1.978**). Incluso hay autores que aunque creen que el adicionar a la droga antitiroidea la T₃ (Triiodotironina) (**WORLEY, 1.974 ; HORGGER, 1.976**) protege al feto de la agresión de la droga antitiroidea, no parece del todo claro, ya que, el paso de los antitiroideos a través de la placenta presenta mayor facilidad que los preparados de

tiroxina. El bocio en el RN de madres tratadas con drogas antitiroideas durante el embarazo, probablemente se deba por un aumento de TSH en el feto como respuesta a la depresión de hormona tiroidea inducida por el paso placentario de la medicación antitiroidea.

Mención especial merecen aquellas mujeres eutiroideas que durante el embarazo se vuelven hipertiroideas, presentando además de un diagnóstico complejo un tratamiento difícil de decidir, ante el temor del efecto que la droga antitiroidea pueda ejercer en el feto. En este caso la droga más usualmente utilizada es el PTU, aunque utilizada a pequeñas dosis.

Por lo que se refiere a la asociación del hipotiroidismo con alteraciones gonadales, testículos, y fundamentalmente ovarios, la investigación experimental ha demostrado desde hace mucho tiempo la importancia que ejerce la hormona tiroidea sobre el desarrollo y actividad funcional de las gónadas. **BENOIT** (1.937), observó la presencia de hipogonadismo después de practicar tiroidectomías. Más recientemente se ha encontrado descenso de niveles de FSH y LH en la adenohipófisis tras tiroidectomía acompañada de disminución en el nivel de TSH (**COMTOPOULUS**, 1.958 y 1.953). Se ha observado también una

disminución en el peso de los ovarios de rata tras ser sometidas a tratamiento con tiouracilo y metiltiouracilo (HOPPER, 1.962 ; SCHREIBER, 1.964).

Las investigaciones llevadas a cabo, fundamentalmente con aves, después de practicar métodos físicos, como la tiroidectomía, **TAPLIYAL** (1.967), se encontró en la Munia de cabeza negra, 3,5 meses después de haberle practicado la tiroidectomía, que las gónadas estaban desarrolladas y completamente activas, en oposición a las aves controles, cuyas gónadas habían regresado por completo, hecho normal después del período de celo. Otro dato de interés es que, en los animales tiroidectomizados, las gónadas pesaban más que las de los controles.

TAPLIYAL (1.969, 1.978) demuestra que el tiroides es la glándula fundamental en el sostenimiento del desarrollo y actividad funcional de las gónadas, y por tanto, de la función reproductiva. Posteriormente **LAL** y **TAPLIYAL** (1.982) demostraron en el Molpaster de vientre rojo que la tiroidectomía producía un rápido colapso en el desarrollo gonadal, parcial ó totalmente, con independencia de que los pájaros fuesen expuestos a fotoperíodos normales ó más largos de lo

normal. La administración durante largos períodos de tiempo de L-tiroxina (en Lal munia), inhibe el ciclo de desarrollo de las gónadas (TAPLIYAL, 1.984), este autor sugiere que la T_4 suprime la secreción de FSH más pronto que la de la LH.

La administración de tiouracilo en la dieta de las ratas hembras retrasan la maduración del sistema reproductor, sin embargo, los ovarios de estas ratas hipotiroideas, muestran una mayor sensibilidad a las gonadotropinas (ADAMS, 1.964). De este modo, tras la administración de gonadotropina coriónica humana en ratas hipotiroideas, se producían quistes foliculares y ovarios quísticos, que pesaban varias veces más que el peso obtenido en animales eutiroides tratados de forma similar. El desarrollo de ovarios poliquísticos incluye el fallo de la ruptura ovulatoria de la pared folicular, lo que sugiere un metabolismo aberrante en las sustancias intercelulares. La disminución característica en la cantidad de ácido ascórbico en los ovarios quísticos, puede significar una síntesis subnormal del colágeno.

Estudios realizados "in vitro", de testículos y ovarios de embriones de pollo de 12 a 15 días de incubación en presencia de TSH, gonadotropinas (FSH + LH), y ACTH,

durante diferentes períodos. Todos los explantes se desarrollaron en testículos y ovarios conforme a su sexo genético. Los explantes tratados con tirotropina y gonadotropina, respondieron positivamente al estímulo de dichas sustancias, mientras que los tratados con ACTH no respondieron. La gonadotropina, TSH aumentó el crecimiento y emigración de las células testiculares en comparación con el grupo control, mientras que los tratados con ACTH, este crecimiento fué mínimo. Estos resultados "in vitro" confirman los ya obtenidos "in vivo" en los cuales la TSH y las gonadotropinas coriónicas aceleran el desarrollo de las gónadas del pollo.

La presencia de alteraciones multiquísticas de ovario, asociadas a pacientes que presentan un hipotiroidismo primario más ó menos severo han sido halladas en clínica tras estudios ecográficos, y ámpliamente expuestas en la bibliografía internacional. Así, **LINDSAY**, 1.980 y 1.983 ; **EVERS**, 1.981, describen casos de este tipo, algunas veces en asociación con precocidad sexual, en los que el tratamiento con hormona tiroidea hace regresar tales síntomas. **ROTMENSCH** (1.989) describe en una paciente con mixedema, el síndrome de hiperestimulación ovárica espontánea asociada con hipotiroidismo severo, un caso no descrito con anterioridad, como espontáneo. La

evolución clínica y los datos de esta paciente han sido comparados con los publicados anteriormente sobre investigación en animales; sugiriendo que la TSH puede servir como factor de facilitación de quistes foliculares en el ovario.

Por último, se puede decir que tras diversos estudios clínicos se llega a la conclusión de que el hipotiroidismo, incluso leve, puede ser causa de insuficiencia ovárica (BISPINK, 1.989), por ello la evaluación de la función tiroidea debería ser una prueba obligatoria en todas aquellas personas infértiles que presenten niveles elevados de PRL y una anovulación crónica.

Todos estos datos bibliográficos nos hacen pensar en que las diferentes sustancias farmacológicas que se administran en la clínica, pueden ser causa directa ó indirecta de alteraciones secundarias. De tal forma, que al intentar curar ó paliar una determinada disfunción, la terapia administrada para ello puede inducir a otra alteración secundaria, que puede llegar a ser incluso más transcendente que aquella otra que intentábamos curar ó paliar .

Todo ello se agrava cuando la paciente a la cuál tratamos farmacológicamente, es una mujer en estado gestacional. En este caso la precaución terapéutica debe ser más exquisita, porque podemos inducir, con la medicación administrada, alteraciones en el normal desarrollo morfofuncional del nuevo ser. Más aún cuando el tratamiento a la gestante se realiza en aquella fase en que el nuevo ser va a estar en período embrionario, ya que en este concurren complicados mecanismos morfofuncionales que pueden ser alterados por la medicación materna, al pasar ésta la barrera placentaria.

Uno de estos casos delicados es el tratamiento de la gestante hipertiroidea, sometida normalmente a la administración de drogas antitiroideas. Es ya conocido, que estas drogas pasan con facilidad la barrera placentaria, ocasionando en el nuevo ser ámplios defectos en su desarrollo, que pueden ir desde la anencefalia, retraso mental en mayor ó menor grado, alteraciones de crecimiento y maduración, hasta alteraciones, como hemos podido ver, por la bibliografía comentada, en el desarrollo normal de las gónadas.

Precisamente en este último aspecto, y debido a los pocos datos bibliográficos que encontramos al respecto, es

dónde dirigimos el empeño del presente trabajo, mediante el cuál queremos indagar la influencia que tiene una droga antitiroidea tan usual , como es, el PTU, en el desarrollo de los ovarios de las aves, bajo un aspecto morfométrico.

Con ello intentamos aportar nuevos datos que clarifiquen las anomalías congénitas que provocan las drogas antitiroideas ó el hipotiroidismo en sí, en el desarrollo embrionario, clarifiquen las anomalías congénitas que provocan las drogas antitiroideas ó el hipotiroidismo en sí, en el desarrollo embrionario.

MATERIAL Y METODOS

El material de experimentación utilizado para la realización de esta tesis, fueron huevos fecundados de tamaño uniforme de "Gallus domesticus", denominación comercial Shaver Star-Cross nº 288 (raza Leghor Blanca), los cuales fueron sometidos a 38,7°C, en incubadora (MASSALLES modelo XII B) con regulación automática de temperatura y volteo, así como, con circulación de aire forzado y humedad controlada (55,5% de humedad relativa).

Se eligió este tipo de material, por la necesidad de trabajar con un número elevado de animales fáciles de manejar y con períodos de gestación cortos, con el fin de que los resultados fuesen cualitativa y cuantitativamente fiables.

Se partió de 296 huevos, a los 7 días de incubación, antes de la administración del antitiroideo, se visualizaron los huevos a través del ovoscopio, (ó lámpara mirahuevos de luz ultravioleta), encontrándose, entre no fecundados y abortados, 32 huevos que fueron desechados, quedando 264, que se dividieron en cuatro grupos.

De estos cuatro grupos, uno quedó como control, y los tres restantes se sometieron a distintas dosis de antitiroideo, las dosis utilizadas fueron: 600, 1.200 y 1.800 microgramos.

El antitiroideo escogido fue el 4-propil-2-tiouracilo (PTU), de la casa MERCK, por ser este menos tóxico y más activo que el tiouracilo.

La concentración empleada de propiltiouracilo fué de dos por mil, en suero fisiológico salino isotónico, con la siguiente composición:

Cl Na.....0,9g.

H₂O (destilada y apirógena).....100 ml.

y un contenido iónico de:

Cl-.....154 mEq./litro.

Na+.....154 mEq./litro.

y una osmolaridad teórica de: 308 mOsm./litro.

Para su administración se realizó con una lanceta, un orificio aproximadamente de 0,5 mm. de diámetro, la zona donde se hizo éste, se delimitó anteriormente con el ovoscopio, para evitar traumatismos al embrión, se atravesaron las membranas del huevo y se depositó con una micropipeta la suspensión a 38°C en el corioalantoides.

Con el fin de evitar cambios de presión y facilitar la penetración del antitiroideo, se practicó un orificio similar en la cámara de aire. Una vez introducida la suspensión, ambos orificios se sellaron con parafina.

Las dosis totales administradas a cada grupo eran de 600 , 1.200 y 1.800 microgramos de PTU, fraccionadas a su vez, en tres dosis de 200, 400 y 600 microgramos respectivamente. Esta forma de administrar el propiltiouracilo fué utilizada siguiendo las indicaciones de **BENNET** (1.952), según el cual las dosis sucesivas son más activas que una dosis única.

Se eligieron los días 7, 9 y 11 de incubación para su administración, ya que el desarrollo del eje adenohipofisario-tiroideo comienza a ser funcionante a los 11,5 días de incubación **THOMMES** (1.977). Siguiendo esta pauta, la obtención de un hipotiroidismo químico esta asegurado como demuestran los trabajos de **RODA** (1.979), **MEGIAS** (1.988).

Las extracciones se realizaron en los siguientes días del desarrollo:

1 extracción.....	13 días de incubación.
2 " 	15 "
3 " 	17 "
4 " 	19 "
5 " 	21 "

FIJACION, DESHIDRATAACION E INCLUSION

Las gónadas extraídas se procesaron con una fijación: a) Glutaraldehido al 3% en tampón fosfato 3

horas a 4°C.

b) Os O₄ al 1% 2 h.

Deshidratación: etanol

Inclusión: medio Spurr

Las gónadas femeninas constan de un solo ovario izquierdo funcional (que es el extraído) **ROMANOFF** (1.960). Este se localiza en la cavidad peritoneal cerca del extremo anterior del riñón, ya que el ovario derecho sufre una degeneración quedando como un órgano rudimentario. Una vez extraído el ovario se fija rápidamente por el método de la inmersión, en una solución de Glutaraldehído al 3% en tampón fosfato, con un pH de 7,4 y una temperatura de 4°C durante tres horas.

Seguidamente se trocean los ovarios en cubitos de 1 a 2 mm., procediéndose a un doble lavado de 5 minutos, en tampón fosfato con igual pH que el anterior y 440 miosmolar, para realizar una 2ª fijación en tetróxido de Osmio (Os O₄) al 1% en tampón fosfato a 4°C durante 2 horas.

Tampón fosfato (**MILLONIG** 1.964)

- * Na H₂ PO₄ · H₂O1,8 g.
- * Na₂ H PO₄ · 7 H₂O.....23,25 g.
- * Na Cl.....5 g.

Agua destilada hasta enrasar a 1.000 ml.

La solución tiene un pH de 7,4 y una osmolaridad de 440 mOsm.

Solución fijadora de glutaraldehído al 3 % en tampón fosfato:

- * Glutaraldehído comercial (Sol.25%).....12 ml.
- * Tampón fosfato (Millonig).....88 ml.

El pH de la solución es 7,5.

Solución fijadora de Tetróxido de Osmio al 1% en tampón fosfato:

- * Tetróxido de Osmio (Os O₄).....1 g.
- * Tampón fosfato (Millonig).....100 ml.

La solución tiene un pH de 7,5.

Esta última solución fijadora debe de prepararse con antelación para que haya una buena disolución del tetróxido de Osmio.

Siguiendo las indicaciones de **HAYAT** (1.981), se realizó la deshidratación con etanol en grados crecientes de concentración:

Alcohol al 50%	15 minutos.
"	60%15 "
"	70%35 "
"	80%10 "
"	90%10 "
"	Absoluto10 "

La inclusión se realizó en resinas epoxi que son inmiscibles en el etanol, se eliminaron los restos de etanol en los tejidos con óxido de propileno con la siguiente pauta:

Oxido de propileno	2 x 5 minutos.
Oxido de propileno + resina (a partes iguales)	..	2 h.
Resina a temperatura ambiente	12 h.

Una vez realizados todos los pasos anteriores, se procede a la inclusión, para ello, se introducen los trocitos de tejido en unos moldes de silicona, teniendo en

cuenta, que la orientación de la pieza sea la adecuada para el tipo de estudio que se quiere realizar con posterioridad. Los moldes se introducen durante 12 horas en una estufa a 60°C para su polimerización.

El medio de inclusión utilizado ha sido el medio SPURR, con las siguientes proporciones:

1.- Resina base ó epoxi-resina:

Dióxido de vinilciclorohexeno (VCD).....10 g.

2.- Plastificante:

Propilenglicol diglicidil eter (DER - 736).....7 g.

3.- Endurecedor:

Anhídrido nonenil succínico (NSA).....26 g.

4.- Acelerador:

Dimetil aminoetanol (DMAE).....0,4 g.

Los tres primeros componentes se agitan con una varilla de vidrio para añadir después el acelerador, que debe agitarse para obtener una buena mezcla antes de su utilización.

MICROSOPIA OPTICA. CORTES SEMIFINOS

Para obtener un estudio estructural de los ovarios, con el microscopio óptico, se realizaron secciones de una micra de grosor, con los ultramicrotomos LKB III y LKB IV, utilizando para ello cuchillas de vidrio.

Los cortes obtenidos se recogían del pocillo y eran llevados a un portaobjetos, donde eran fijados por calor, para ser más tarde teñidos con azul de toluidina, a continuación, eran lavados y secados con papel de filtro. Una vez montados los cortes se observaban al microscopio óptico LEITZ, haciéndose fotografías con película Kodak panatomic-X de 16 DIN.

Para que los cortes a fotografiar de cada pieza fueran tomados al azar, una vez montado un portaobjetos, se desechaban los siguientes, se recogían otros, y así sucesivamente, por lo que los cortes utilizados pertenecen a distintos niveles del ovario, de esta manera, las células estudiadas son distintas.

Colorante para los cortes semifinos:

* Azul de Toluidina1 g.

* Solución de tetraborato sódico al 1%100 ml.

Esta solución debe ser preparada con anterioridad, y en el momento de su utilización debe filtrarse.

MICROSCOPIA ELECTRONICA CORTES ULTRAFINOS

Tras el estudio estructural con los cortes semifinos, en el que se realizó una comparación de la médula y la corteza del ovario, así como, de los nidos germinales, se retallaron las piezas para obtener secciones ultrafinas, de manera, que se pudieran observar las células objeto de nuestro estudio, los ovocitos.

Las secciones ultrafinas se realizaron con un grosor medio de 500 Å.

El grosor de estos cortes se apreció siguiendo las indicaciones de **GONZALEZ-SANTANDER** (1.968), y consiste en apreciar el grosor a través de la interferencia de los colores de la luz refractada sobre los cortes que flotan en el pocillo, obteniéndose una gama de colores según el grosor; el gris plata, es el que corresponde a un grosor aproximado de 500 Å.

Una vez eliminados los cortes excesivamente gruesos, estos eran recogidos sobre rejillas de cobre electrolítico de 200 mallas, sin membrana soporte. Una vez montada una rejilla, antes de montar la siguiente, se eliminaron de 20 a 30 cortes semifinos de una micra de espesor, para que los cortes ultrafinos obtenidos y montados en cada rejilla correspondan a células distintas que los anteriores.

Para contrastar los tejidos, las rejillas se introdujeron en una solución acuosa de acetato de uranilo al 3% durante 30 minutos. Tras dos lavados de 5 minutos en agua bidestilada, son secadas e introducidas en una solución de citrato de plomo, **REYNOLDS** (1.963), durante 10 minutos, después de un doble lavado en agua bidestilada, son secadas en la estufa a 60°C, antes de ser visualizadas al microscopio electrónico.

La observación de los cortes ultrafinos, se lleva a cabo en un microscopio electrónico de transmisión EM 10 C, de la marca ZEISS, de los Servicios Técnicos de la Universidad de Granada; y las micrografías se realizaron sobre placa 10 x 8 cm. de DUPONT PCU-7.

Solución de acetato de uranilo: **FRASCA y PARKS**

(1.965):

- * Acetato de uranilo3 g.
- * Agua bidestilada100 ml.

Solución de citrato de plomo **REYNOLDS** (1.963):

Solución A: Nitrato de plomo 1 M.

- * Nitrato de plomo3,31 g.
- * Agua bidestilada (hervida).....10 ml.

Solución B: Citrato sódico 1 M.

- * Citrato sódico3,57 g.
- * Agua bidestilada (hervida)10 ml.

Solución C: Hidróxido sódico 1 N.

- * Hidróxido sódico0,4 g.
- * Agua bidestilada (hervida).....10 ml.

Preparación de la solución de contraste:

- 1.- Añadir 3 ml. de solución B a 16 ml. de agua bidestilada (hervida) y agitar muy bien.
- 2.- Añadir 2 ml. de la solución A.
- 3.- Agitar fuértemente durante un minuto y después cada cinco minutos, durante un total de treinta minutos (en esta fase la solución tomará un aspecto lechoso).
- 4.- Añadir cuatro ml. de solución C, y agitar

hasta obtener una solución transparente.

Esta solución de contraste se puede almacenar un máximo de tres meses en frigorífico, en tubos de vidrio de centrífuga bajo una capa de aceite de parafina, y los tubos tapados con parafilm. Antes de usarse se debe centrifugar para evitar los precipitados de carbonato de plomo. El agua bidestilada para preparar esta solución debe ser hervida y filtrada para eliminar el CO_2 y evitar los precipitados

PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS PARA SU ANALISIS ESTEREOLOGICO

De cada uno de los días extraídos (13, 15, 17, 19 y 21 del desarrollo embrionario) se incluyeron al azar de cuatro a cinco piezas de tejido, tanto para testigos como para tratados con PTU (con la dosis D), teniendo de cuatro a cinco piezas por cada día de extracción y grupo. Para el análisis estereológico de las muestras, sólo se utiliza la dosis D, correspondiente a 1.800 microgramos de

PTU de dosis total, siendo administrada como ya se ha comentado en otra parte de este capítulo. La elección de la misma viene dada por ser ésta la dosis con una mortalidad media.

De cada pieza se realizaron cortes que se montaban en portaobjetos, como ya se ha indicado, para ser fotografiados al microscopio óptico con un objetivo de 25x aumentos, y los negativos fueron ampliados 3,5x.

De los cortes ultrafinos, se montaron tres rejillas por pieza, de dónde, se fotografiaban tres células por rejilla, utilizando un aumento de 3.150x, obteniéndose así, 45 fotos por grupo. Más tarde se realizaron dos niveles de aumento en la ampliadora, el nivel I para estudiar parámetros celulares y nucleares, y el nivel II para estudiar parámetros intracelulares como las mitocondrias.

Las copias presentan una ampliación de 10.500x para el escalón I y 32.000x para el escalón II. El número de aumentos fué elegido, de manera que, se pudiera trabajar con las células y mitocondrias con cierta comodidad. En total el número de micrografías realizadas para el microscopio óptico fué de 520, y para el microscopio electrónico de 810. Con las micrografías se hizo un análisis

estereológico por el método del "point-counting", utilizando una plantilla test de 5mm. de distancia entre las líneas.

PARAMETROS ESTERECLOGICOS ESTUDIADOS

Utilizamos los métodos estereológicos para poder cuantificar el posible efecto del propiltiouracilo sobre el ovario de pollo, tanto en su efecto sobre la estructura histológica, así como, en la ultraestructura del ovocito.

La estereología es la interpretación tridimensional de las imágenes contenidas en el plano en dos dimensiones, a través de criterios de probabilidad geométrica. Es decir, midiendo sobre las micrografías una serie de valores (área, longitud, número, etc.) y aplicando distintas fórmulas dan como resultado una serie de valores geométricos de las estructuras estudiadas.

Las pruebas matemáticas de las que derivan las ecuaciones estereológicas demuestran que las medidas formadas a partir de muestras bidimensionales (secciones) representativas pueden ser utilizadas para estimar

cuantitativamente la estructura interna de un objeto tridimensional.

Se han utilizado los siguientes parámetros esterológicos:

A.- PARAMETROS RELATIVOS

* **Densidad de superficie:** es la relación que existe entre el área de la superficie del componente considerado y el volumen de referencia (p. e. área de la superficie mitocondrial contenida en una unidad de volumen citoplasmático).

Se obtiene por la siguiente fórmula:

$$Sv_i = 2I_i / Lt$$

unidades: μm^{-1}

dónde: I_i es el número de intersecciones de las líneas horizontales del test con los perfiles del componente i .

Lt es la longitud total de las líneas horizontales del test.

Se estudiaron las siguientes densidades de superficie:

- 1.- De la medular, por unidad de volumen de la gónada.
- 2.- Del cortex por unidad, de volumen de la gónada.
- 3.- De las células germinales, por unidad de volumen del cortex.
- 4.- De las células no germinales, por unidad de volumen del cortex.
- 5.- De la célula, por unidad de volumen de tejido.
- 6.- Del núcleo, por unidad de volumen de tejido.
- 7.- De las mitocondrias, unidad de volumen del citoplasma.

Los tres últimos parámetros corresponden al ovocito.

* **Densidad de volumen:** Es la relación que existe entre el volumen del componente considerado y el volumen de referencia o continente (p.e. volumen mitocondrial contenido en la unidad de volumen citoplasmático).

Se obtiene usando la siguiente fórmula:

$$Vv_i = P_i/P_t$$

unidades: μm

siendo: P_i los puntos sobre el componente i .

P_t los puntos sobre el elemento de referencia.

Se estudiaron las siguientes densidades de volumen:

- 1.- De la medular, por unidad de volumen de la gónada.
- 2.- Del cortex, por unidad de volumen de la gónada.
- 3.- De las células germinales, por unidad de volumen del cortex.
- 4.- De las células no germinales, por unidad volumen del cortex.
- 5.- De la célula, por unidad de volumen de tejido.
- 6.- Del núcleo, por unidad de volumen de tejido.
- 7.- Del citoplasma, por unidad de volumen de tejido.
- 8.- De las mitocondrias, por unidad de volumen de citoplasma.

Los cuatro últimos volúmenes corresponden al ovocito.

* **Densidad numérica:** Número de partículas por unidad de volumen del continente (p. e. nº de mitocondrias por unidad de volumen del citoplasma).

Se obtiene con la siguiente fórmula:

$$Nv = (K/\beta) [(Na)^{3/2} / (Vv)^{1/2}] \quad \text{unidades: } \mu\text{m}^3$$

donde: K es un coeficiente de distribución, y depende de la distribución de los tamaños de las partículas.

$$K = (M_3/M_1)^{1,5}$$

siendo: $M_1 = (d_1 + d_2 + d_3 + \dots + d_n) / n$

$$M_3 = [(d_1^3 + d_2^3 + d_3^3 + \dots + d_n^3) / n]^{1/3}$$

$d_1, d_2, d_3, \dots, d_n$ son los diámetros medios de cada perfil.

El coeficiente β varía de acuerdo con la relación axial de las partículas, es decir, depende de la forma y se obtiene del normograma para elipsoides y cilindros (**WEIBEL** y **BOLENDER**, 1.973).

$$\beta = V / a^{3/2}$$

$N_{a i}$: es el número de perfiles del componente i por unidad de área.

Se estudiaron las siguientes densidades numéricas:

De las mitocondrias , por unidad de volumen del citoplasma.

B.- PARAMETROS ABSOLUTOS

* **Superficie nuclear:** Area de la superficie del núcleo, sin referirnos a un volumen de referencia.

Se calculó a partir de la siguiente fórmula:

$$S_n = S_v c / N_v n \quad \text{unidades: } \mu\text{m}^2$$

* **Superficie celular:** Area de la superficie celular, sin referirse a un continente.

Obtenida a partir de la fórmula:

$$S_c = (S_n \times S_v c) / S_v n \quad \text{unidades: } \mu\text{m}^2$$

* **Superficie citoplasmática:** Area de la superficie citoplasmática sin referirse a ningún continente.

$$S_{cyt} = S_c - S_n \quad \text{unidades: } \mu\text{m}^2$$

* **Superficie de una mitocondria:** Obtenida a partir de la siguiente fórmula:

$$S_{my} = (S_{v_{my}} \times V_{cy}) / N_m \quad \text{unidades: } \mu\text{m}^2$$

* **Superficie total de las mitocondrias:** Se partió de la siguiente expresión:

$$S_{total\ my} = S_{v_{my}} \times V_{cy} \quad \text{unidades: } \mu\text{m}^2$$

* **Volumen nuclear:** Volumen absoluto del núcleo, no referido a ningún continente.

Se obtiene por la siguiente fórmula:

$$V_n = V_{v_n} / N_{v_n} \quad \text{unidades: } \mu\text{m}^3$$

* **Volumen celular:** Es el volumen absoluto de la célula , sin referirse a ningún continente.

Obtenido de la siguiente forma:

$$V_c = (V_n \times V_{v_c}) / V_{v_n} \quad \text{unidades: } \mu\text{m}^3$$

* **Volumen citoplasmático:** Es el volumen absoluto del citoplasma de las células, sin referencia a ningún continente.

Viene dado por la siguiente fórmula:

$$V_{cy} = V_c - V_n \quad \text{unidades: } \mu\text{m}^3$$

Se obtienen estos tres últimos parámetros del ovocito.

* **Volumen absoluto de una mitocondria:** se obtiene a partir de la siguiente expresión:

$$V_{my} = V_{v_{my}} / N_{v_{my}} \quad \text{unidades: } \mu\text{m}^3$$

dónde: $V_{v_{my}}$ densidad de volumen de las mitocondrias

Nv my densidad numérica de las mitocondrias

* **Número total de mitocondrias:** Calculado por la siguiente fórmula:

$$Nt_{my} = Nv_{my} \times V_{cy}$$

* **Volumen total de las mitocondrias:** A partir de la siguiente expresión:

$$V_{total\ my} = Vv_{my} \times V_{cy}$$

unidades: μm^3

METODOS ESTADISTICOS

Cuando se desea contrastar la igualdad de dos poblaciones de las cuales se ha extraído sendas muestras aleatorias, existen diversos procedimientos estadísticos, dependiendo si las poblaciones en estudio son Normales ó no.

Se comprobó en dichas poblaciones , la hipótesis de normalidad de cada una de ellas. Hay veces en que el test de normalidad no se verifica , porque existen observaciones extremas , que en el caso de eliminarlas, la hipótesis de normalidad se verificaría en dichas poblaciones. Existen pues, dos tipos de test que verifican la normalidad ó no de una población.

1.- Test de Normalidad de D'Agostino

Es uno de los test que comprueban la distribución normal de un estudio , el test de D'Agostino contrasta si una variable aleatoria continua sigue la distribución normal ó no.

El test contrasta:

H_0 : " la variable aleatoria x es normal "
(hipótesis nula).

H_1 : " la variable aleatoria x no es normal".

Para ello se ordenan los datos muestrales, de menor a mayor , y se les asigna rangos o índices de uno a n , a dichos datos ordenados ; se calcula a continuación el estadístico de contraste:

$$D_{exp} = \frac{\sum_{i=1}^n E_i * x_i - \frac{n+1}{2} * \sum_{i=1}^n E_i x_i}{n \left[n * \left(\sum_{i=1}^n E_i x_i^2 - \frac{\left(\sum_{i=1}^n E_i x_i \right)^2}{n} \right) \right]^{\frac{1}{2}}}$$

siendo: x_i los datos ordenados

i sus índices respectivos.

La cantidad D_{exp} . debe compararse, para realizar el test, con las cantidades teóricas de la tabla correspondiente **MARTIN** (1.989) para obtener la significación del test. Para cada nivel de significación α y para cada tamaño n de muestra se nos dan dos valores (D_1, D_s) tales que, si el estadístico D_{exp} . de D'Agostino es $D_{exp} < D_1$, ó $D_{exp} > D_s$ se rechaza la hipótesis nula de Normalidad.

2.- Tests de rechazo de observaciones extremas

Si tenemos un valor extremo (alejado de la media muestral) que es sospechosamente grande ó pequeño, para

verificar si este valor puede considerarse cabalmente como perteneciente a la población que se muestrea (hipótesis nula) ó, por el contrario, se ha de excluir de la muestra como un error grave al tomar los datos , se utiliza el test de las observaciones extremas, el modo de decidir entre:

H_0 : "la observación extrema debe aceptarse "

H_1 : "la observación extrema debe rechazarse "

consiste en comprobar el estadístico de contraste:

$$t_{exp} = \frac{x_s - \bar{x}}{\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n x_i^2 - (\sum_{i=1}^n x_i)^2}{n}}}$$

con una $t-\alpha$ de la tabla correspondiente **MARTIN** (1.989)

siendo: x_s la observación extrema

\bar{x} la media muestral

Para cada tamaño de n de la muestra y para cada nivel de significación α , en la tabla se dan dos valores $t-\alpha$, tales que, cuando es $t_{exp} > t-\alpha$ se rechaza la observación.

3.- **Test de Student**, para comparar dos medias de variables normales y de muestras independientes. Con este test se pretende contrastar la igualdad de las medias de dos distribuciones normales. Cuando las muestras son independientes, se requiere igualdad de varianzas en ambas poblaciones.

Para contrastar la igualdad de varianzas se utiliza el test de la F de **Snedecor**, de igualdad de varianzas.

Si tenemos dos muestras aleatorias e independientes de tamaño n_1 y n_2 , y varianzas s_1^2 y s_2^2 , y ambas muestras siguen una distribución normal; el test contrasta: $H_0: " s_1^2 = s_2^2 "$ $H_1: " s_1^2 \neq s_2^2 "$

El estadístico de contraste es:

$$F_{exp} = \frac{s_1^2}{s_2^2} \quad \text{ó} \quad F_{exp} = \frac{s_2^2}{s_1^2}$$

tomando como numerador la mayor de las varianzas.

Si H_0 , es cierta, la cantidad F experimental sigue una distribución teórica F de Snedecor con $(n_1 - 1)$

y $(n_2 - 1)$ grados de libertad ó alternativamente $(n_2 - 1)$
y $(n_1 - 1)$.

Si $F_{exp.} < \alpha$, se acepta la igualdad de varianzas,
y si $F_{exp.} > \alpha$, se rechaza con un error 2α .

3.1.- Si en el test anterior aceptamos la
hipótesis nula de igualdad de varianzas, el paso siguiente
será contrastar la igualdad de medias.

El test se realiza a partir de la cantidad:

$$t_{exp} = \frac{x_1 - x_2}{\left[s^2 * \left(\frac{n_1 + n_2}{n_1 * n_2} \right) \right]^{\frac{1}{2}}}$$

dónde: s^2 , es un estimador que se obtiene como media
ponderada de s_1^2 y s_2^2 :

$$s^2 = \frac{(n_1 - 1) * s_1^2 + (n_2 - 1) * s_2^2}{n_1 + n_2 - 2}$$

dónde, x_1 y x_2 , son las medias muestrales y n_1 y n_2 sus tamaños.

La t_{exp} . se compara con una $t-\alpha$ de Student con $(n_1 + n_2 - 2)$ grados de libertad.

Ahora: $H_0: x_1 = x_2$

$H_1: x_1 \neq x_2$

La no significación del test indica la igualdad de medias y nos decidiremos por la hipótesis nula.

3.2.- Si la F de Snedecor, decide que las varianzas son distintas, se utiliza el test de **WELCH**, que sólo es aproximado, pero aún una buena potencia con relativa facilidad de cálculos.

En el se compara el valor de:

$$t_{exp} = \frac{x_1 - x_2}{\left(\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2} \right)^{\frac{1}{2}}}$$

con una t de Student con f grados de libertad, siendo:

$$f = \frac{\left[\left(\frac{s_1^2}{n_1} \right) + \left(\frac{s_2^2}{n_2} \right) \right]^2}{\frac{\left(\frac{s_1^2}{n_1} \right)^2}{n_1 - 1} + \frac{\left(\frac{s_2^2}{n_2} \right)^2}{n_2 - 2}}$$

dónde: $H_0: x_1 = x_2$

$H_1: x_1 \neq x_2$

La no significación del test indica igualdad de medias, decidiéndonos por la hipótesis nula, ó lo que es lo mismo, un resultado significativo indica desigualdad de medias.

4.- **Test de WILCONSON** para comparar dos muestras independientes.

Cuando las variables no son normales, se utiliza un método no paramétrico ó libre de distribución. El método que utilizamos se llama test de **WILCONSON** para muestras independientes.

Aunque se utiliza como alternativa al test de

Student para comparar dos medias, el nuevo test lo que en realidad contrasta es H_0 : " las dos poblaciones comparadas son idénticas ", frente a H_1 : " una población tiende a dar valores más altos que la otra ".

El test consiste en considerar todos los datos como provenientes de una sola muestra y ordenarlos de menor a mayor; el siguiente paso consiste en asignarle a cada dato de la muestra conjunta ordenada, un número de orden ó rango, teniendo en cuenta, que cuando dos ó más valores son iguales, a cada uno de ellos se le asigna el rango promedio de los rangos que tales datos tendrían si fueran distintos.

Después se calcula la suma de los rangos de la muestra de menor tamaño ($R_{exp.}$) .

En nuestro caso:

$n_1 + n_2 > 30$ la variable aleatoria
 $R_{exp.} \sim H_0 \quad N (ER) , V (R) \frac{1}{2}$ aproximadamente

$$E (R) = \frac{n_1 + n_2 + 1}{2} n_1$$

$$V(R) = \frac{n_1 + n_2 + 1}{l^2} * n_1 * n_2$$

cuando no hay valores iguales.

En el caso de empate de valores, si el número de grupos empatados es K , y el número de empates de cada grupo es t_i , haciendo $T_i = (t_i - 1) t_i (t_i + 1) = t_i^3 - t_i$, la nueva fórmula sería:

$$V(R) = \frac{(n_1 + n_2) * [(n_1 + n_2)^2 - 1] Et_i}{12 (n_1 + n_2)} * \frac{n_1 * n_2}{n_1 + n_2 - 1}$$

El test consistirá en comparar la cantidad:

$$T_{exp} = \frac{R_{exp} - E(R) - 0,5}{(V(R))^{1/2}}$$

Con una $t\alpha$ de la tabla correspondiente, **MARTIN** (1.989).

Observada la muestra, si el valor que toma en ella, el estadístico de contraste está en la región de aceptación, se acepta el H_0 , si está fuera, se acepta H_1 .

En el primer caso el test es estadísticamente no significativo; en el segundo se dice que es estadísticamente significativo (ambos con un error α).

Una vez realizados estos test para el contraste de muestras, teniendo en cuenta, que el test de Wilconson, es un test que se basa en una ordenación de los datos y no en una cuantificación, como es el caso de este trabajo y partiendo de la base de que las muestras utilizadas son de gran tamaño $n_1 + n_2 > 30$, se han considerado todas las variables como normales y de muestras independientes, y aplicándoseles el test de Student, ya que al aplicar el test de Wilconson se perdería información al ser un test para muestras no paramétricas.

RESULTADOS OBTENIDOS

El análisis morfométrico llevado a cabo en los ovarios de embriones de pollo, sometidos a un estado de hipotiroidismo químico tras la administración de PTU. A través de diferentes fases del desarrollo embrionario (13, 15, 17 y 19 días) de incubación, y período de recién nacido (21 días).

Para ello hemos observado cortes transversales de ovarios de embriones tratados y controles, tanto a nivel de microscopía óptica como electrónica; así como un análisis previo del índice de mortalidad que han arrojado sobre los embriones las distintas dosis administradas. Aunque como hemos hecho constar en el capítulo anterior, el análisis morfométrico se ha realizado en los

embriones tratados con la dosis D, por ser la dosis de mortalidad media y de efectividad hipotiroidea apropiada.

TASA DE MORTALIDAD

Nuestra primera observación ha consistido en cuantificar la tasa de mortalidad de los embriones de pollo a partir de las 48 horas después de haber inyectado la primera dosis de las tres administradas, es decir, durante los días 9, 13, 15, 17, 19 y 21.

Para ello contamos con el número real de 268 huevos fecundados, divididos en cuatro lotes de 67 huevos cada uno para los controles, dosis B, C y D. En el siguiente cuadro se expresa la mortalidad acaecida.

DIAS DE INCUBACION	TRATADOS			CONTROLES
	Dosis B	Dosis C	Dosis D	
9	1	5	4	—
13	—	—	1	—
15	1	—	1	1
17	1	1	—	1
19	1	1	1	—
21	—	—	—	—
MORTALIDAD %	5,97 %	13,43 %	10,44 %	2,98 %

TASA DE MORTALIDAD

Los datos en ella presentados justifican la elección de la dosis D, ya que representan una mortalidad media (10,44 %) entre el 5,97 % de la dosis B y el 13,43 % de la C.

MICROSCOPIA OPTICA

Las observaciones fueron realizadas en cortes semifinos a nivel de microscopía óptica, para el estudio morfométrico de los siguientes parámetros relativos:

1.- La densidad de superficie de la medular referida a la gónada revela que solamente a los 17 días de incubación, los embriones tratados con PTU presentan este parámetro significativamente menor que el de los animales controles (Tabla I ; Gráfico I).

De los 13 a 15 días de incubación la densidad de superficie de la pars medular es ligeramente mayor en el tratado que en normal, sin embargo, desde este último período la densidad de superficie se separa considerablemente del control al hacerse significativamente menor en los embriones hipotiroideos para crecer posteriormente hasta el día 19, haciéndose ligeramente

Incubación Grupo	13 días		15 días		17 días		19 días		21 días	
	Contr.	PTU	Contr.	PTU	Contr.	PTU	Contr.	PTU	Contr.	PTU
X	0,0084	0,0085	0,0082	0,0081	0,0087	0,0076	0,0085	0,0089	0,0078	0,0079
S	0,0007	0,0007	0,0006	0,0007	0,0010	0,0009	0,0012	0,0008	0,0012	0,0013
n	48	66	58	53	62	47	55	38	51	42
Normalidad Dexp.	0,2722	0,2736	0,2641	0,2698	0,2743	0,2860	0,2855	0,2783	0,2852	0,2606
P	> 0,05	> 0,2	< 0,01	< 0,05	> 0,1	> 0,1	> 0,1	> 0,2	> 0,2	< 0,01
Fexp.	1,0000		1,3611		1,2346		2,2500		1,1736	
texp.	-0,7531		0,8101		5,9361		-1,9284		-0,1855	
P	NO SIGNIFICAT.		NO SIGNIFICAT.		SIGNIFICATIVO		NO SIGNIFICAT.		NO SIGNIFICAT.	
	P > 0,4		P > 0,4		P < 0,001		P < 0,1		P > 0,5	

TABLA I.- Densidad de superficie de la medular referida a la gónada
unidades: μm^{-1}

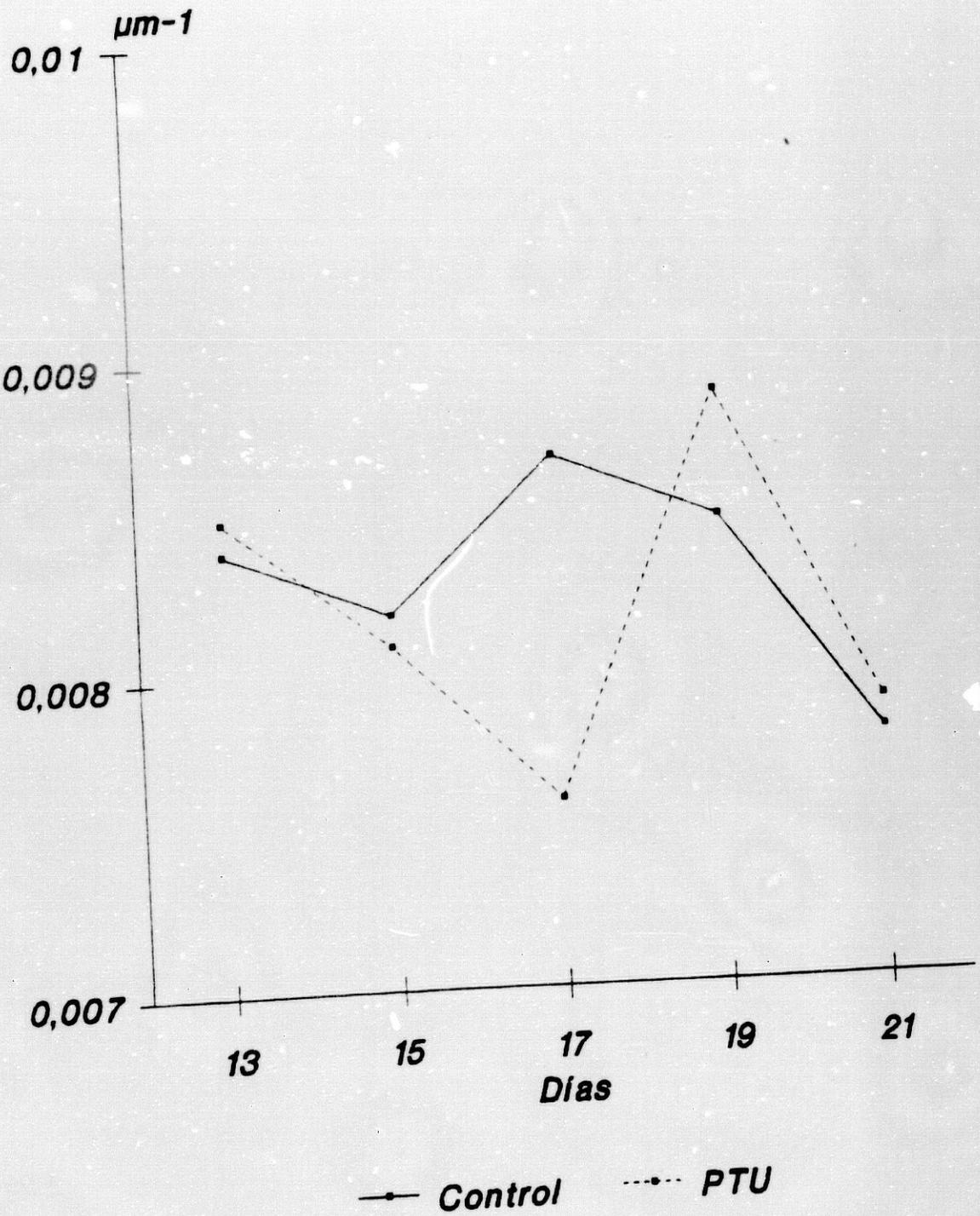


Gráfico I.- Densidad de superficie de la medular respecto a la gónada

superior al normal y sufrir una caída hasta el 21 en el que pasa a ser ligeramente inferior al que presenta el embrión tratado con PTU, aunque las diferencias no son significativas.

2.- La densidad de superficie del cortex referida a la gónada, da como resultado en los días 15, 19 y 21 unos parámetros que difieren considerablemente entre los tratados y los controles (Tabla II ; Gráfico II).

Mientras que en el día 15 y 21 de incubación la densidad de superficie del cortex de los embriones hipotiroideos es mayor que la que presentan los embriones controles con diferencias significativas de $P < 0,02$ y $P < 0,01$ respectivamente.

Sin embargo en el día 19 la densidad de superficie del cortex ovárico de los animales hipotiroideos presenta una disminución altamente significativa respecto a los controles ($P < 0,001$).

3.- Densidad de superficie de las células germinales respecto a la corteza (Tabla III ; Gráfico III).

Incubación	13 días		15 días		17 días		19 días		21 días	
	Contr.	PTU	Contr.	PTU	Contr.	PTU	Contr.	PTU	Contr.	PTU
\bar{X}	0,0050	0,0049	0,0043	0,0047	0,0059	0,0061	0,0059	0,0044	0,0056	0,0063
S	0,0,0,09	0,0009	0,0008	0,0009	0,0016	0,0012	0,0012	0,0009	0,0009	0,0015
n	48	66	58	53	62	47	55	38	51	42
Normalidad Dexp.	0,2774	0,2794	0,2815	0,2839	0,2490	0,2726	0,2846	0,2827	0,2727	0,2360
P	> 0,2	> 0,2	> 0,2	> 0,2	< 0,01	> 0,1	> 0,2	> 0,2	> 0,2	< 0,01
Fexp.	1,0000		1,2656		1,7777		1,7777		2,7777	
texp.	0,5857		-2,4808		-0,7457		11,4711		-2,6561	
P	NO SIGNIFICAT.	NO SIGNIFICAT.	SIGNIFICATIVO	SIGNIFICATIVO	NO SIGNIFICAT.	NO SIGNIFICAT.	SIGNIFICATIVO	SIGNIFICATIVO	SIGNIFICATIVO	SIGNIFICATIVO
	P > 0,5	P < 0,02	P < 0,02	P < 0,02	P > 0,4	P > 0,4	P < 0,001	P < 0,001	P < 0,01	P < 0,01

TABLA II.- Densidad de superficie del cortex referido a la gónada
unidades: μm^{-1}

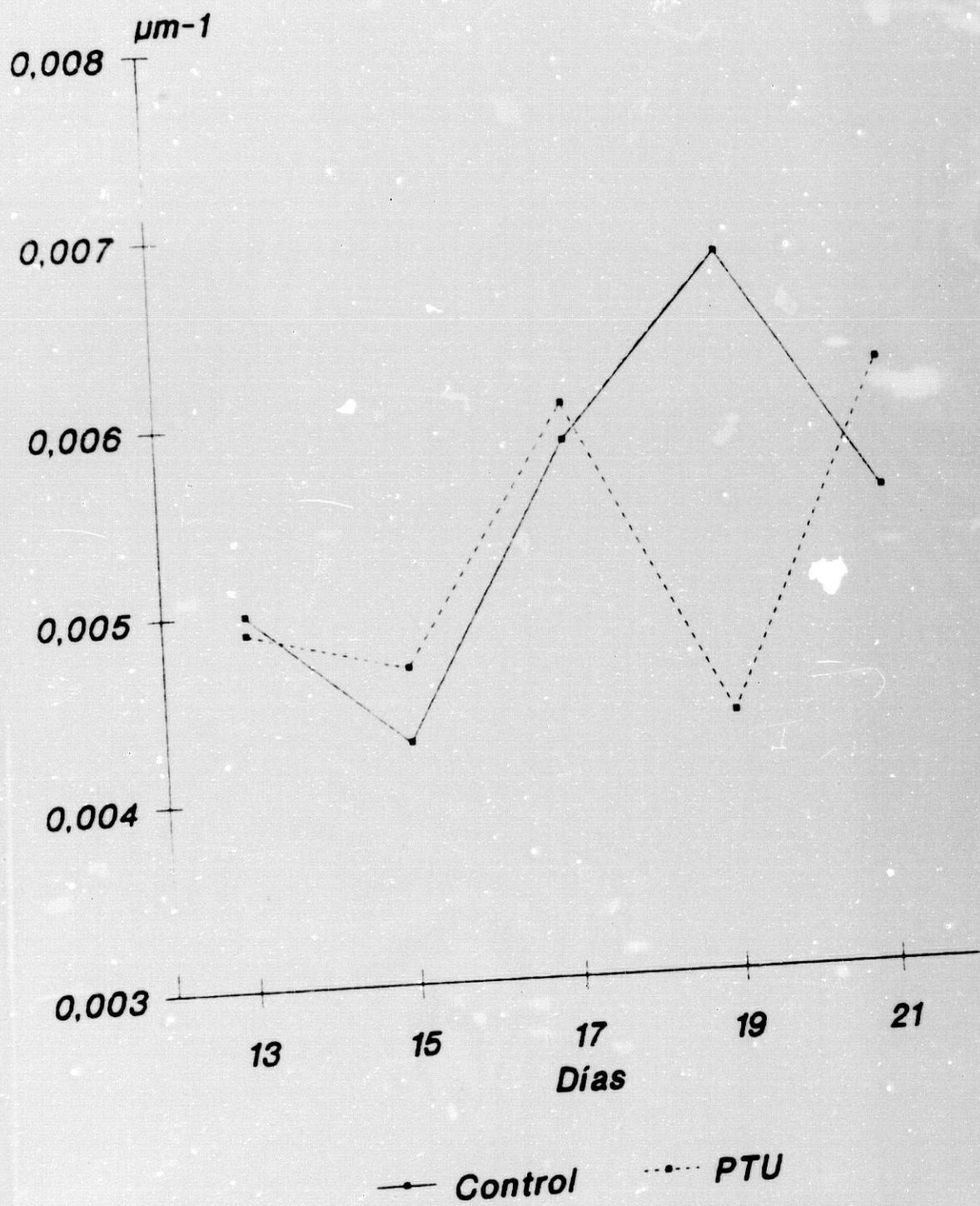


Gráfico II.- Densidad de superficie del cortex respecto a la gónada

La diferencia que presenta este parámetro respecto a los controles es altamente significativa durante los días 13 y 15 ($P < 0,001$) para después durante los días 19 y 21 ir descendiendo su significatividad ($P < 0,01$ y $P < 0,05$ respectivamente). Estas diferencias unas veces se expresan en aumentos del parámetro de los animales hipotiroideos con respecto al control y otras en disminución durante el transcurso del desarrollo embrionario.

De esta forma aparece este parámetro mayor en los hipotiroideos que en los controles en el día 13 ($P < 0,001$) y 21 ($P < 0,05$) de incubación; mientras que disminuye en los animales tratados durante los días 15 ($P < 0,001$) y 19 ($P < 0,01$) quedando el día 17 por encima del control con una diferencia no significativa.

4.- La densidad de superficie de las células no germinales respecto a la corteza.

Presenta un curso discontinuo como en el parámetro anterior pero en sentido inverso (Tabla IV ; Gráfico IV). Si en un principio, el día 13 de incubación, en los animales hipotiroideos este parámetro es mayor respecto al control con una diferencia significativa ($P < 0,02$);

Incubación	13 días		15 días		17 días		19 días		21 días	
	Contr.	PTU	Contr.	PTU	Contr.	PTU	Contr.	PTU	Contr.	PTU
\bar{X}	0,0222	0,0262	0,0268	0,0233	0,0245	0,0251	0,0295	0,0247	0,0279	0,0302
S	0,0036	0,0046	0,0047	0,0051	0,0054	0,0054	0,0064	0,0062	0,0056	0,0045
n	48	66	58	53	62	47	55	38	51	42
Normalidad Dexp.	0,2692	0,2786	0,2852	0,2679	0,2640	0,2695	0,2622	0,2791	0,2841	0,2830
P	< 0,5	> 0,2	> 0,2	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,01	> 0,2	> 0,2	> 0,2
Fexp.	1,6327		1,1774		1,0000		1,0655		1,5486	
texp.	-5,2048		-3,7675		-0,5751		3,6023		1,5486	
	f 111								f 91	
P	SIGNIFICATIVO	SIGNIFICATIVO	SIGNIFICATIVO	SIGNIFICATIVO	NO SIGNIFICAT.	SIGNIFICATIVO	SIGNIFICATIVO	SIGNIFICATIVO	SIGNIFICATIVO	P < 0,05
	P < 0,001	P < 0,001	P < 0,001	P > 0,05	P > 0,05	P < 0,01	P < 0,01	P < 0,05		

TABLA III.- Densidad de superficie de las células germinales referida a la corteza
unidades: μm^{-1}

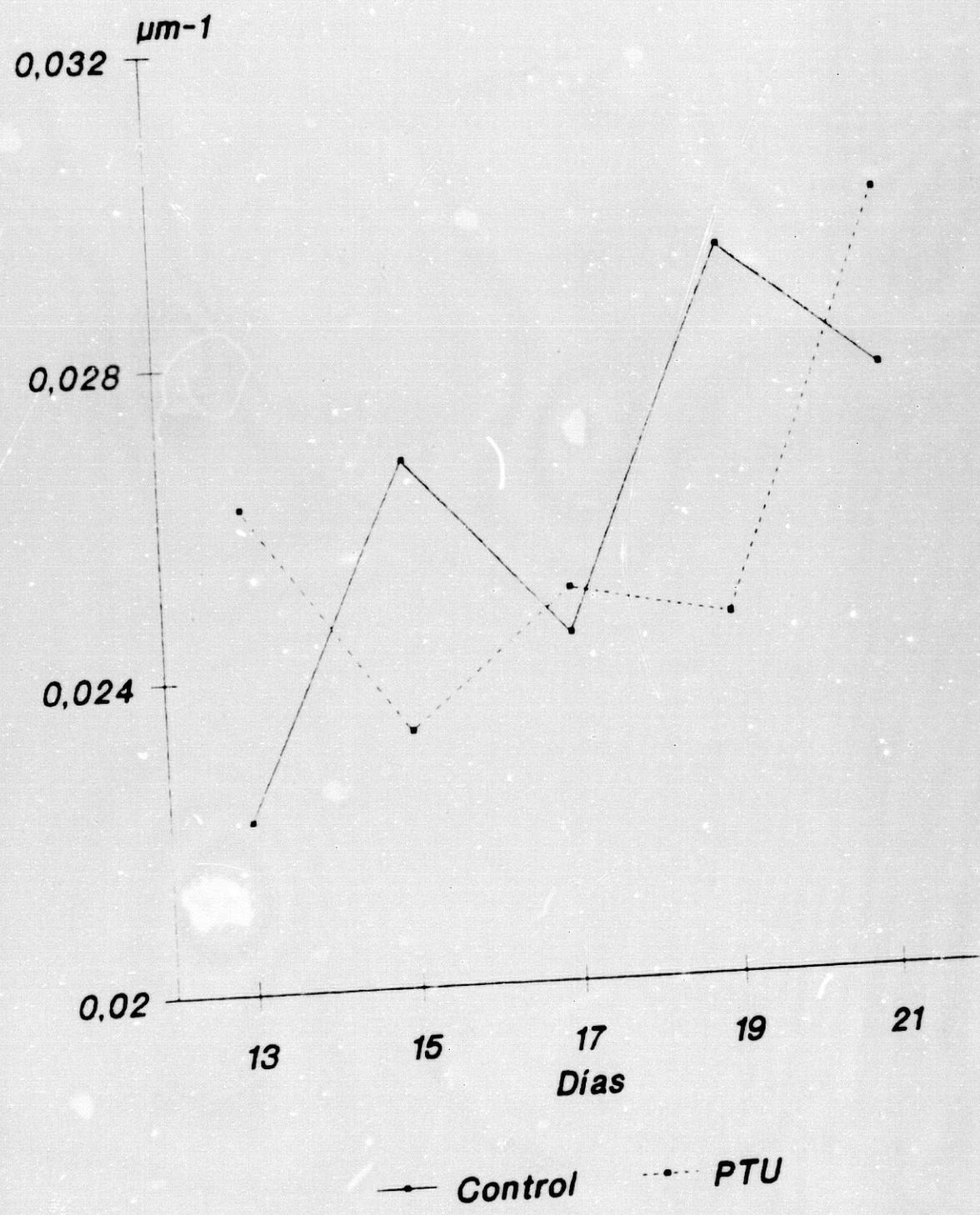


Gráfico III.- Densidad de superficie de las células germinales respecto a la corteza

aumento, que se mantiene en el día 15 ($P < 0,05$); sin embargo, en el día 17 se hace menor que el control ($P < 0,01$) para después aumentar respecto a los controles hacia el día 19 ($P < 0,05$) y caer bruscamente hacia el período de recién nacido (día 21); descendiendo incluso por debajo del parámetro control aunque con diferencias no significativas.

5.- Densidad de volumen de la medular referida a la gónada. Este parámetro es mayor en las gónadas de los embriones hipotiroideos respecto a los controles, en el día 13 y 19 de incubación, mientras que se hace menor en los días 17 y 21 (Tabla V ; Gráfico V).

En el día 13 el aumento que presenta este parámetro respecto al control es significativo ($P < 0,01$) y en el día 19 altamente significativo ($P < 0,001$). Sin embargo es menor que el control con una diferencia significativa ($P < 0,01$) en el día 17, mientras que la disminución que experimenta hacia el día 21 no presenta una diferencia significativa. En el día 15 este parámetro es prácticamente igual tanto en testigos como en controles.

Incubación Grupo	13 días		15 días		17 días		19 días		21 días	
	Contr.	PTU	Contr.	PTU	Contr.	PTU	Contr.	PTU	Contr.	PTU
\bar{x}	0,0162	0,0176	0,0158	0,0169	0,0197	0,0170	0,0187	0,0206	0,0168	0,0170
S	0,0022	0,0035	0,0027	0,0026	0,0068	0,0032	0,0032	0,0055	0,0034	0,0038
n	48	66	58	53	62	47	55	38	51	42
Normalidad Dexp.	0,2772	0,2762	0,2749	0,2799	0,2205	0,2826	0,2810	0,2421	0,2811	0,2254
P	> 0,2	> 0,2	> 0,1	> 0,2	< 0,01	> 0,2	> 0,2	< 0,01	> 0,2	< 0,01
Fexp.	2,5309		1,0784		4,5156		2,9541		1,2491	
texp.	-2,6158 f 110		-2,1879		4,5156 f 91		2,9541 f 54		1,2491	
P	SIGNIFICATIVO P < 0,02	SIGNIFICATIVO	SIGNIFICATIVO P < 0,05	SIGNIFICATIVO	SIGNIFICATIVO P < 0,01	SIGNIFICATIVO	NO SIGNIFICATIVO P > 0,05	NO SIGNIFICATIVO	NO SIGNIFICATIVO P > 0,5	

TABLA IV.- Densidad de superficie de las células no germinales referida a la corteza
unidades: μm^{-1}

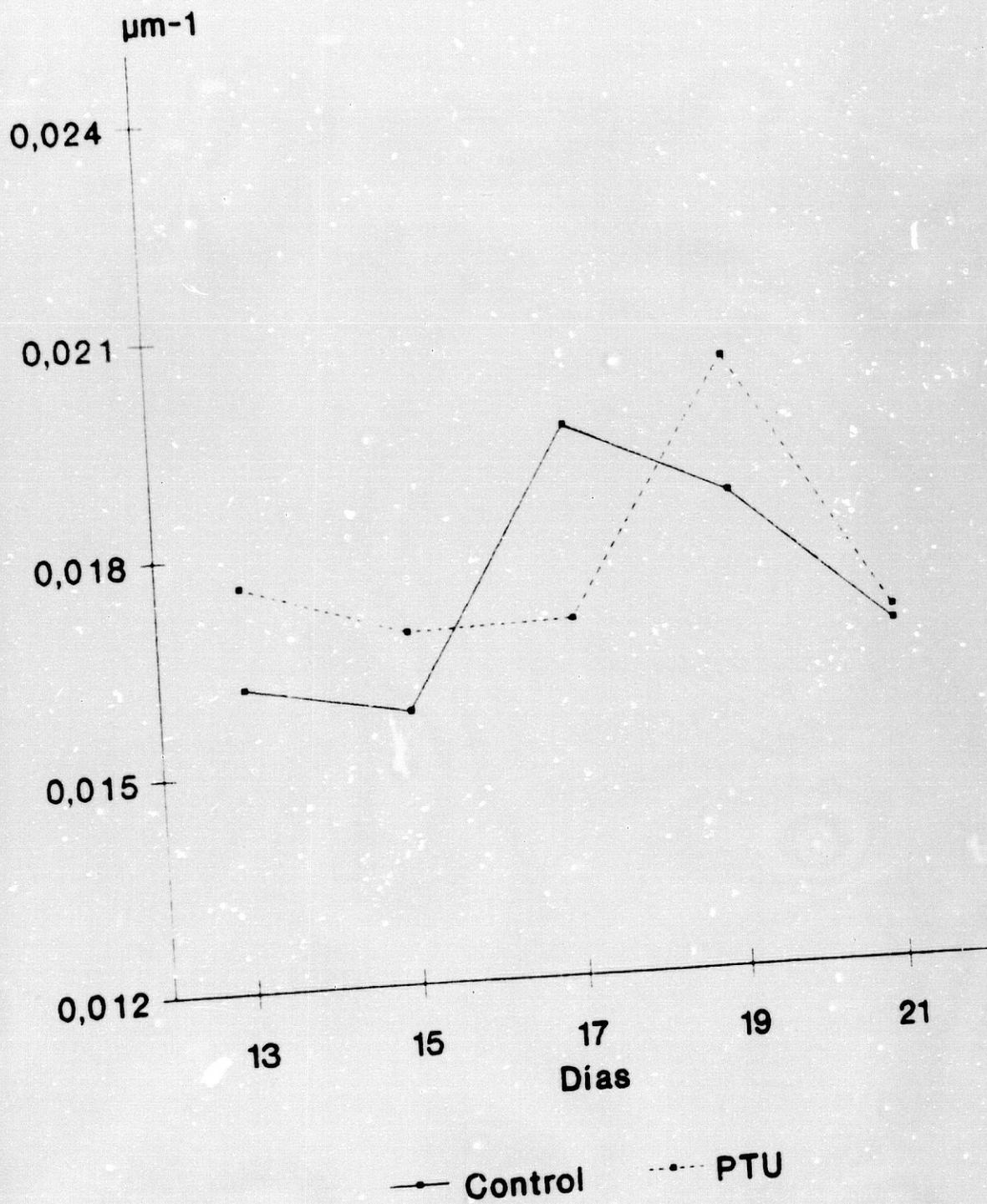


Gráfico IV.- Densidad de superficie de las células no germinales respecto a la corteza

Incubación	13 días		15 días		17 días		19 días		21 días	
	Contr.	TU	Contr.	PUU	Contr.	PTU	Contr.	PTU	Contr.	PTU
X	0,6911	0,7178	0,7258	0,7220	0,6901	0,6387	0,6204	0,7808	0,6505	0,6290
S	0,0553	0,0486	0,0425	0,0420	0,0505	0,0629	0,0734	0,0422	0,0775	0,0449
n	48	66	58	53	62	47	55	38	51	42
Normalidad Dexp.	0,2774	0,2821	0,2758	0,2746	0,2520	0,2840	0,2830	0,2767	0,2866	0,2799
P	> 0,2	> 0,2	> 0,2	> 0,1	< 0,01	> 0,2	> 0,2	> 0,2	> 0,05	> 0,2
Fexp.	1,2947		1,0239		1,5513		3,0252		2,9279	
terp.	-2,7341		0,4739		1,5513 f 86		-13,328 f 88		1,6698 f 82	
P	SIGNIFICATIVO P < 0,01	NO SIGNIFICATIVO P > 0,5	SIGNIFICATIVO P < 0,001	NO SIGNIFICATIVO P < 0,1	NO SIGNIFICATIVO P < 0,1	NO SIGNIFICATIVO P < 0,1				

TABLA V.- Densidad de volumen de la medular referida a la gónada
unidades: μm^3

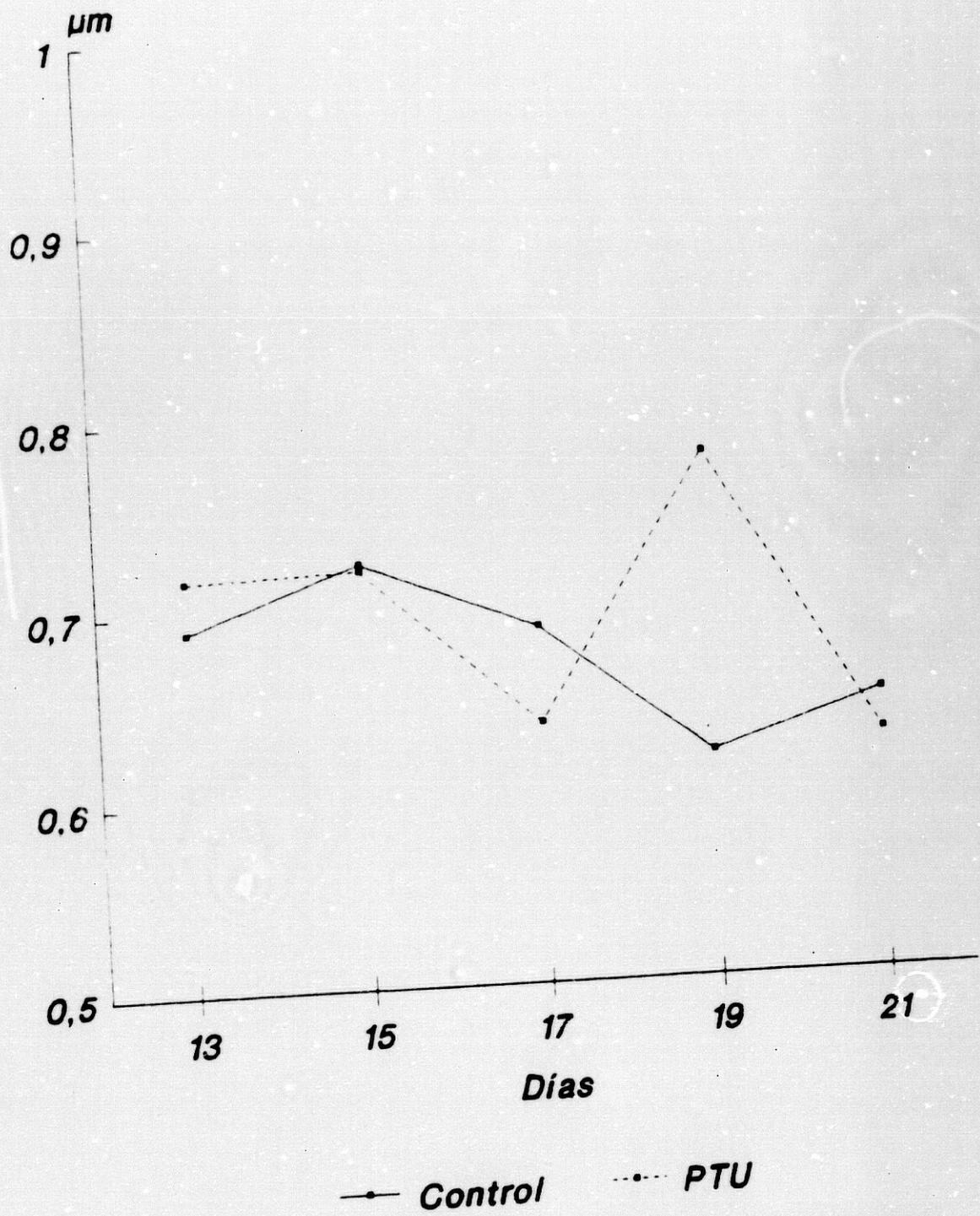


Gráfico V.- Densidad de volumen de la medular respecto a la corteza

6.- Densidad de volumen de la corteza con respecto a la gónada (Tabla VI ; Gráfico VI).

En este caso la densidad de volumen en animales hipotiroideos es inferior respecto a los controles en el día 13 ($P < 0,01$) y en el día 19 presenta una significatividad ($P < 0,001$) mientras que este parámetro es mayor respecto a los controles los días 17 con significatividad ($P < 0,001$) y el día 21 con menor significatividad ($P < 0,05$). Como en casos anteriores este parámetro es prácticamente igual en los controles y tratados en el día 15 de desarrollo.

7.- Densidad de volumen de las células germinales con respecto a la corteza.

Como puede verse (Tabla VII ; Gráfico VII) este parámetro se presenta prácticamente en los animales hipotiroideos inferior al de los controles durante todo el desarrollo embrionario; mostrando dicha disminución más ó menos significatividad respecto a los controles. El día 15 esta disminución de la densidad de volumen en los hipotiroideos es altamente significativa ($P < 0,001$); no lo es durante el día 17 para serlo de nuevo

Incubación Grupo	13 días		15 días		17 días		19 días		21 días	
	Contr.	PTU	Contr.	PTU	Contr.	PTU	Contr.	PTU	Contr.	PTU
\bar{X}	0,3089	0,2822	0,2742	0,2753	0,3097	0,3616	0,3766	0,2196	0,3464	0,3720
S	0,0553	0,0486	0,0425	0,0429	0,0504	0,0633	0,0720	0,0427	0,0770	0,0453
n	48	66	58	53	62	47	55	38	51	42
Normalidad Dexp.	0,2774	0,2821	0,2758	0,2736	0,2515	0,2840	0,2825	0,2769	0,2872	0,2800
P	> 0,2	> 0,2	> 0,2	> 0,1	< 0,01	> 0,2	> 0,2	> 0,2	< 0,02	> 0,2
Fexp.	1,2947		1,0189		1,5771		2,8432		2,8892	
texp.	2,7342		-0,1357		-4,6195		13,1642		-1,9923	
P	SIGNIFICATIVO P < 0,01		NO SIGNIFICAT. P > 0,5		SIGNIFICATIVO P < 0,001		SIGNIFICATIVO P < 0,001		SIGNIFICATIVO P < 0,05	

TABLA VI.- Densidad de volumen de la gónada referida a la gónada
unidades: μm^3

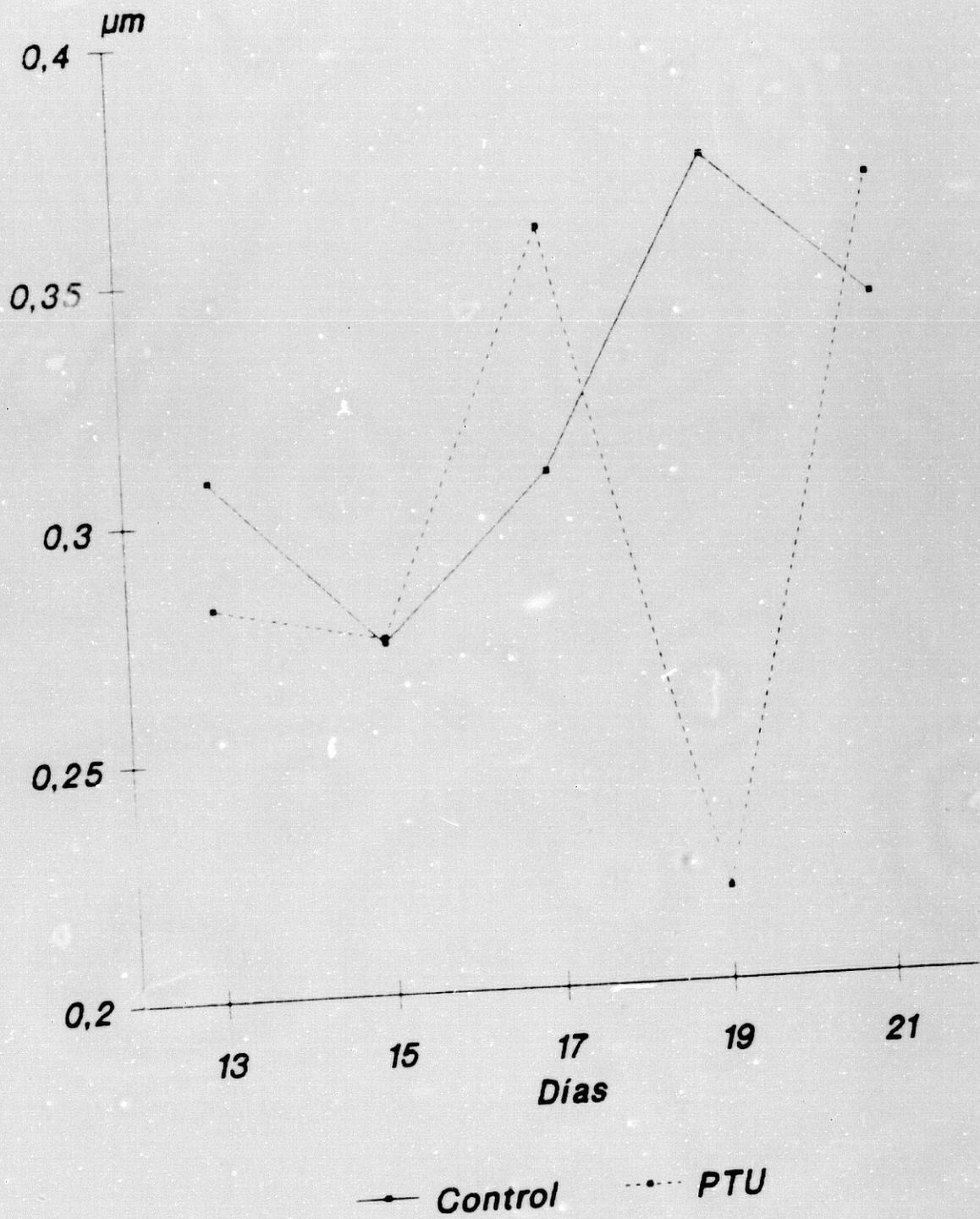


Gráfico VI.- Densidad de volumen de la corteza respecto a la gónada

el día 19 ($P < 0,05$) y en el recién nacido son prácticamente iguales aunque ligeramente menor respecto a los controles.

8.- Densidad de volumen de las células no germinales referidas a la corteza. Este parámetro es mayor en los tratados respecto a los controles en todos los días estudiados del desarrollo embrionario (Tabla VIII ; Gráfico VIII), aunque en los días 13 y 17 las diferencias no son significativas.

El aumento de este parámetro en los animales tratados presenta en el día 15 una diferencia altamente significativa ($P < 0,001$) respecto a los controles, mientras que estas diferencias van siendo menores conforme se va acercando el embrión al período de recién nacido (día 19: $P < 0,02$ y día 21: $P < 0,05$).

MICROSCOPIA ELECTRONICA

A nivel ultraestructural hemos observado los parámetros estereológicos relativos y absolutos del ovocito.

Incubación	13 días		15 días		17 días		19 días		21 días	
	Contr.	PTU	Contr.	PTU	Contr.	PTU	Contr.	PTU	Contr.	PTU
X	0,4413	0,4568	0,4843	0,4296	0,4706	0,4634	0,5789	0,5329	0,6060	0,5965
S	0,0493	0,0842	0,0698	0,0822	0,0853	0,0670	0,1040	0,0919	0,0907	0,0824
n	48	66	58	53	62	47	55	38	51	42
Normalidad Dexp.	0,2716	0,2803	0,2814	0,2859	0,2859	0,2728	0,2829	0,2685	0,2798	0,2665
P	> 0,05	> 0,2	> 0,2	> 0,1	> 0,1	> 0,1	> 0,2	> 0,05	> 0,2	< 0,05
Fexp.	2,9169		1,3869		1,6208		1,2806		1,2116	
texp.	-1,2329		3,7895		0,4935		2,1972		0,5240	
	f 107		f 107							
P	NO SIGNIFICAT.	NO SIGNIFICAT.	SIGNIFICATIVO	SIGNIFICATIVO	NO SIGNIFICAT.	NO SIGNIFICAT.	SIGNIFICATIVO	SIGNIFICATIVO	NO SIGNIFICAT.	P > 0,5
	P > 0,2	P > 0,2	P < 0,001	P < 0,001	P > 0,5	P > 0,5	P < 0,05	P < 0,05	P > 0,5	P > 0,5

TABLA VII.- Densidad de volumen de las células germinales con respecto a la corteza
unidades: μm^3

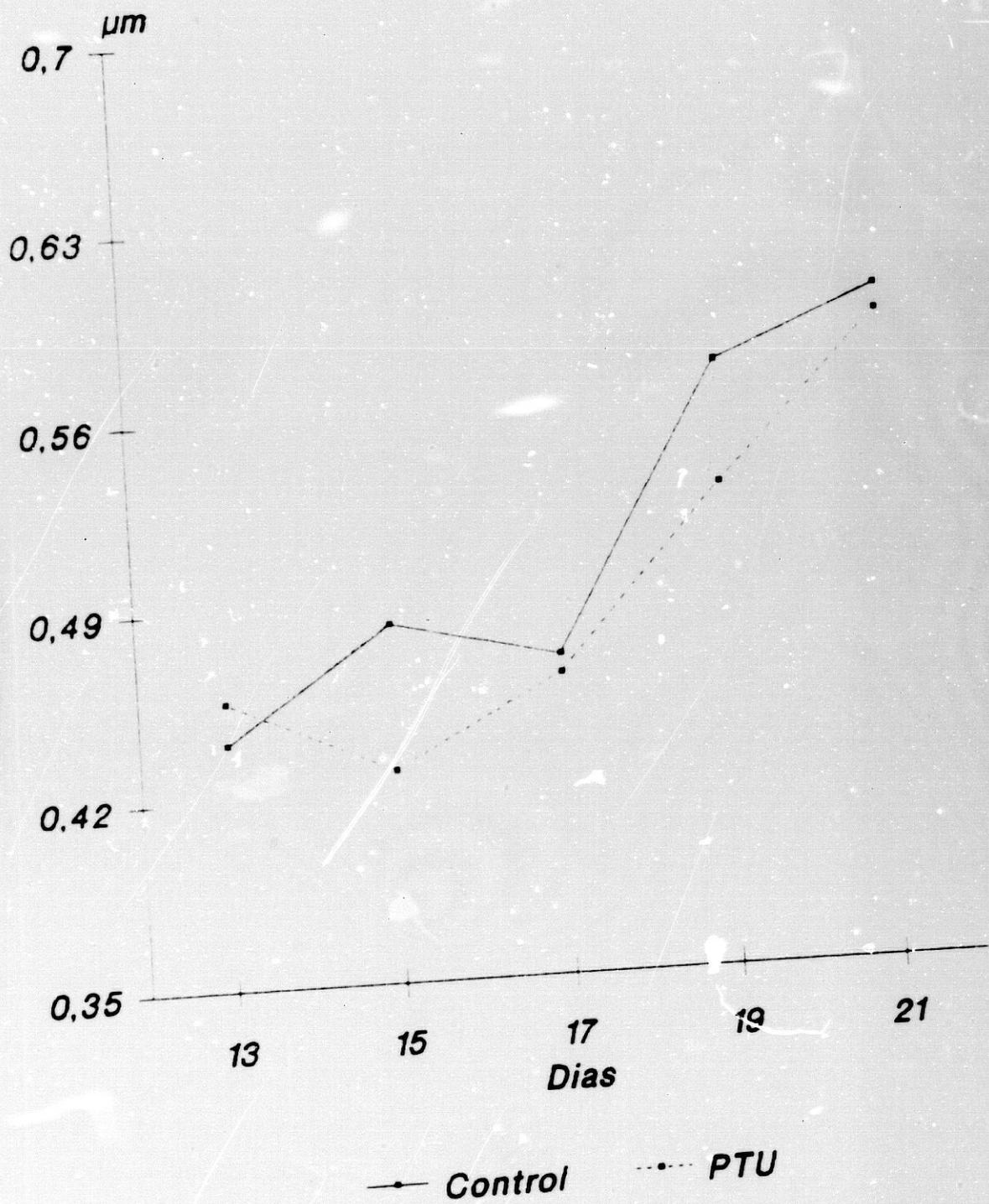


Gráfico VII.- Densidad de volumen de las células germinales respecto a la corteza

Incubación	13 días		15 días		17 días		19 días		21 días	
	Contr.	PTU	Contr.	PTU	Contr.	PTU	Contr.	PTU	Contr.	PTU
Grupo										
X	0,5599	0,5676	0,5155	0,5798	0,5294	0,5480	0,4217	0,4690	0,3890	0,4274
S	0,0483	0,1140	0,0698	0,0968	0,0848	0,0864	0,1001	0,0850	0,0909	0,0996
n	48	66	58	53	62	47	55	38	51	42
Normalidad										
Dexp.	0,2733	0,2492	0,2815	0,2676	0,2859	0,2513	0,2845	0,2662	0,2802	0,2495
P	> 0,1	< 0,01	> 0,2	> 0,2	> 0,1	< 0,01	> 0,2	< 0,5	> 0,2	< 0,01
Fexp.	5,5700		1,9232		1,0380		1,3868		1,2005	
texp.	-0,4914 f 93		-3,9816 f 94		-1,1248		-2,3795		-1,9414	
P	NO SIGNIFICAT. P > 0,5	SIGNIFICATIVO P < 0,001	NO SIGNIFICAT. P > 0,2	SIGNIFICATIVO P < 0,02	NO SIGNIFICAT. P > 0,2	SIGNIFICATIVO P < 0,02	SIGNIFICATIVO P < 0,05	SIGNIFICATIVO P < 0,02	SIGNIFICATIVO P < 0,05	SIGNIFICATIVO P < 0,05

TABLA VIII.- Densidad de volumen de las células no germinales con respecto a la corteza:
unidades: μm^3

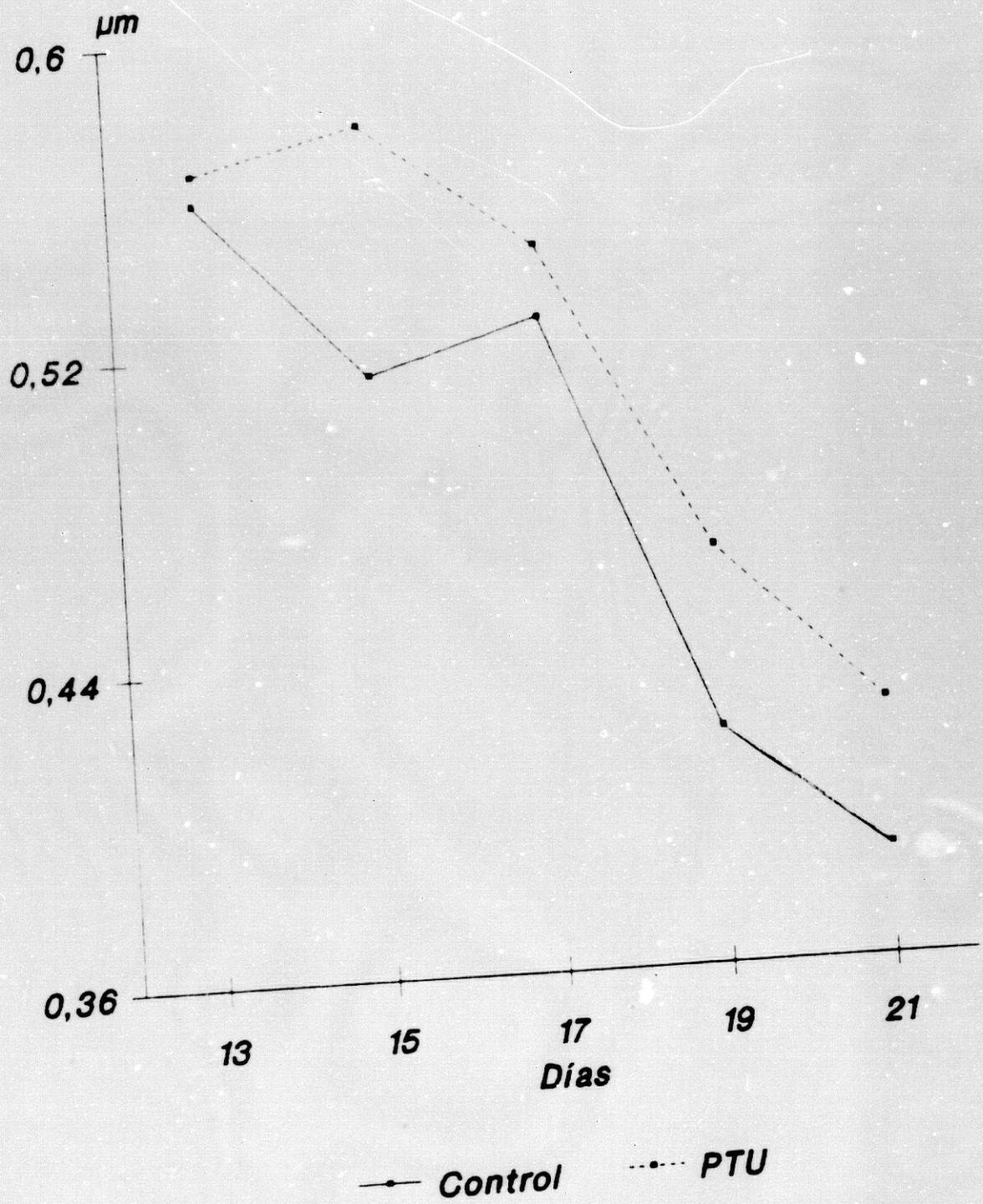


Gráfico VIII.- Densidad de volumen de las células no germinales respecto a la corteza

A.- PARAMETROS RELATIVOS

1.- Densidad de superficie del ovocito respecto a la foto. Este parámetro se muestra en los animales tratados inferior al de los animales controles durante todo el curso de desarrollo embrionario estudiado (Tabla IX ; Gráfico IX). Esta disminución es altamente significativa durante los días 15, 17, 19 y 21 de desarrollo ($P < 0,001$); mientras que el día 13 de incubación, primero de los por nosotros estudiados, muestra una significatividad menor ($P < 0,05$).

El comportamiento que sigue este parámetro en los animales hipotiroideos respecto a los controles, es el de disminución progresiva respecto a los controles desde el 13 al 17 día, sin embargo, a partir de esta fecha este parámetro en los tratados parece intentar aproximarse hasta los 21 días al parámetro de los controles, aunque como hemos comentado antes las diferencias en esta última etapa siguen siendo altamente significativas.

2.- Densidad de superficie del núcleo respecto a la foto. El comportamiento de este parámetro de los animales

Incubación	13 días		15 días		17 días		19 días		21 días	
	Contr.	PTU								
\bar{X}	0,1715	0,1562	0,1948	0,1548	0,2290	0,1564	0,2613	0,1807	0,2561	0,2112
S	0,0401	0,0404	0,0433	0,0281	0,0484	0,0420	0,0474	0,0298	0,0532	0,0293
n	45	45	45	45	45	45	45	45	45	45
Normalidad	0,2866	0,2857	0,2845	0,2848	0,2761	0,2847	0,2729	0,2822	0,2781	0,2830
Dexp.	> 0,05	> 0,1	> 0,1	> 0,2	> 0,2	> 0,2	> 0,2	> 0,2	> 0,2	> 0,2
P	0,9852		2,3744		1,3297		2,5300		3,2967	
Fexp.	1,8031		5,1982		7,6059		9,6568		4,9592	
texp.			f 75				f 74		f 68	
P	SIGNIFICATIVO									
	P < 0,05	P < 0,001								

TABLA IX.- Densidad de superficie del ovocito referida a la foto
unidades: μm^{-1}

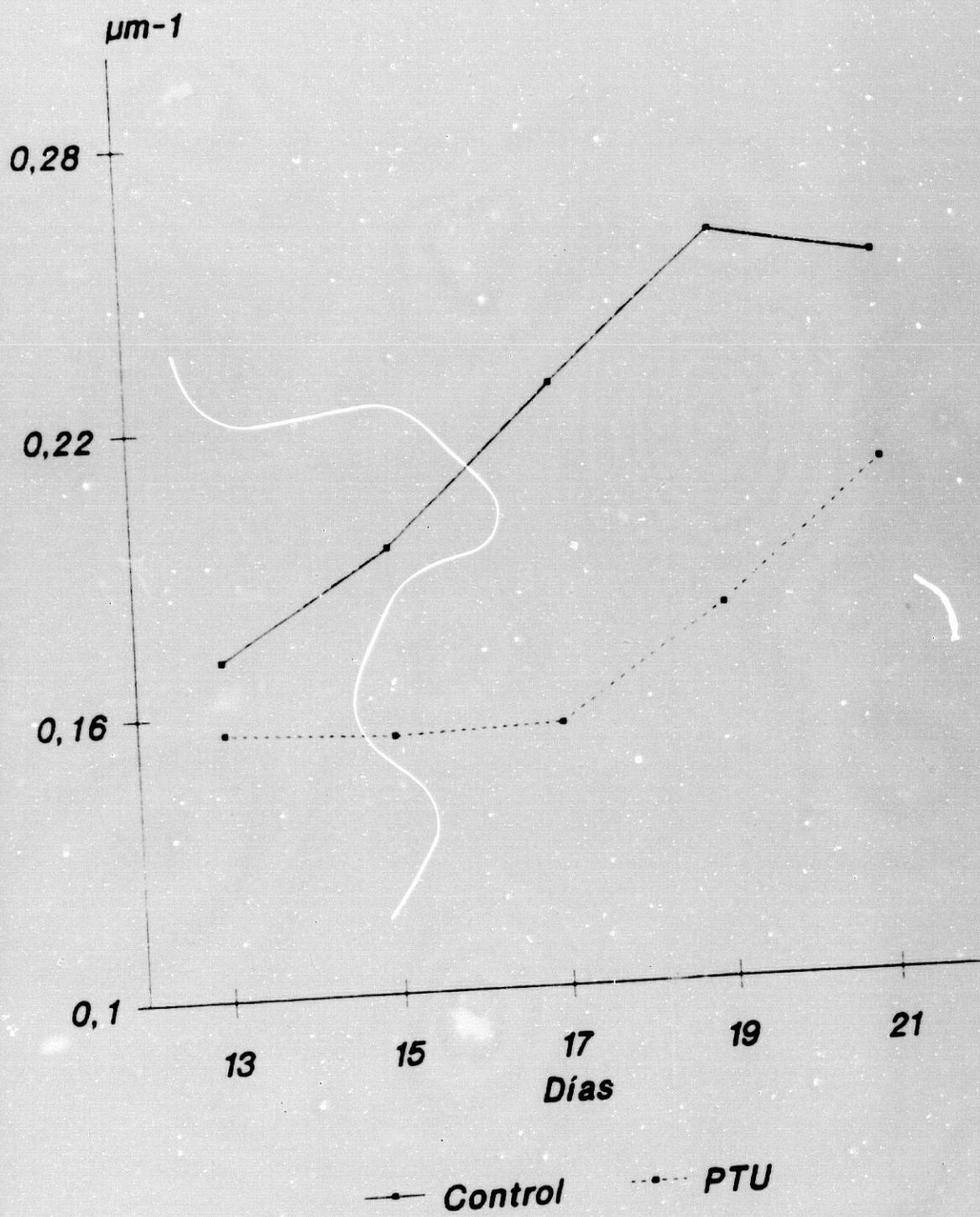


Gráfico IX.- Densidad de superficie del ovocito respecto a la foto

hipotiroideos respecto a los controles sigue unas directrices exactamente iguales al caso anterior desde el día 13 al 19. Es decir, es significativamente menor en los ovocitos de los embriones tratados, el día 13 con una diferencia significativa ($P < 0,05$) y después, en los días 15, 17 y 19 de incubación esta diferencia es altamente significativa ($P < 0,001$). Por lo que respecta al día 21 la densidad de superficie del núcleo de los animales tratados es menor que la de los controles con una diferencia significativa de $P < 0,01$, en este caso como se puede observar (Tabla X ; Gráfico X) el comportamiento de la densidad de superficie nuclear en los animales hipotiroideos presenta una imagen respecto a los controles semejante a la densidad de superficie celular, con la única diferencia de que la tendencia que presenta este parámetro en el día 21 de acercamiento al control, lo hace de forma un poco más acusada.

3.- Densidad de superficie de las mitocondrias referidas al citoplasma. Tabla XI ; Gráfico XI.

La característica de este parámetro en los animales hipotiroideos es la de ser inferior al que presentan los controles, durante todo el proceso embrionario por

Incubación	13 días		15 días		17 días		19 días		21 días	
	Contr.	PTU	Contr.	PTU	Contr.	PTU	Contr.	PTU	Contr.	PTU
\bar{X}	0,1091	0,1002	0,1137	0,0951	0,1374	0,0919	0,1527	0,1045	0,1478	0,1207
S	0,0269	0,0234	0,0269	0,0142	0,0321	0,0206	0,0246	0,0208	0,0420	0,0346
n	45	45	45	45	45	45	45	45	45	45
Normalidad Dexp.	0,2853	0,2763	0,2793	0,2729	0,2803	0,2836	0,2848	0,2761	0,2811	0,2820
P	> 0,2	> 0,2	> 0,2	> 0,1	> 0,2	> 0,2	> 0,2	> 0,2	> 0,2	> 0,2
Fexp.	1,1855		3,5886		2,4281		1,3987		1,4734	
texp.	1,6739		4,1019 f 67		8,0024 f 75		10,045		3,3407 f 85	
P	SIGNIFICATIVO P < 0,05		SIGNIFICATIVO P < 0,001		SIGNIFICATIVO P < 0,001		SIGNIFICATIVO P < 0,001		SIGNIFICATIVO P < 0,01	

TABLA X.- Densidad de superficie de superficie del núcleo del ovocito referida a la foto
unidades: μm^{-1}

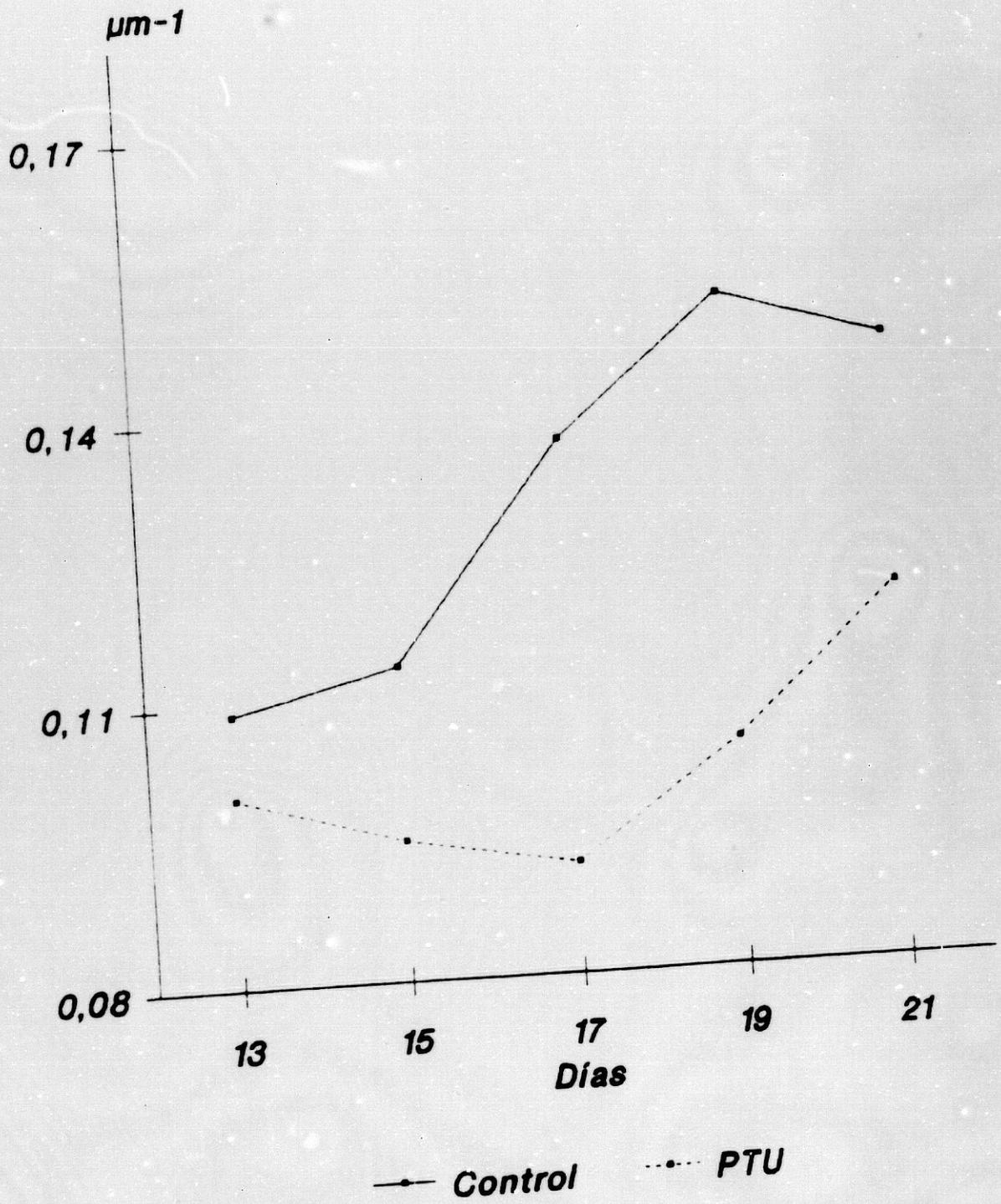


Gráfico X.- Densidad de superficie del núcleo del ovocito respecto a la foto

nosotros estudiado. Esta disminución es altamente significativa ($P < 0,001$), separándose del normal unas veces, y otras, intentando acercarse sin lograrlo.

4.- Densidad numérica de las mitocondrias referidas al citoplasma, podemos decir exactamente lo mismo que en el caso anterior (Tabla XII ; Gráfico XII). En todos los días estudiados este parámetro en los animales hipotiroideos, es ostensiblemente inferior respecto a los controles ($P < 0,001$), siguiendo un curso casi plano hasta el día 19 para intentar alcanzar el ritmo de crecimiento que manifiestan los controles.

5.- Densidad de volumen del ovocito con respecto a la foto. (Tabla XIII ; Gráfico XIII).

También este parámetro se manifiesta inferior en los tratados respecto a los controles durante todo el período de incubación. Sin embargo, las diferencias entre ambos no presentan el mismo grado de significatividad en todos los días estudiados. Así, mientras que en el día 13 y 21 de desarrollo las diferencias significativas son de $P < 0,01$ y $P < 0,02$

Incubación	13 días		15 días		17 días		19 días		21 días	
	Contr.	PTU								
\bar{X}	2,3611	1,2668	2,8212	1,7408	2,7379	1,4080	2,7200	1,3560	2,5235	1,6569
S	0,5128	0,4345	1,0569	0,5018	0,7932	0,4692	0,8433	0,3747	0,9052	0,6123
n	36	36	36	36	36	36	36	36	36	36
Normalidad Dexp.	0,2781	0,2246	0,2578	0,2814	0,2743	0,2668	0,2737	0,2803	0,2828	0,2751
P	> 0,2	> 0,2	> 0,2	> 0,1	> 0,2	> 0,2	> 0,2	> 0,2	> 0,2	> 0,2
Fexp.	1,3928		4,4361		2,8579		5,0652		2,1860	
texp.	9,7682		5,5406 f 50		8,6583 f 57		8,8690 f 48		4,7579 f 61	
P	SIGNIFICATIVO P < 0,001									

TABLA XI.- Densidad de superficie de las mitocondrias referida al citoplasma
unidades: μm^{-1}

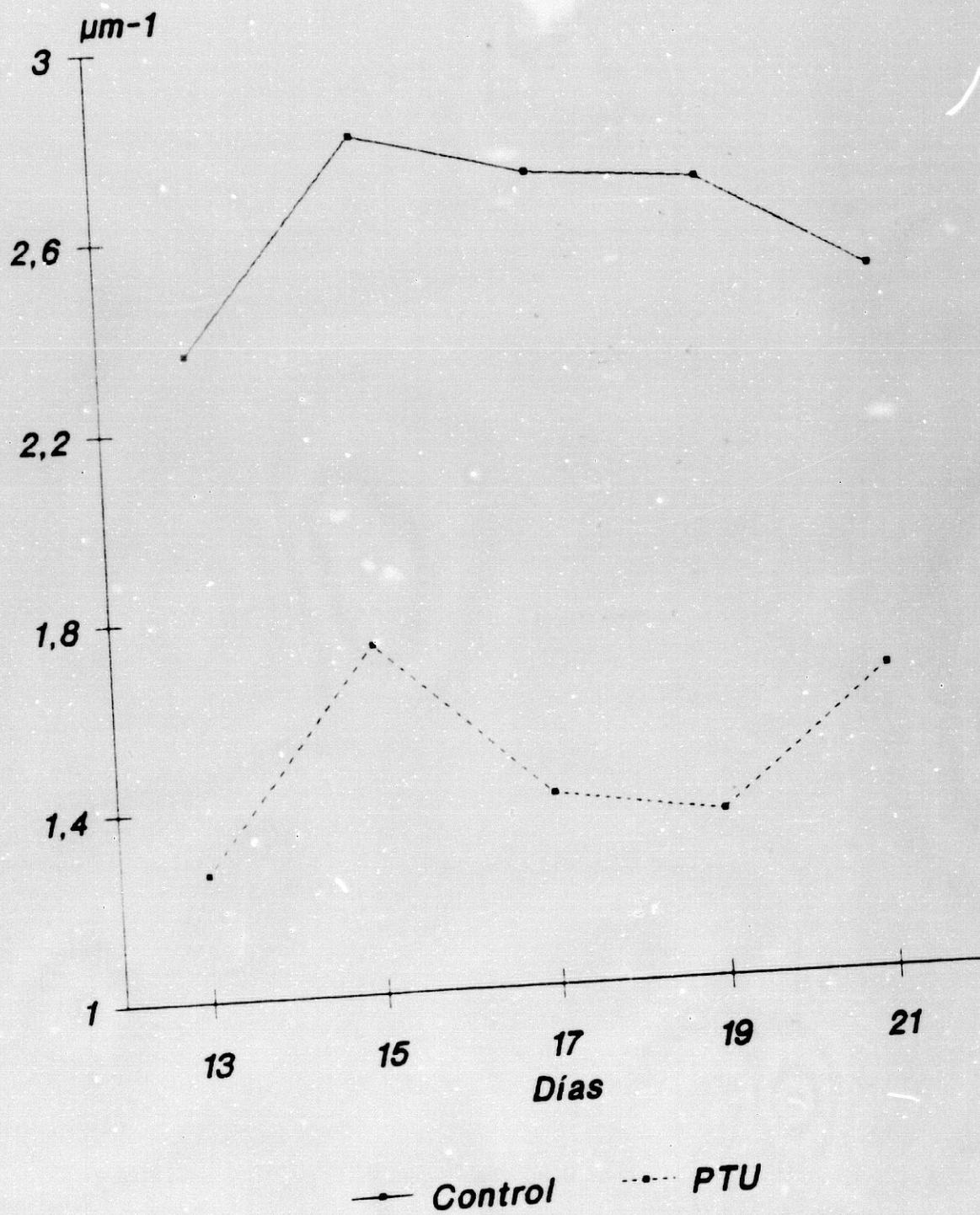


Gráfico XI.- Densidad de superficie de las mitocondrias referida al citoplasma

Incubación	13 días		15 días		17 días		19 días		21 días	
	Contr.	PTU								
X	4,2280	2,0788	7,3625	2,2328	6,1242	2,2159	7,6062	2,4079	9,3618	3,8075
S	1,4341	0,7698	5,1488	0,6539	2,9341	1,3048	3,2635	0,9281	4,9195	2,1310
n	36	36	36	36	36	36	36	36	36	36
Normalidad	0,2801	0,2825	0,2491	0,2868	0,2725	0,2642	0,2795	0,2807	0,2794	0,2741
Dexp.	> 0,2	> 0,2	< 0,01	< 0,05	> 0,1	< 0,02	> 0,2	> 0,2	> 0,2	> 0,2
P	3,4700		61,999		5,0566		12,365		5,3293	
Fexp.	7,9226		5,9300		7,3026		9,1930		6,2160	
texp.	f 54		f 36		f 48		f 41		f 48	
P	SIGNIFICATIVO									
	P < 0,001		P < 0,001		P < 0,001		P < 0,001		P < 0,001	

TABLA XII.- Densidad numérica de las mitocondrias referida al citoplasma
unidades: μm^{-3}

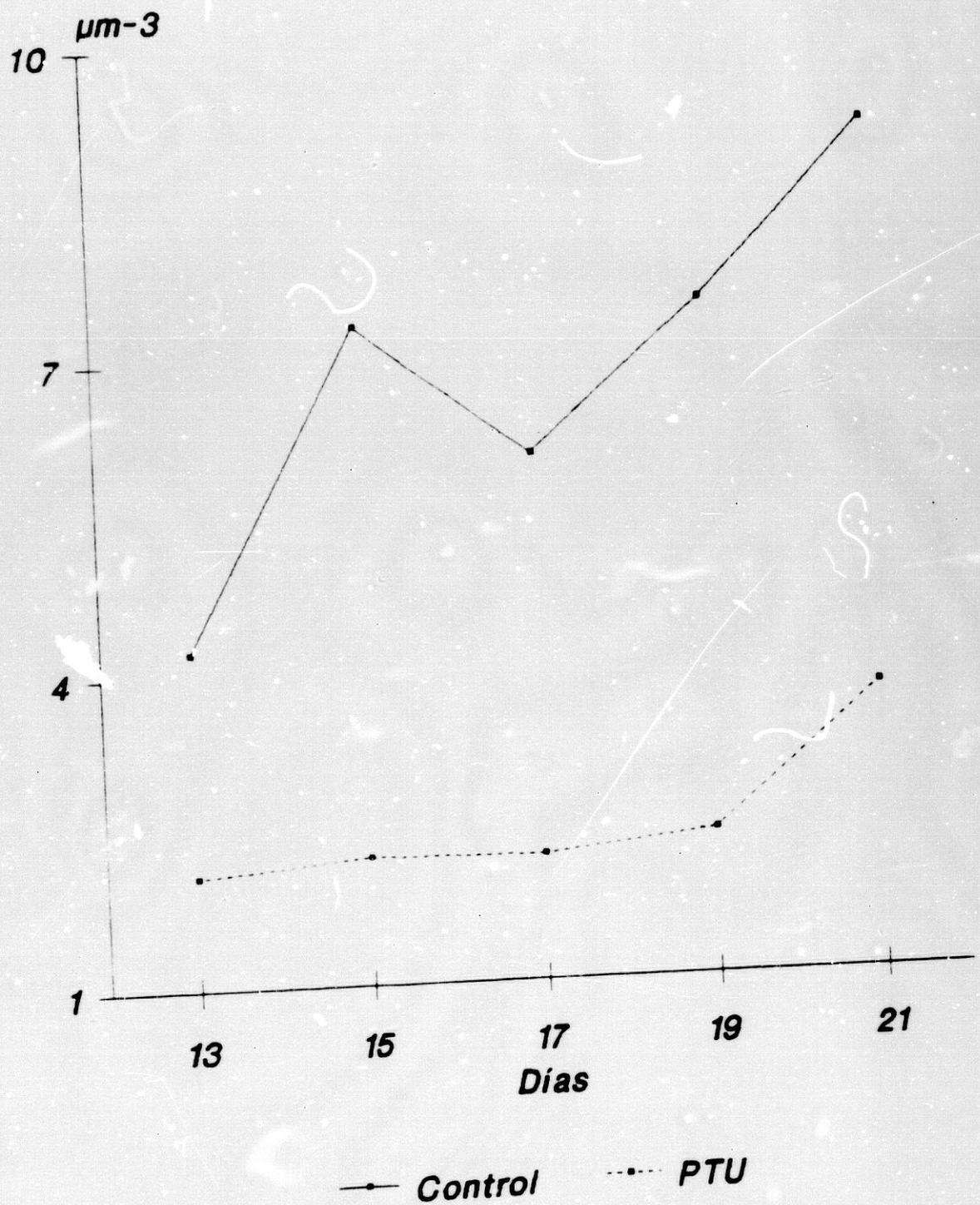


Gráfico XII.- Densidad numérica de las mitocondrias referida al citoplasma

respectivamente. Los días 15, 17 y 19 presentan una diferencia altamente significativa ($P < 0,001$) con respecto a los controles. En el día 21 de desarrollo este parámetro también presenta tendencia de acercamiento en los tratados respecto a los controles, proceso que se inicia desde el día 19.

6.- Densidad de volumen del núcleo respecto a la foto. El comportamiento de este parámetro durante todos los días de desarrollo es prácticamente igual que en la densidad de volumen celular. (Tabla XIV ; Gráfico XIV), con semejantes significatividades respecto a los días estudiados que en el caso anterior.

7.- Densidad de volumen del citoplasma con respecto a la foto (Tabla XV ; Gráfico XV).

Otro tanto podemos decir del comportamiento de este parámetro, ya que, en los animales tratados presentan diferencias altamente significativas en cuanto a su disminución respecto a los controles durante los días 15, 17 y 19 de incubación ($P < 0,001$), mientras que los días 13 y 21 presentan unas diferencias significativas

Incubación	13 días		15 días		17 días		19 días		21 días	
	Contr.	PTU	Contr.	PTU	Contr.	PTU	Contr.	PTU	Contr.	PTU
Grupo										
\bar{X}	0,1428	0,1127	0,2112	0,1065	0,2531	0,1207	0,2953	0,1396	0,2797	0,2428
S	0,0559	0,0339	0,0737	0,0256	0,0744	0,0364	0,0610	0,0447	0,0693	0,0720
n	45	45	45	45	45	45	45	45	45	45
Normalidad Dexp.	0,2622	0,2850	0,2739	0,2765	0,2841	0,2873	0,2817	0,2704	0,2824	0,2828
P	< 0,01	> 0,2	> 0,1	> 0,2	> 0,2	< 0,02	> 0,2	> 0,05	> 0,2	> 0,2
Fexp.	2,7191		8,2881		4,1777		1,8622		0,9264	
texp.	3,0885		9,0022		10,723		13,811		2,4770	
	f 73		f 54		f 64		f 81			
P	SIGNIFICATIVO P < 0,01	SIGNIFICATIVO P < 0,001	SIGNIFICATIVO P < 0,02	SIGNIFICATIVO P < 0,02						

TABLA XIII.- Densidad de volumen del ovocito referida a la foto
unidades: μm^3

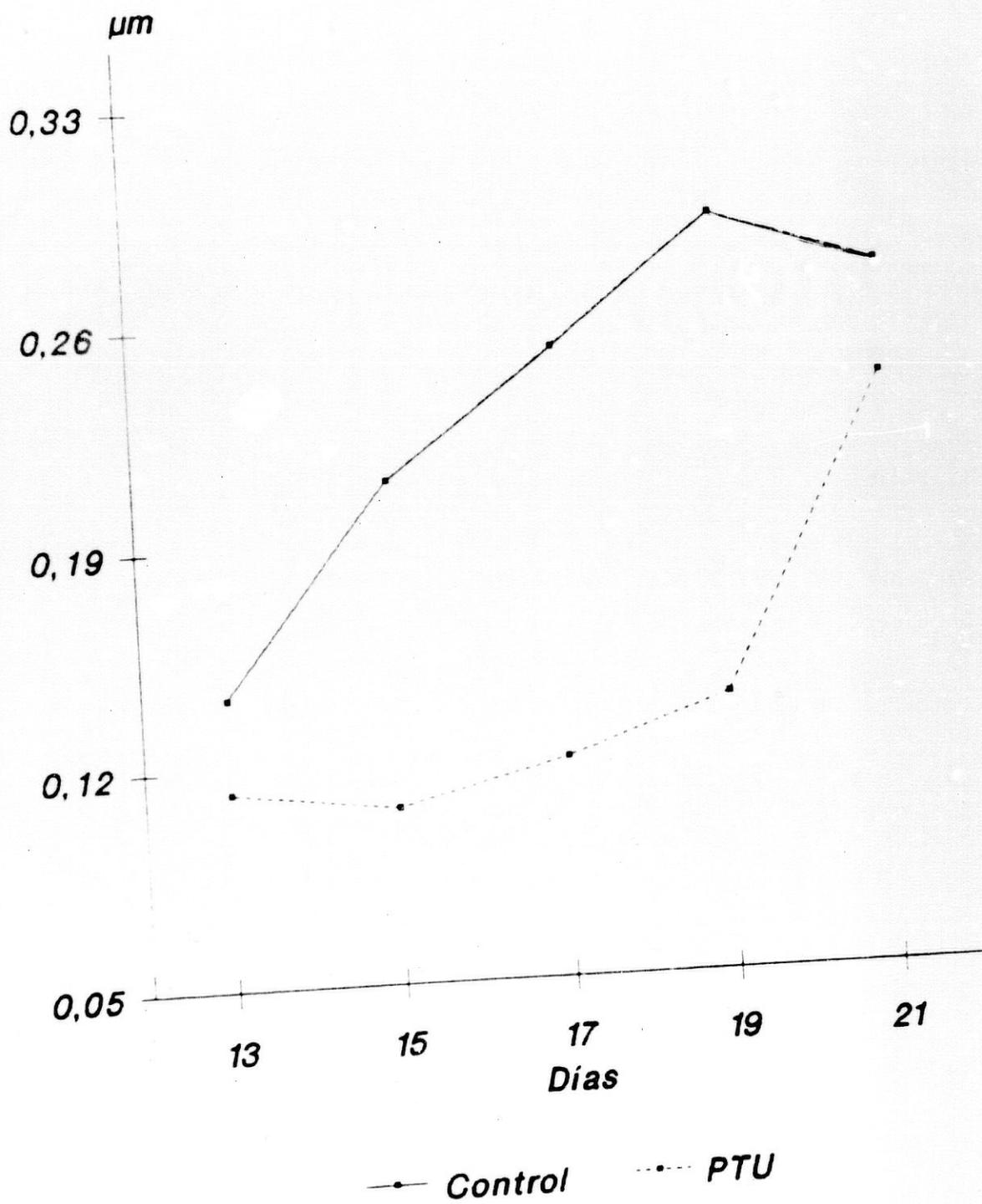


Gráfico XIII.- Densidad de volumen del ovocito respecto a la foto

Incubación	13 días		15 días		17 días		19 días		21 días	
	Contr.	PTU	Contr.	PTU	Contr.	PTU	Contr.	PTU	Contr.	PTU
X	0,0745	0,0618	0,0870	0,0596	0,1051	0,0613	0,1263	0,0665	0,1188	0,1061
S	0,0338	0,0202	0,0356	0,0162	0,0358	0,0221	0,0304	0,0192	0,0511	0,0485
n	45	45	45	45	45	45	45	45	45	45
Normalidad Dexp.	0,2633	0,2810	0,2766	0,2818	0,2840	0,2828	0,2757	0,2811	0,2811	0,2851
P	< 0,01	> 0,2	> 0,2	> 0,2	> 0,2	> 0,2	> 0,2	> 0,2	> 0,2	> 0,2
Fexp.	2,7998		4,7700		2,6241		2,5069		1,1109	
texp.	2,1635 f 72		4,6943 f 62		6,9837 f 73		11,156 f 74		1,2096	
P	SIGNIFICATIVO P < 0,05		SIGNIFICATIVO P < 0,001		SIGNIFICATIVO P < 0,001		SIGNIFICATIVO P < 0,001		NO SIGNIFICAT. P > 0,2	

TABLA XIV.- Densidad de volumen del núcleo del ovocito referida a la foto
unidades: μm^3

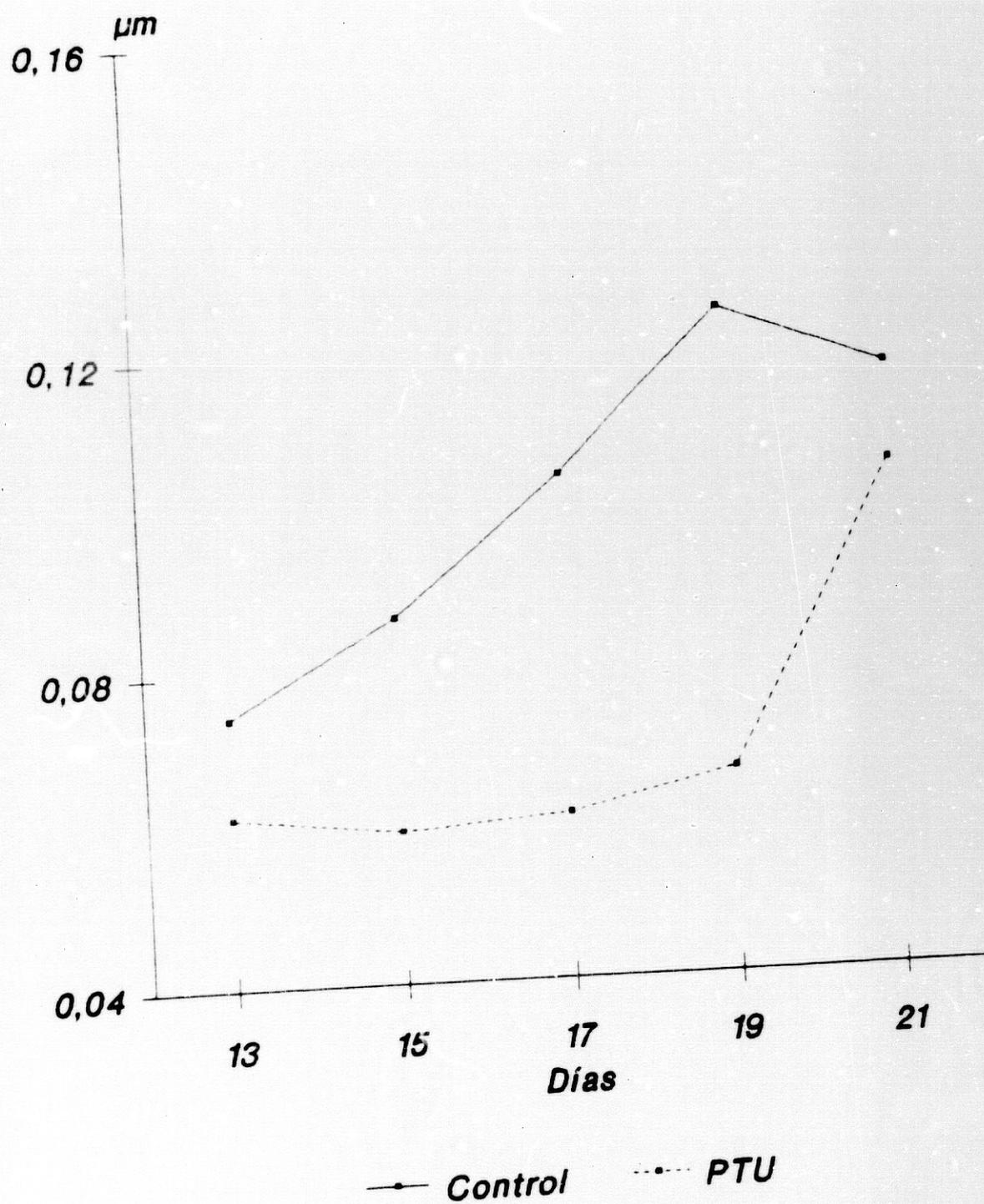


Gráfico XIV.- Densidad de volumen del núcleo del ovocito respecto a la foto

menores ($P < 0,01$). El ritmo de crecimiento de la densidad de volumen del citoplasma del ovocito hipotiroideo, es más discontinua que la que manifiestan los animales controles.

8.- En la densidad de volumen de las mitocondrias referidas al citoplasma, las diferencias que presentan en los animales tratados respecto a los controles difiere de los últimos parámetros estudiados. Como puede verse (Tabla XVI ; Gráfico XVI) la densidad de volumen de las mitocondrias de los ovocitos de los animales hipotiroideos es inferior al de los controles los días 13, 17, 19 y 21 con unas diferencias altamente significativas ($P < 0,001$). Sólomente en el día 15 estas diferencias se hacen menores ($P < 0,01$) aunque también por debajo de lo normal.

B.- PARAMETROS ABSOLUTOS

1.- Superficie del ovocito (Tabla XVII ; Gráfico XVII). La superficie celular del embrión hipotiroideo es inferior respecto al de los controles, en todos los días de desarrollo estudiado, con unas

Incubación	13 días		15 días		17 días		19 días		21 días	
	Contr.	PTU								
Grupo										
X	0,0685	0,0507	0,1244	0,0470	0,1476	0,0603	0,1653	0,0725	0,1682	0,1363
S	0,0300	0,0217	0,0478	0,0156	0,0549	0,0241	0,0483	0,0291	0,0437	0,0471
n	45	45	45	45	45	45	45	45	45	45
Normalidad Dexp.	0,2665	0,2851	0,2822	0,2834	0,2860	0,2853	0,2798	0,2777	0,2742	0,2845
P	< 0,02	> 0,2	> 0,2	> 0,2	> 0,1	> 0,2	> 0,2	> 0,2	> 0,1	> 0,2
Fexp.	1,9112		9,3887		5,1893		2,7549		1,1616	
texp.	3,2249		10,326		9,7674		11,039		3,3338	
	f 80		f 53		f 60		f 72			
P	SIGNIFICATIVO									
	P < 0,01		P < 0,001		P < 0,001		P < 0,001		P < 0,01	

TABLA XV.- Densidad de volumen del citoplasma del ovocito referida a la foto
unidades: μm^3

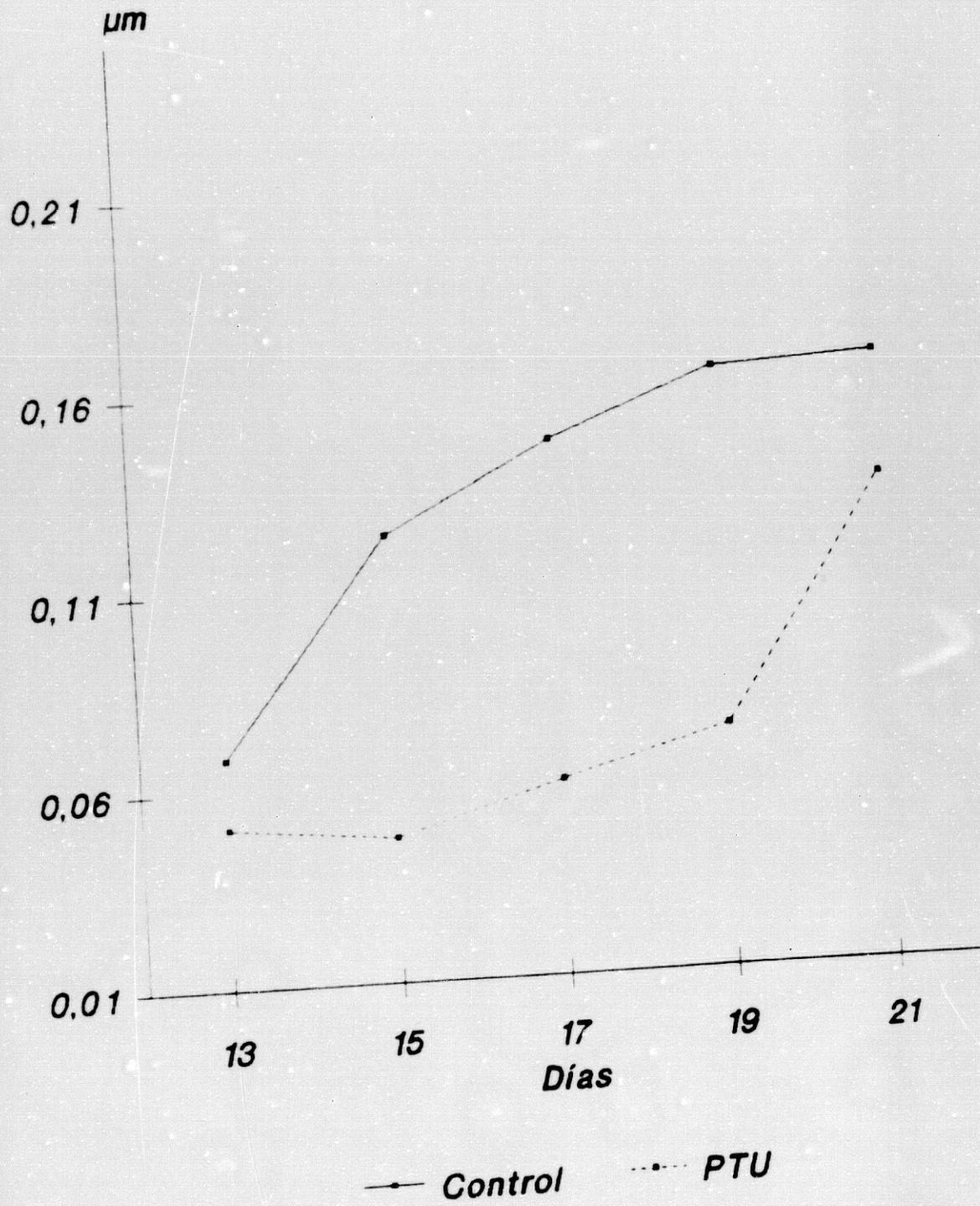


Gráfico XV.- Densidad de volumen del citoplasma del ovocito respecto a la foto

Incubación	13 días		15 días		17 días		19 días		21 días	
	Contr.	PTU	Contr.	PTU	Contr.	PTU	Contr.	PTU	Contr.	PTU
\bar{X}	0,0989	0,0559	0,1179	0,0938	0,1130	0,0678	0,1159	0,0610	0,1034	0,0689
S	0,0204	0,0143	0,0383	0,0236	0,0358	0,0264	0,0316	0,0172	0,0335	0,0265
n	36	36	36	36	36	36	36	36	36	36
Normalidad	0,2732	0,2790	0,2636	0,2870	0,2802	0,2693	0,2707	0,2786	0,2839	0,2824
Dexp.	> 0,1	> 0,2	< 0,02	< 0,05	> 0,2	> 0,05	> 0,1	> 0,2	> 0,2	> 0,2
P	2,0351		2,6337		1,8389		3,3750		1,5981	
Fexp.	-10,356		3,2142		6,0969		9,1556		4,8461	
texp.	f 63		f 58		f 64		f 54		f 66	
P	SIGNIFICATIVO P < 0,001		SIGNIFICATIVO P < 0,01		SIGNIFICATIVO P < 0,001		SIGNIFICATIVO P < 0,001		SIGNIFICATIVO P < 0,001	

TABLA XVI.- Densidad de volumen de las mitocondrias referida al citoplasma
unidades: μm^3

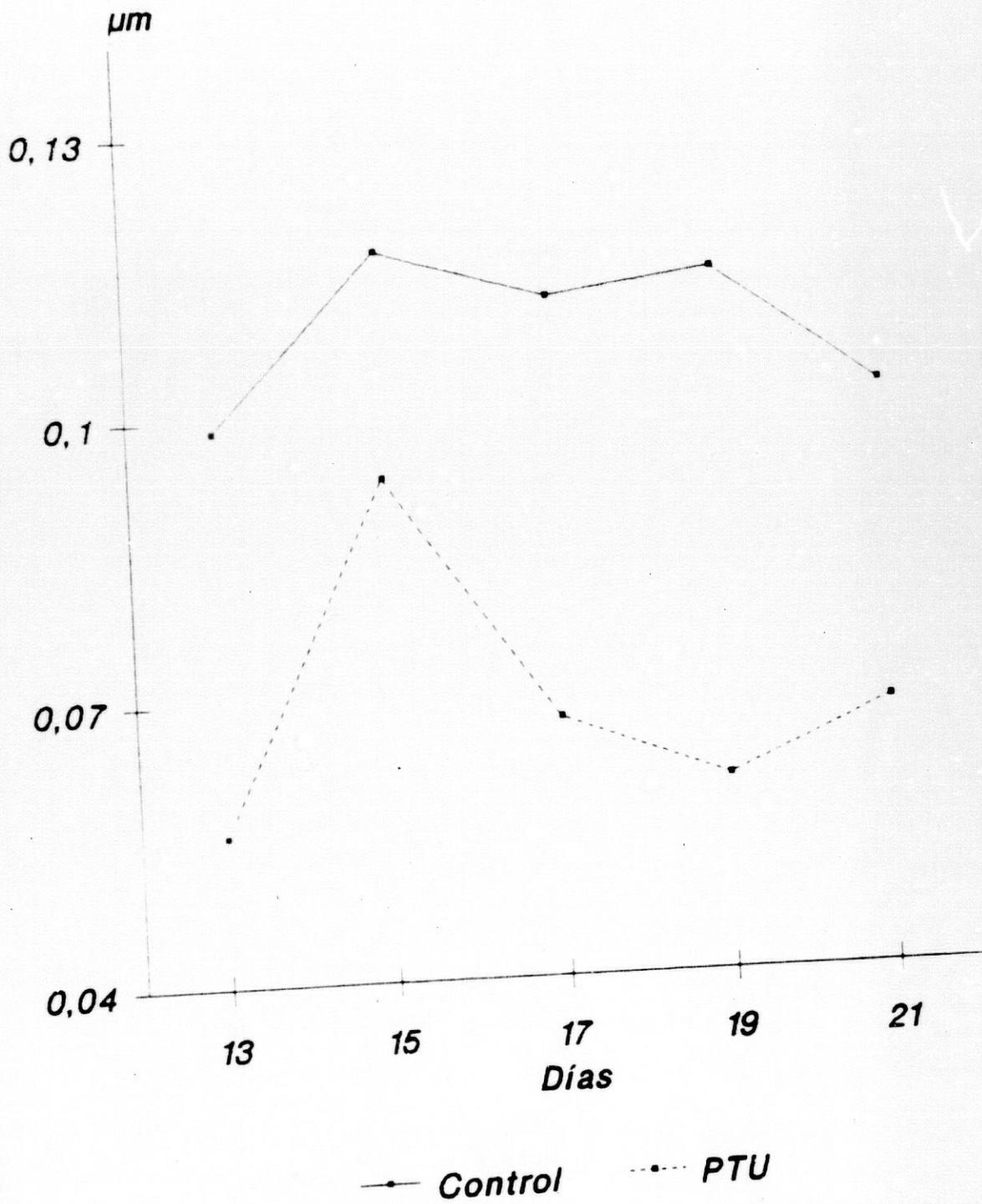


Gráfico XVI.- Densidad de volumen de las mitocondrias del ovocito respecto al citoplasma

diferencias altamente significativas los días 15, 17, 19 y 21 ($P < 0,001$); el día 13 la significatividad de los tratados respecto al control es menor ($P < 0,05$). Este parámetro se comporta desde el día 15 al 17 prácticamente sin ningún crecimiento al contrario de lo que ocurre en la superficie celular de los animales controles que va paulatinamente creciendo hasta el día 19. A partir del día 17 de incubación la superficie celular del ovocito hipotiroideo comienza un desarrollo creciente, intentando acercarse al control en el día 21, sin lograrlo.

2.- Superficie citoplasmática del ovocito. El comportamiento de este parámetro es exactamente igual que el parámetro anterior como puede verse en la Tabla XVIII ; Gráfico XVIII con la única diferencia de que en el día 13 la disminución de superficie del tratado respecto al control no es significativa.

3.- Superficie nuclear del ovocito (Tabla XIX ; Gráfico XIX). El núcleo del ovocito de los embriones tratados con PTU presenta una superficie inferior al de los controles, también a lo largo de todo el desarrollo embrionario; el comportamiento de este parámetro desde el

Incubación Grupo	13 días		15 días		17 días		19 días		21 días	
	Contr.	PTU	Contr.	PTU	Contr.	PTU	Contr.	PTU	Contr.	PTU
X	201,42	168,17	240,06	159,02	320,85	158,47	408,78	199,79	364,84	263,15
S	86,983	65,548	94,212	41,541	103,60	61,342	87,506	54,435	131,21	88,239
n	45	45	45	45	45	45	45	45	45	45
Normalidad Dexp.	0,2727	0,2845	0,2727	0,2700	0,2788	0,2832	0,2845	0,2762	0,2834	0,2824
F	> 0,1	> 0,2	> 0,1	> 0,05	> 0,2	> 0,2	> 0,2	> 0,2	> 0,2	> 0,2
Fexp.	1,7609		5,1434		2,8523		2,5841		2,2111	
texp.	2,0478 f 82		5,2798 f 60		9,0472 f 71		13,603 f 74		4,3141 f 77	
P	SIGNIFICATIVO P < 0,05		SIGNIFICATIVO P < 0,001							

TABLA XVII.- Superficie celular del ovocito
unidades: μm^2

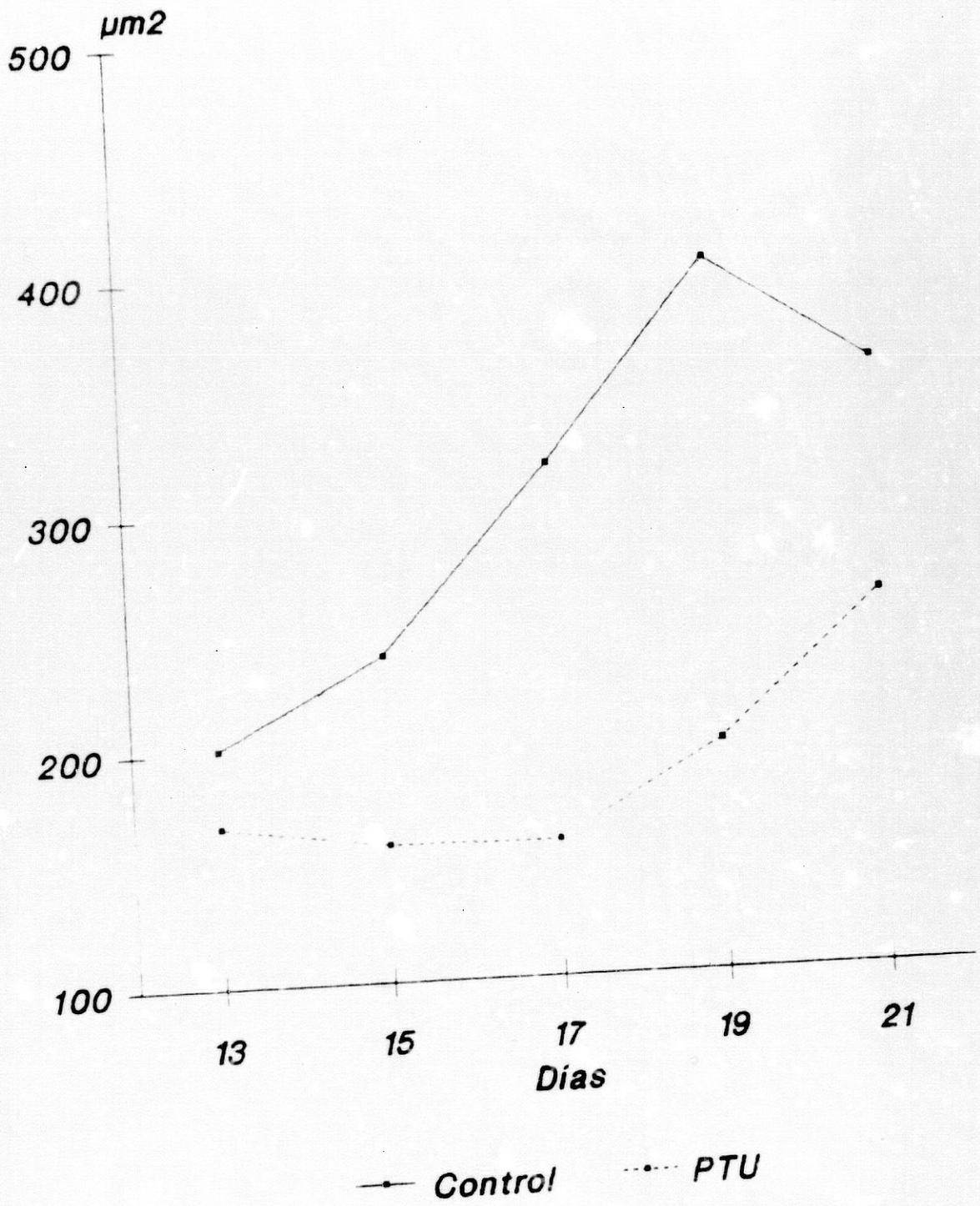


Gráfico XVII.- Superficie celular del ovocito

Incubación Grupo	13 días		15 días		17 días		días		21 días	
	Contr.	PTU								
X	73,764	60,387	98,538	61,024	125,62	64,207	167,29	81,118	146,02	107,48
S	39,970	37,035	45,316	27,105	59,331	37,197	62,576	27,557	55,643	29,976
n	45	45	45	45	45	45	45	45	45	45
Normalidad Dexp.	0,2697	0,2822	0,2782	0,2670	0,2775	0,2792	0,2746	0,2750	0,2792	0,2825
P	< 0,05	> 0,2	> 0,2	< 0,05	> 0,2	> 0,2	> 0,1	> 0,2	> 0,2	> 0,2
Fexp.	1,1647		2,7951		2,5441		5,1564		3,4456	
temp.	1,6468		4,7658 f 72		5,8830 f 74		8,2580 f 60		4,0904 f 68	
P	NO SIGNIFICAT.		SIGNIFICATIVO		SIGNIFICATIVO		SIGNIFICATIVO		SIGNIFICATIVO	
	P > 0,1		P < 0,001							

TABLA XVIII.- Superficie citoplasmática del ovocito
unidades: μm^2

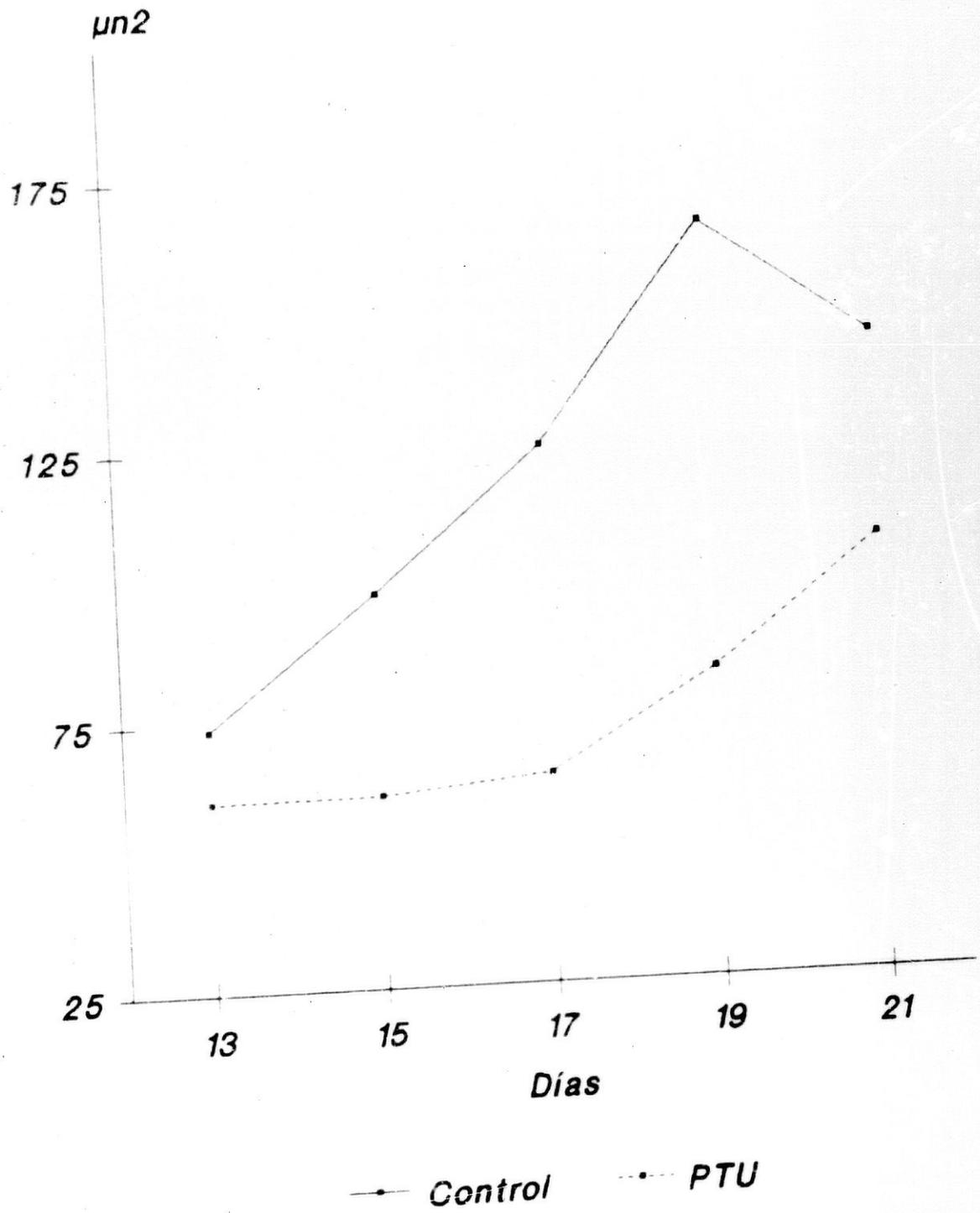


Gráfico XVIII.- Superficie citoplasmática del ovocito

día 13 al 17 de incubación es de descenso respecto al animal control cuya superficie va in crescendo hasta el día 19. A partir del día 17 el crecimiento de la superficie del núcleo del ovocito tratado empieza a aumentar intentando acercarse al parámetro normal alrededor del 21, aunque sin lograrlo. Como puede verse en la Tabla XIX, las diferencias que presenta este parámetro del ovocito tratado con respecto al control son altamente significativas los días 15, 17 y 19 ($P < 0,001$) mientras que a los 21 día la significatividad es menor ($P < 0,01$).

4.- Superficie de una mitocondria del ovocito. La superficie que presenta una mitocondria del ovocito hipotiroideo es siempre mayor que el mismo parámetro en los animales controles (Tabla XX ; Gráfico XX). Sucediendo que si bien en el día 13 de desarrollo estas diferencias no son significativas, los días 15, 17, 19 y 21 lo son en alto grado ($P < 0,001$), no presentando en este último día tendencia de aproximación de este parámetro del tratado hacia el control.

5.- Superficie total de las mitoconarias del ovocito. La superficie que presentan el total de la

Incubación	13 días		15 días		17 días		19 días		21 días	
	Contr.	PTU	Contr.	PTU	Contr.	PTU	Contr.	PTU	Contr.	PTU
X	127,56	107,77	141,53	97,996	195,23	94,256	241,49	114,39	216,68	155,69
S	55,862	39,435	60,632	24,673	68,742	34,133	58,354	41,846	97,242	75,487
n	45	45	45	45	45	45	45	45	45	45
Normalidad Dexp.	0,2766	0,2762	0,2746	0,2775	0,2838	0,2810	0,2840	0,2711	0,2810	0,2836
P	> 0,2	> 0,2	> 0,1	> 0,2	> 0,2	> 0,2	> 0,2	> 0,05	> 0,2	> 0,2
Fexp.	2,0066		6,0389		4,0559		1,9446		1,6594	
temp.	1,9414		4,4612		8,8254		11,873		3,3235	
	f 79		f 58		f 64		f 80		f 83	
P	NO SIGNIFICAT.		SIGNIFICATIVO		SIGNIFICATIVO		SIGNIFICATIVO		SIGNIFICATIVO	
	P > 0,05		P < 0,001		P < 0,001		P < 0,001		P < 0,01	

TABLA XIX.- Superficie nuclear del ovocito
unidades: μm^2

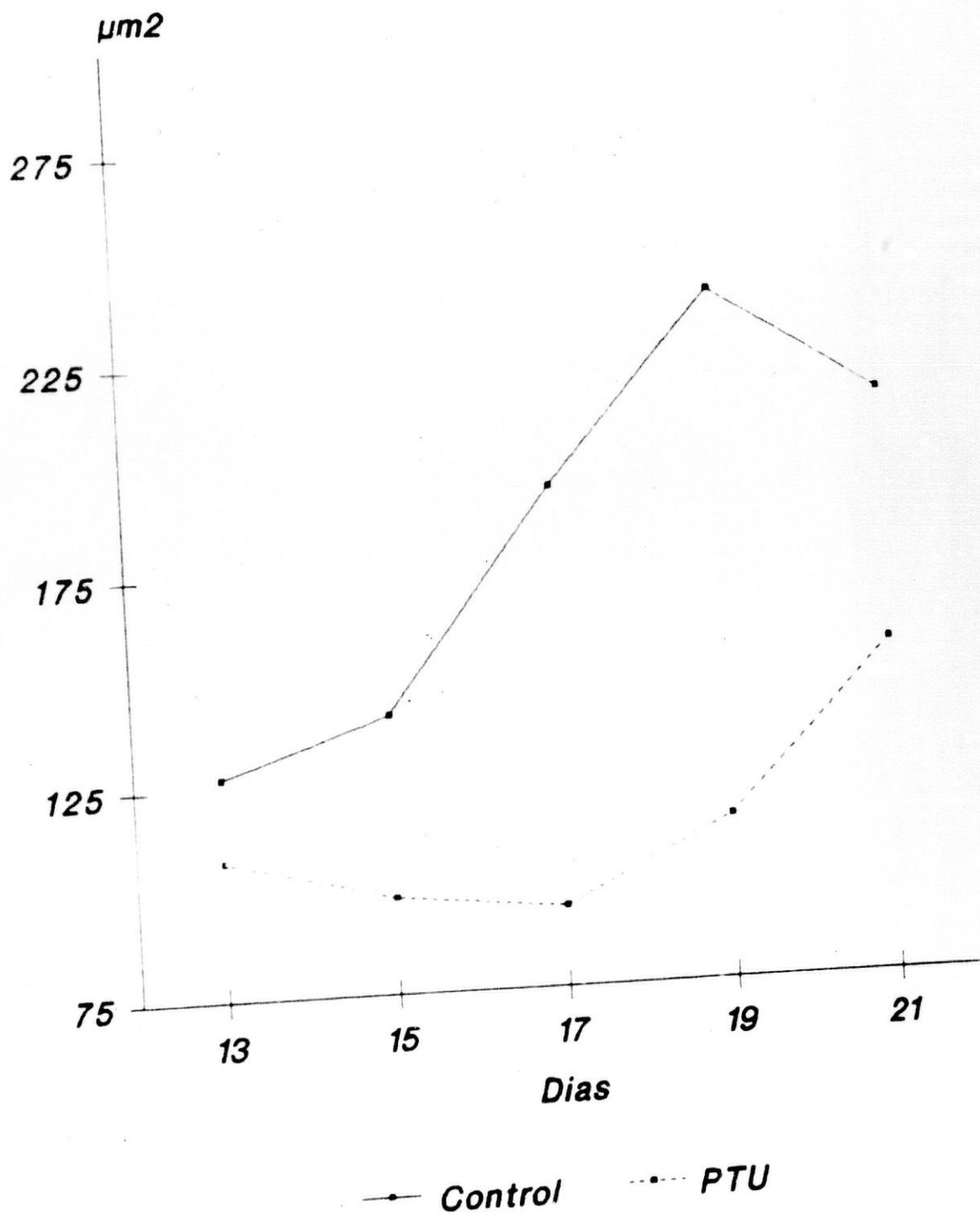


Gráfico XIX.- Superficie nuclear del ovocito

Incubación	13 días		15 días		17 días		19 días		21 días	
	Contr.	PTU	Contr.	PTU	Contr.	PTU	Contr.	PTU	Contr.	PTU
\bar{X}	0,5941	0,6357	0,4612	0,8119	0,5122	0,7274	0,3967	0,6263	0,3041	0,5178
S	0,1298	0,1868	0,1462	0,2506	0,1554	0,3191	0,1440	0,2103	0,0916	0,1845
n	36	36	36	36	36	36	36	36	36	36
Normalidad Dexp.	0,2657	0,2786	0,2848	0,2388	0,2804	0,2590	0,2685	0,2599	0,2724	0,2767
P	< 0,05	> 0,2	> 0,2	< 0,01	> 0,2	< 0,01	> 0,05	< 0,01	> 0,1	> 0,2
Fexp.	2,0711		2,9381		4,2164		2,1328		4,0569	
texp.	-1,0972 f 62		-7,2526 f 56		-3,6379 f 51		-5,4049 f 62		-6,2246 f 51	
P	NO SIGNIFICAT. P > 0,2		SIGNIFICATIVO P < 0,001							

TABLA XX.- Superficie de una mitocondria
unidades: μm^2

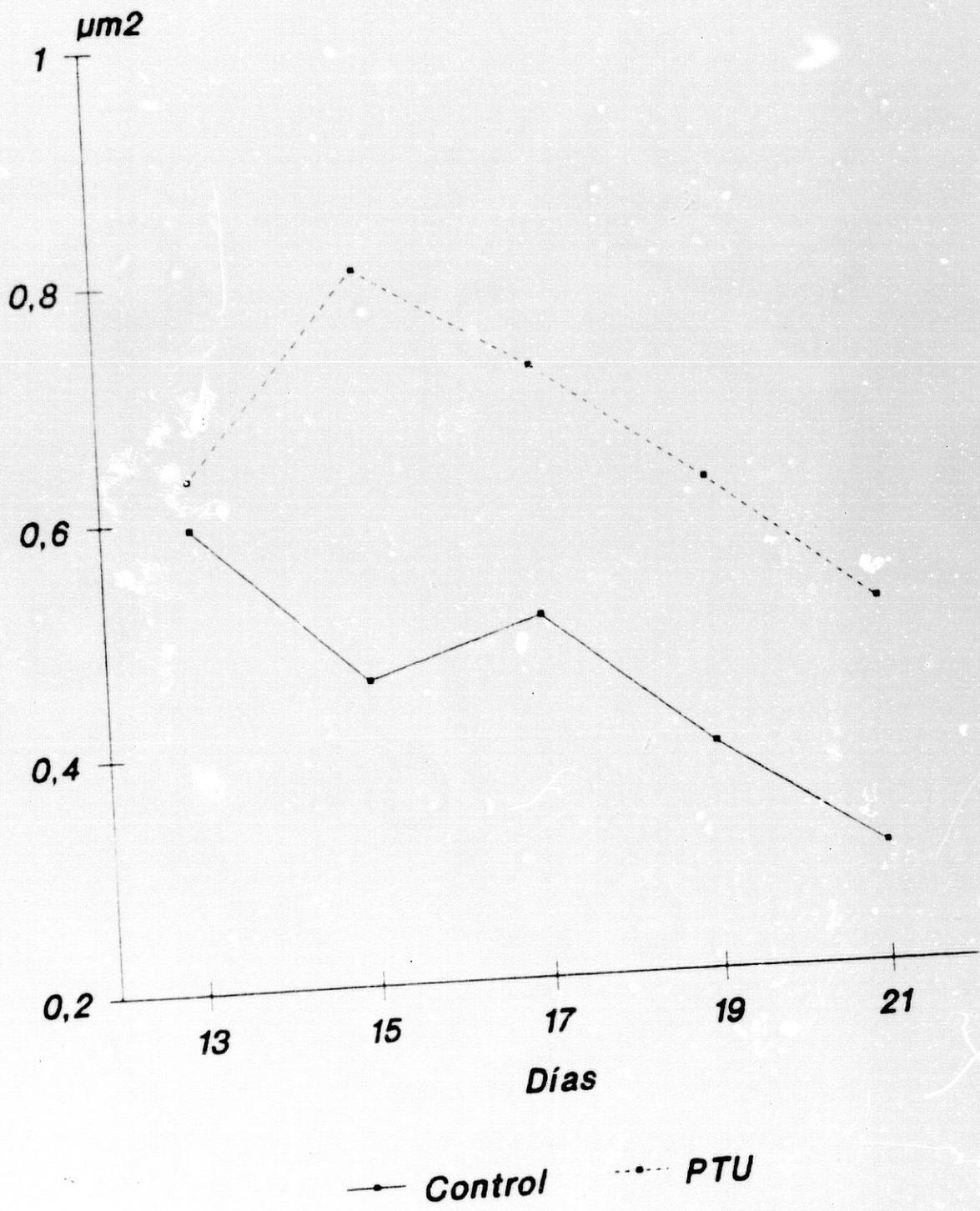


Gráfico XX.- Superficie de una mitocondria

mitocondrias del ovocito hipotiroideo es siempre inferior al que manifiesta este parámetro en los controles (Tabla XXI ; Gráfico XXI), siendo en todos los días de desarrollo estudiados altamente significativas las diferencias que presenta, este parámetro respecto al control ($P < 0,01$). Esta disminución en la superficie total mitocondrial prácticamente es lineal desde el 13 al 19, es decir, no sufre evolución considerable este parámetro dentro de estos días, y es a partir del día 19 cuando experimenta un incremento ascendente con tendencia hacia la normalidad sin lograrlo.

6.- Volumen del ovocito. (Tabla XXII ; Gráfico XXII). El comportamiento del volumen celular del ovocito desarrollado en un ambiente hipotiroideo es muy parecido al que presenta la superficie, es decir, inferior en los tratados con respecto a los controles. Con diferentes grados de significatividad. Los días 13 y 21 presentan unas diferencias significativas menores ($P < 0,02$) mientras que los días 15, 17 y 19 las diferencias son altamente significativas ($P < 0,001$).

Incubación	13 días		15 días		17 días		19 días		21 días	
	Contr.	PTU								
Grupo										
X	184,45	68,960	431,89	84,167	565,87	82,917	723,09	110,19	565,60	282,97
S	40,058	23,763	161,80	24,252	163,95	27,639	224,14	29,105	203,60	104,62
n	36	36	36	36	36	36	36	36	36	36
Normalidad Dexp.	0,2780	0,2466	0,2578	0,2814	0,2744	0,2668	0,2737	0,2803	0,2829	0,2750
P	> 0,2	< 0,01	< 0,01	> 0,2	> 0,2	< 0,05	> 0,2	> 0,2	> 0,2	> 0,2
Fexp.	2,8416		44,510		35,186		59,306		3,7872	
texp.	14,877		12,752		17,428		16,270		7,4081	
	f 57		f 37		f 37		f 36		f 52	
P	SIGNIFICATIVO P < 0,001									

TABLA XXI. Superficie total de las mitocondrias
unidades: μm^2

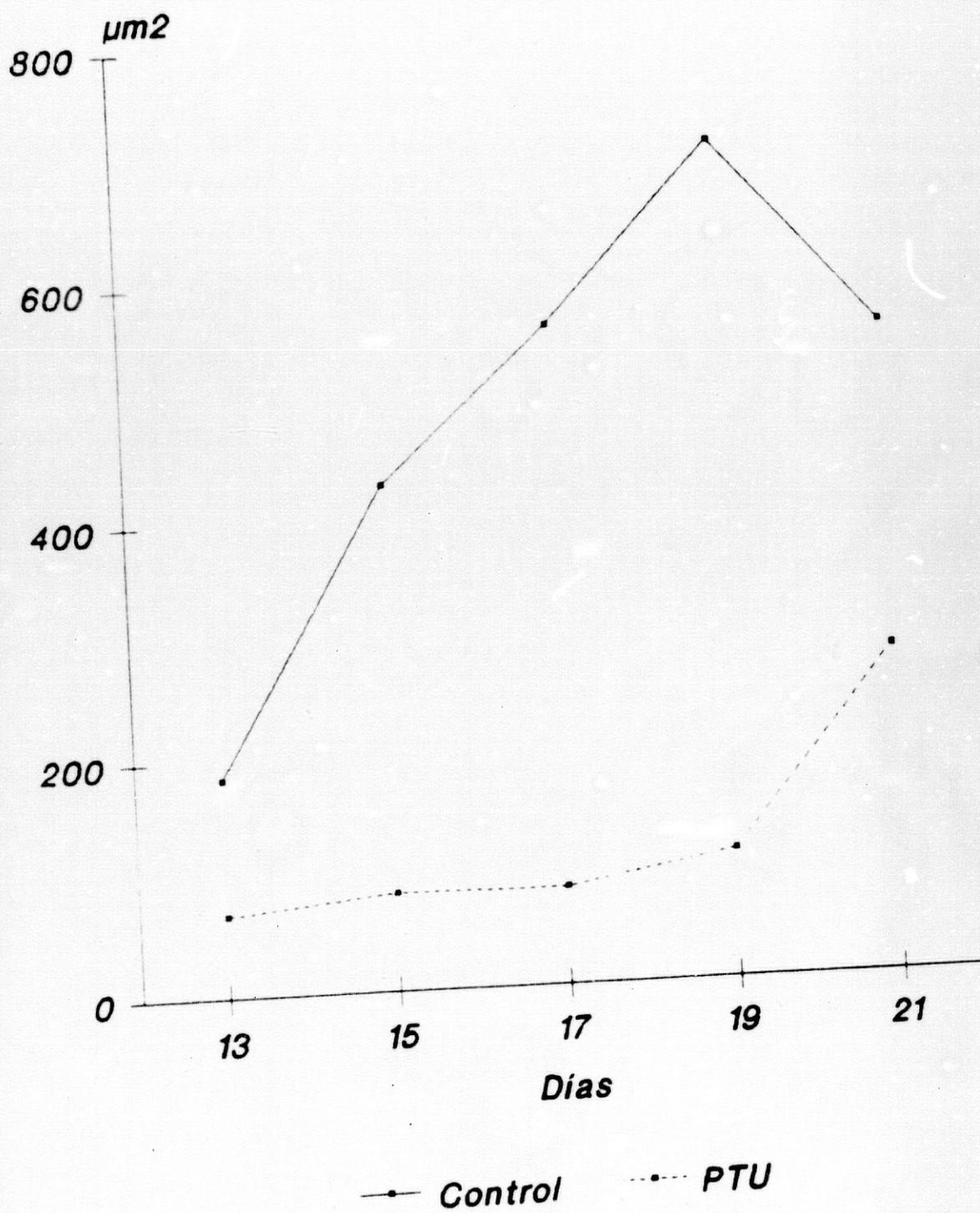


Gráfico XXI.- Superficie total de las mitocondrias

Incubación	13 días		15 días		17 días		19 días		21 días	
	Contr.	PTU	Contr.	PTU	Contr.	PTU	Contr.	PTU	Contr.	PTU
X	171,09	123,00	266,30	111,24	360,85	123,96	469,40	155,22	405,43	316,30
S	111,27	55,596	148,19	40,193	149,56	55,507	135,67	64,110	180,62	156,17
n	45	45	45	45	45	45	45	45	45	45
Normalidad Dexp.	0,2482	0,2807	0,2591	0,2747	0,2843	0,2831	0,2830	0,2765	0,2728	0,2793
P	< 0,01	> 0,2	< 0,01	> 0,2	> 0,2	> 0,2	> 0,2	> 0,2	> 0,1	> 0,2
Fexp.	4,0056		13,593		7,2599		4,4783		1,3376	
texp.	2,5935		6,7744		9,9394		14,045		2,5040	
	f 65		f 50		f 56		f 63			
P	SIGNIFICATIVO P < 0,02		SIGNIFICATIVO P < 0,001		SIGNIFICATIVO P < 0,001		SIGNIFICATIVO P < 0,001		SIGNIFICATIVO P < 0,02	

TABLA XXII.- Volumen celular del ovocito
unidades: μm^3

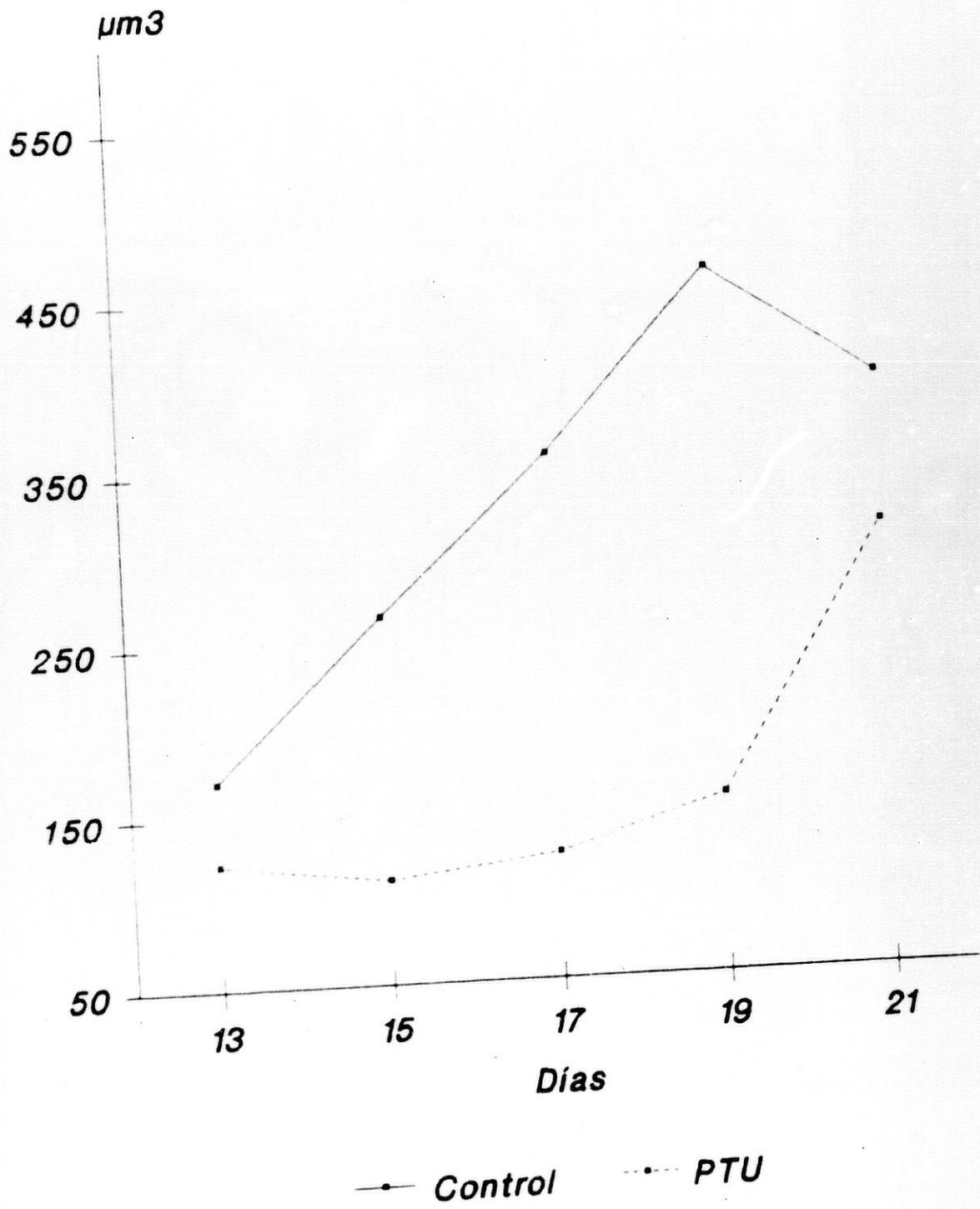


Gráfico XXII.- Volumen celular del ovocito

7.- Volumen citoplasmático del ovocito. Como puede observarse en la Tabla XXIII ; Gráfico XXIII, el comportamiento de este parámetro con respecto a los controles es del todo semejante al que presenta el volumen total del ovocito.

8.- Volumen nuclear del ovocito. (Tabla XXIV ; Gráfico XXIV). El volumen del núcleo del ovocito hipotiroideo también es menor que el que manifiesta el ovocito control. El comportamiento de este parámetro en el embrión tratado respecto al control, es que mientras que este último va creciendo paulatinamente en volumen nuclear del 13 al 19 días de desarrollo, este parámetro en los tratados prácticamente del 13 al 19 apenas sí experimenta incremento alguno, siendo a partir de este último día cuando empieza a crecer intentando aproximarse al volumen nuclear del ovocito control, aunque sin conseguirlo, presentando en este último día unas diferencias no significativas.

9.- Volumen de una mitocondria del ovocito. (Tabla XXV ; Gráfico XXV). Este parámetro presenta un comportamiento en los animales tratados en todo

Inubación	13 días		15 días		17 días		19 días		21 días	
	Contr.	PTU	Contr.	PTU	Contr.	PTU	Contr.	PTU	Contr.	PTU
\bar{X}	78,118	54,484	153,09	48,349	206,66	58,893	266,07	79,380	223,82	170,93
S	50,924	27,589	86,449	19,703	89,619	30,487	87,425	36,415	87,149	76,255
n	45	45	45	45	45	45	45	45	45	45
Normalidad Dexp.	0,2529	0,2837	0,2637	0,2778	0,2861	0,2858	0,2821	0,2791	0,2810	0,2804
P	< 0,01	> 0,2	< 0,01	> 0,2	> 0,1	> 0,1	> 0,2	> 0,2	> 0,2	> 0,2
Fexp.	3,4070		19,251		8,6411		5,7638		1,3061	
texp.	2,7373 f 68		7,9244 f 49		10,471 f 54		13,223 f 59		3,0638	
P	SIGNIFICATIVO P < 0,01		SIGNIFICATIVO P < 0,001		SIGNIFICATIVO P < 0,001		SIGNIFICATIVO P < 0,001		SIGNIFICATIVO P < 0,01	

TABLA XXIII.- Volumen citoplasmático del ovocito
unidades: μm^3

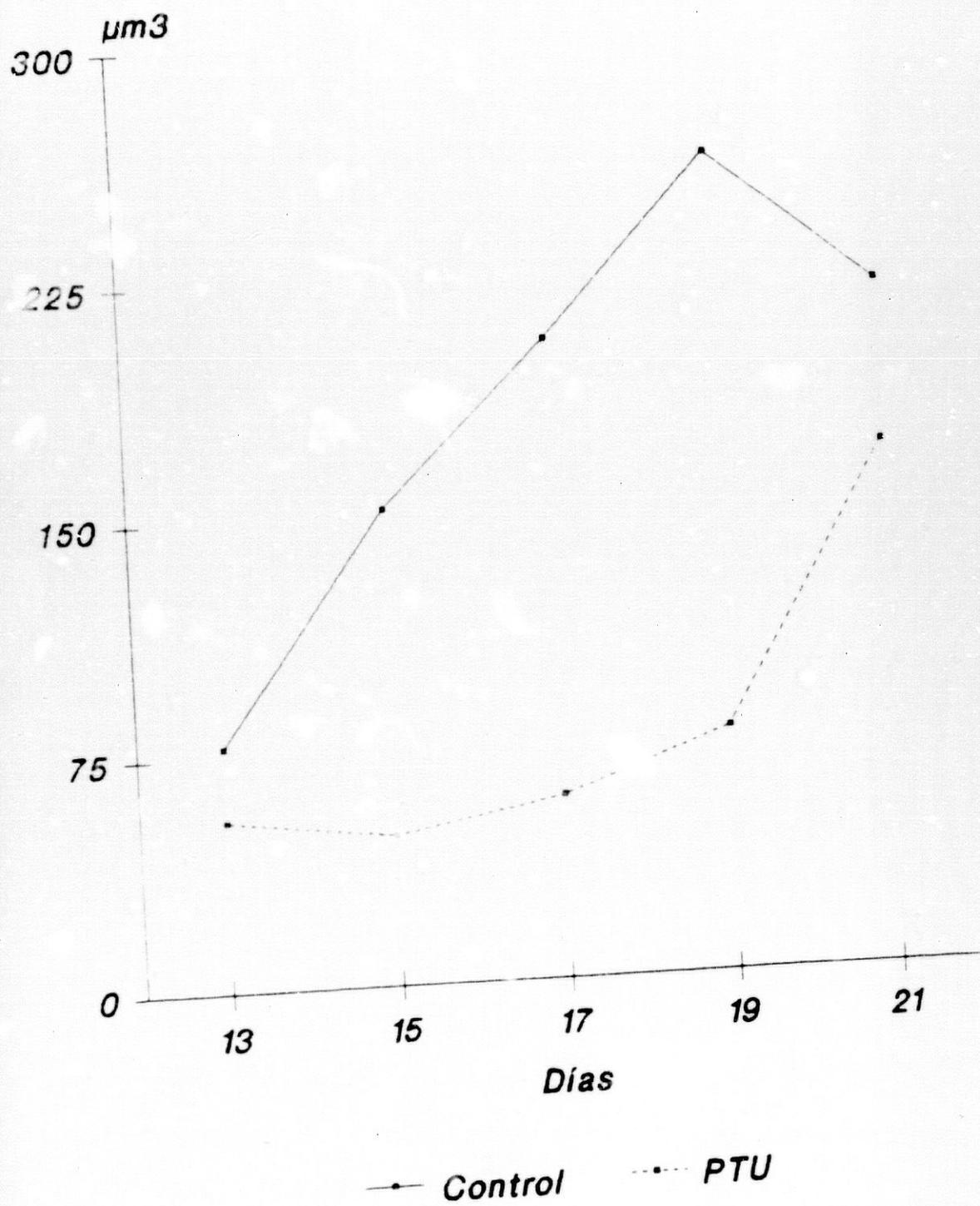


Gráfico XXIII.- Volumen citoplasmático del ovocito

Incubación	13 días		15 días		17 días		19 días		21 días	
	Contr.	PTU	Contr.	PTU	Contr.	PTU	Contr.	PTU	Contr.	PTU
\bar{X}	92,978	68,124	113,22	62,889	154,52	65,129	203,39	75,847	182,03	145,76
S	65,784	32,420	70,255	25,441	73,469	33,839	70,598	32,792	111,59	96,066
n	45	45	45	45	45	45	45	45	45	45
Normalidad	0,2535	0,2788	0,2666	0,2793	0,2854	0,2799	0,2759	0,2770	0,2735	0,2789
Dexp.	< 0,01	> 0,2	< 0,02	> 0,2	> 0,2	> 0,2	> 0,2	> 0,2	> 0,1	> 0,2
Fexp.	4,1173		7,6258		4,7138		4,6349		1,3493	
texp.	2,2733 f 64		4,5186 f 55		7,4134 f 62		10,991 f 62		1,6523	
P	SIGNIFICATIVO P < 0,05	SIGNIFICATIVO P < 0,001	NO SIGNIFICATIVO P > 0,1	NO SIGNIFICATIVO P > 0,1	NO SIGNIFICATIVO P > 0,1					

TABLA XXIV.- Volumen nuclear del ovocito
unidades: μm^3

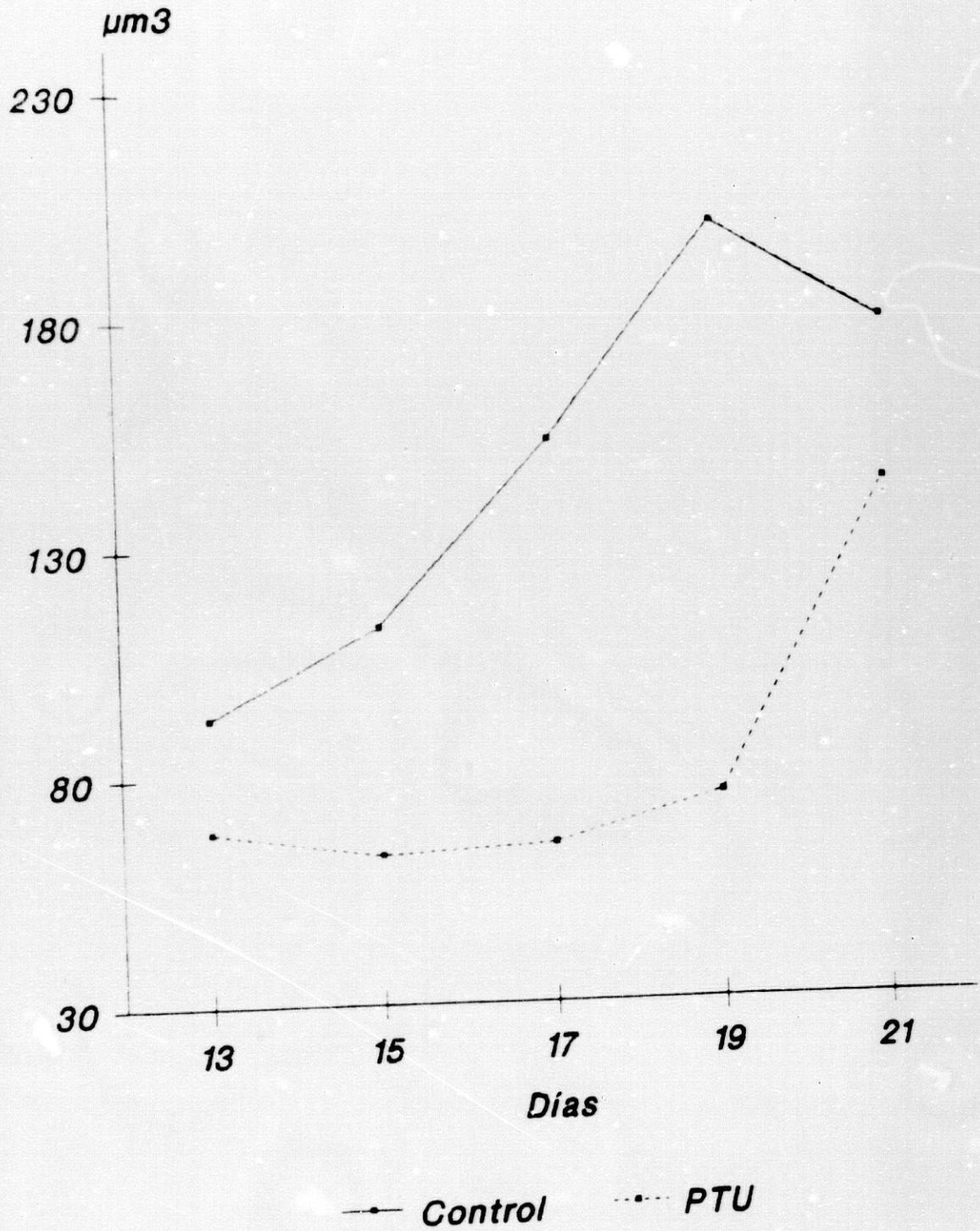


Gráfico XXIV.- Volumen nuclear del ovocito

semejante al que presenta la superficie. Siendo siempre mayor en los hipotiroideos que en los normales. Con unas diferencias altamente significativas desde el día 15 al 21 de desarrollo ($P < 0,001$).

10.- Volumen total de las mitocondrias del ovocito. Sin embargo el volumen que presenta el total de las mitocondrias del ovocito hipotiroideo, es durante todos los días estudiados inferior al que ostentan los embriones controles, con una diferencia altamente significativa ($P < 0,001$) en todos los días estudiados. El volumen total mitocondrial sufre una estabilización de su crecimiento del 13 al 19 en los tratados y a partir de este último día empieza a crecer con tendencia a aproximarse al de los animales controles, es decir, todo lo contrario de lo que ocurre en los animales eutiroideos (Tabla XXVI ; Gráfico XXVI).

11.- Número total de mitocondrias. Finalmente por lo que respecta al número total de mitocondrias que presenta el ovocito hipotiroideo respecto al control (Tabla XXVII ; Gráfico XXVII) también es inferior en todos los días estudiados con diferencias altamente

Incubación	13 días		15 días		17 días		19 días		21 días	
	Contr.	PTU	Contr.	PTU	Contr.	PTU	Contr.	PTU	Contr.	PTU
X	0,0253	0,0302	0,0197	0,0440	0,0211	0,0368	0,0172	0,0282	0,0130	0,0213
S	0,0075	0,0123	0,0072	0,0132	0,0080	0,0229	0,0065	0,0117	0,0052	0,0085
n	36	36	36	36	36	36	36	36	36	36
Normalidad Dexp.	0,2728	0,2653	0,2828	0,2455	0,2761	0,2612	0,2768	0,2585	0,2669	0,2721
P	> 0,1	< 0,05	> 0,2	< 0,01	> 0,2	< 0,01	> 0,2	< 0,01	< 0,05	> 0,1
Fexp.	2,6896		3,3611		8,1939		3,2400		2,6719	
texp.	-2,0407 f 58		-9,6967 f 54		-3,8833 f 43		-4,9311 f 55		-4,9977 f 58	
P	SIGNIFICATIVO P < 0,05	SIGNIFICATIVO	SIGNIFICATIVO P < 0,001	SIGNIFICATIVO	SIGNIFICATIVO P < 0,001	SIGNIFICATIVO	SIGNIFICATIVO	SIGNIFICATIVO	SIGNIFICATIVO	SIGNIFICATIVO P < 0,001

TABLA XXV.- Volumen de una mitocondria
unidades: μm^3

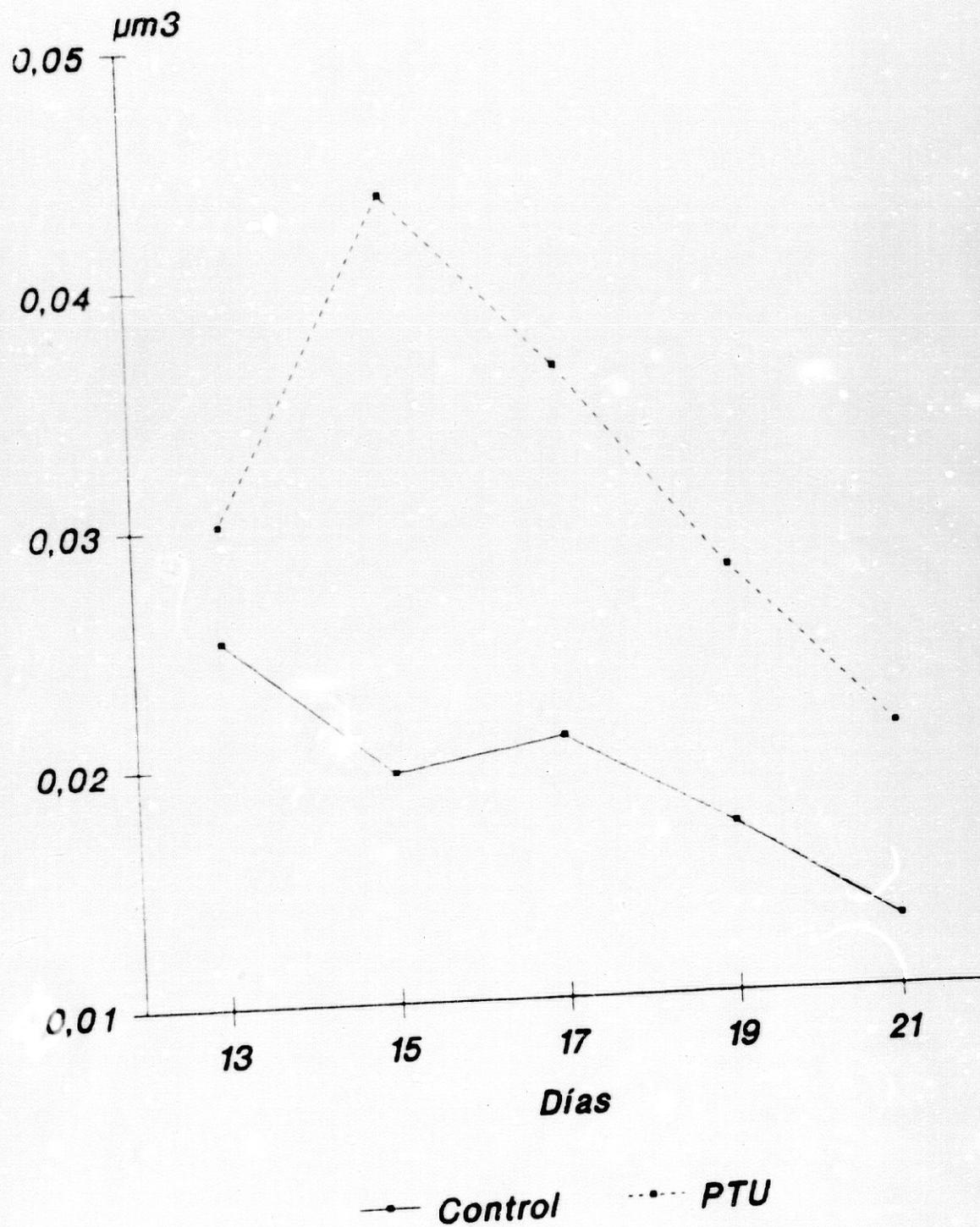


Gráfico XXV.- Volumen de una mitocondria

Incubación Grupo	13 días		15 días		17 días		19 días		21 días	
	Contr.	PTU								
X	7,7227	3,0453	18,045	4,5352	23,354	3,9913	30,740	4,8429	23,144	11,776
S	1,5958	0,7796	5,8706	1,1407	7,39	1,5549	8,5576	1,3638	7,4920	4,5232
n	36	36	36	36	36	36	36	36	36	36
Normalidad Dexp.	0,2732	0,2790	0,2636	0,2870	0,2802	0,2693	0,2701	0,2786	0,2839	0,2824
P	> 0,1	> 0,2	< 0,02	< 0,05	> 0,2	> 0,05	> 0,05	> 0,2	> 0,2	> 0,2
Fexp.	4,1899		26,486		22,624		39,373		2,7434	
texp.	15,801 f 51		13,554 f 38		15,372 f 38		17,930 f 37		7,7938 f 58	
P	SIGNIFICATIVO P < 0,001									

TABLA XXVI.- Volumen total de las mitocondrias
unidades: μm^3

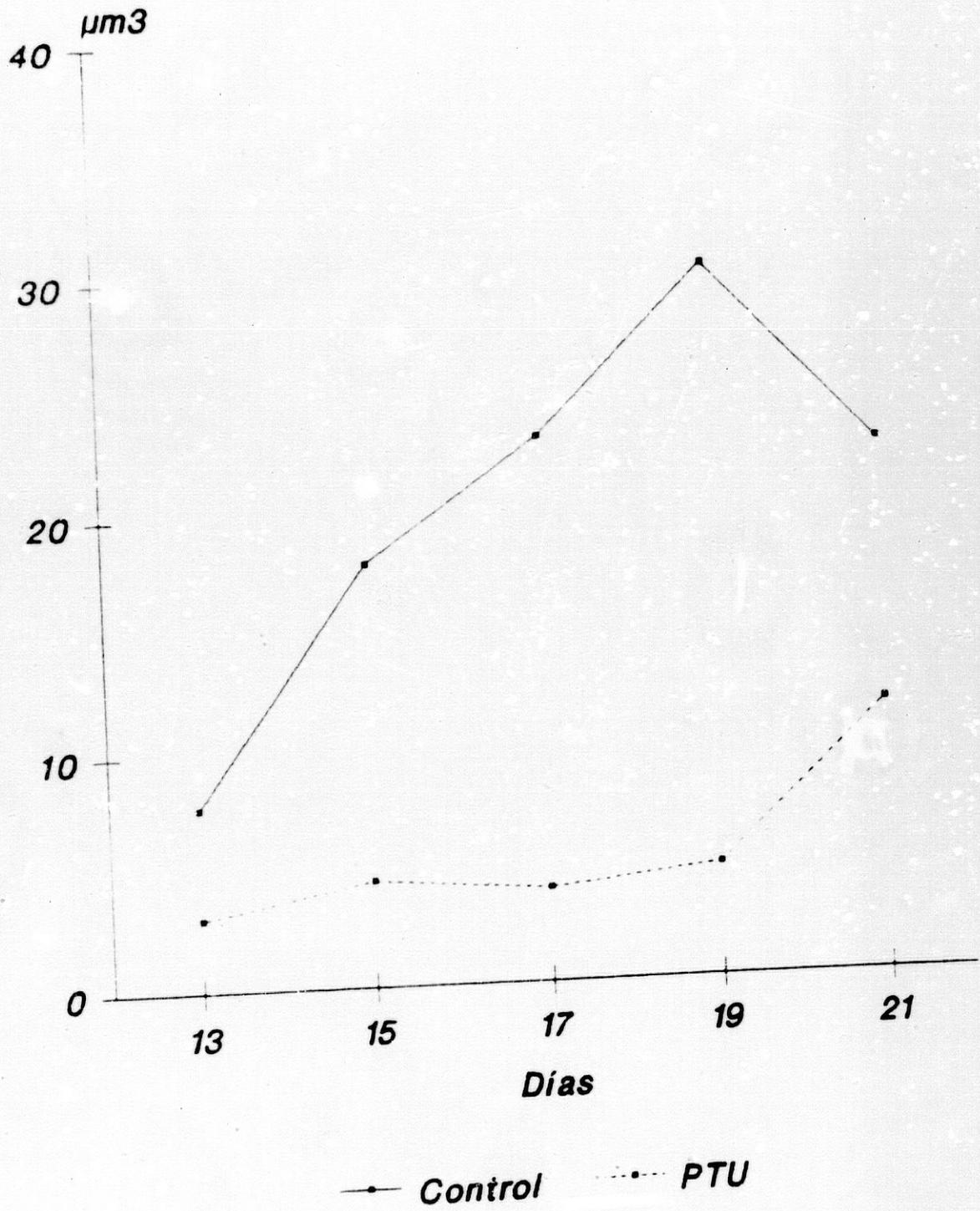


Gráfico XXVI.- Volumen total de las mitocondrias

significativas ($P < 0,001$). También el comportamiento en el número total de mitocondrias en el ovocito tratado, no experimenta crecimiento alguno del 13 al 19 y es a partir de este día, hasta el 21, cuando el crecimiento es ascendente.

Incubación	13 días		15 días		17 días		19 días		21 días	
	Contr.	PTU								
\bar{X}	330,28	112,62	1127,1	107,96	1265,5	140,31	2022,1	191,14	2095,2	650,80
S	112,01	42,442	788,25	31,614	606,31	87,345	867,62	73,666	1101,0	364,22
n	36	36	36	36	36	36	36	36	36	36
Normalidad Dexp.	0,2801	0,2826	0,2491	0,2868	0,2725	0,2599	0,2795	0,2806	0,2794	0,2741
P	> 0,2	> 0,2	< 0,01	< 0,05	> 0,1	< 0,01	> 0,2	> 0,2	> 0,2	> 0,2
Fexp.	6,9650		621,68		48,185		138,71		9,1379	
temp.	10,902		7,7512		11,021		12,616		7,4730	
	f 49		f 35		f 36		f 36		f 43	
P	SIGNIFICATIVO P < 0,001									

TABLA XXVII.- Número total de mitocondrias

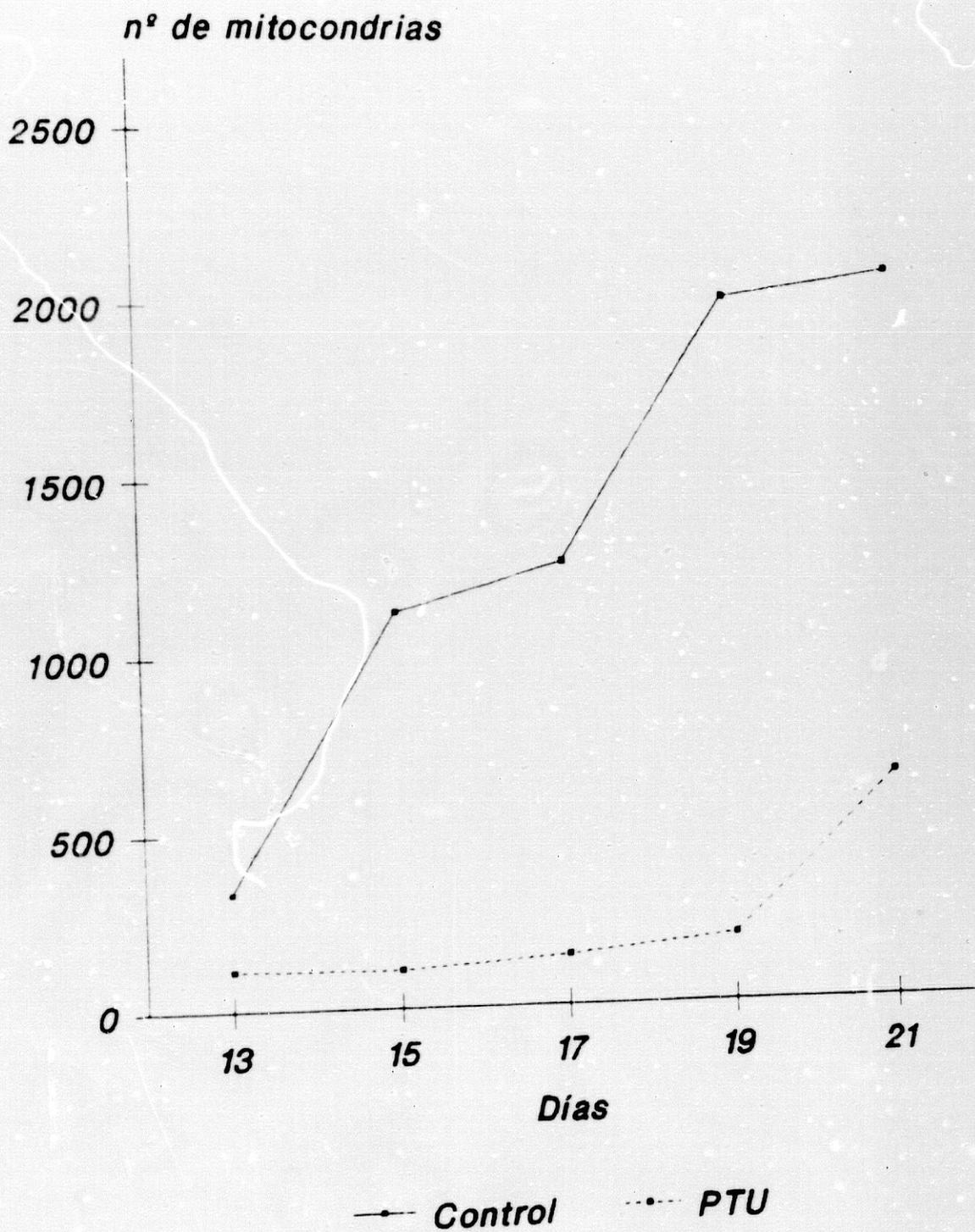


Gráfico XXVII.- Número total de mitocondrias

DISCUSION Y COMENTARIOS

La detección de una disfunción hormonal y su consiguiente corrección farmacológica es un hecho de gran trascendencia en la clínica. En primer lugar, porque posibilita corregir la deficiencia establecida y, en segundo término, porque la sustancia medicamentosa empleada para conseguir lo anterior puede ser el origen ó consecuencia de otros trastornos, fundamentalmente cuando la administración medicamentosa resulta ser dada a una paciente en estado gestacional.

Este es el caso de las embarazadas que padecen un hipertiroidismo, que debe ser corregido con la administración de drogas antitiroideas, las cuales sabemos que acarrearán en el embrión un amplio marco de minusvalías

entre las que podemos considerar, como fundamentales, las alteraciones en la estructuración y funcionalidad del SNC, que van desde un retraso mínimo a amplios estados de minusvalía cerebral. Junto a estas alteraciones, existen otras también, de gran trascendencia en el normal desarrollo embrionario, tanto desde el punto de vista bioquímico (alteraciones metabólicas de diversa índole), como modificaciones esqueléticas (condrogénesis), retraso somático. Y otras, como hemos comentado anteriormente en el capítulo de introducción.

Para estudiar la importancia que tiene la hormona tiroidea en el normal desarrollo embrionario, se han utilizado experimentalmente una vía indirecta, provocando estados de hipotiroidismo tras la administración de drogas antitiroideas a animales gestantes; fundamentalmente se ha utilizado la rata, así como en las aves, como es el caso que nos ocupa, administrando diversos derivados del tiouracilo "in ovo" en momentos cruciales de la embriogénesis en fases previas y en el momento en que el tiroides empieza a tener actividad endocrina (THOMMES, 1.977).

Las razones por las que administramos PTU no son otras que las de ser ésta misma droga la utilizada como

tratamiento hipertiroideo en los seres humanos. Si bien es cierto que este fármaco es muy efectivo para corregir los estados de hipertiroidismo, no es menos cierto que posee el inconveniente de pasar con facilidad la barrera placentaria, con lo cuál transtorna también a la par la función del tiroides fetal.

Este último hecho lo hace muy válido en el estudio experimental de hipotiroidismo provocado en mamíferos gestantes, ya que la prole va a verse afectada por un hipotiroidismo químico, y por consiguiente poder estudiar en el feto y recién nacido las alteraciones morfoestructurales y funcionales que provoca un hipotiroidismo a lo largo del desarrollo del nuevo ser.

La utilización pues, en el campo experimental, de las drogas antitiroideas no ha significado otra cosa que la de servir de herramienta válida para llegar al conocimiento de la acción que ejerce la hormona tiroidea sobre el desarrollo y maduración, tanto somática como visceral y endocrina, en períodos tempranos de la embriogénesis y estadios fetales. De este modo se ha llegado al conocimiento de que el retraso somático que acontece en los seres que se desarrollan bajo un clima de hipotiroidismo, es debido a que este ocasiona perturbaciones en la

capacidad biosintética de las proteínas, como lo demuestran los trabajos realizados en ratas por **EAYRS** (1.966); proponiéndose, así mismo, que las drogas antitiroideas actúan a través de la producción de formas no fisiológicas de ARN (**HAMERS, 1.961**), ó dando lugar a la formación irregular de nucleoproteínas (**PORTER, 1.962**), causas todas ellas que provocan una distorsión del crecimiento somático en general. No obstante, parece ser que una terapia oportuna con tiroxina administrada después del nacimiento, lo más precoz posible, puede rectificar y encauzar de nuevo el desarrollo somático.

Otros datos a tener en cuenta en la clínica en los seres desarrollados bajo un ambiente hipotiroideo han sido, como ya hemos comentado anteriormente, un evidente retraso del SNC, inmadurez, aumento de la mortalidad perinatal y una mayor abundancia de abortos y prematuridad. Todos estos datos son corroborados por una amplia bibliografía que hemos hecho constar en el capítulo de introducción.

Por lo que respecta al presente trabajo podemos decir que a las alteraciones somáticas, viscerales y metabólicas anteriormente citadas, hay que añadir las que son capaces de provocar sobre el desarrollo y funcionalidad

de las gónadas, en especial por lo que se refiere al ovario, tema elegido en nuestra tesis doctoral. Para ello hagamos un rápido recorrido por las distintas fases en que transcurre la organización morfológica y estructural del ovario, en los distintos períodos de la embriogénesis.

Es un hecho conocido que las células germinales ó gonocitos, de procedencia extraembrionaria (observables en las paredes de la vesícula vitelina), entran en el epitelio celómico, previamente engrosado, a los 2,5 días aproximadamente de incubación. Una vez allí alcanzan la zona donde se están organizando las crestas germinativas (FUJIMOTO, 1.976), alrededor del 3º día de desarrollo embrionario. El medio mediante en el cual llegan las células sexuales al epitelio germinativo parece ser que se lleva a cabo a través de una atracción realizada por el propio epitelio, es decir, este ejerce una quimiotaxis positiva sobre las células germinales (DUBOIS, 1.968 , REYNAUD, 1.971 ; CUMINGE, 1.971). Una vez alcanzadas las crestas gonadales, las células se multiplican rápidamente.

A los 3,5 días de incubación empieza a aparecer la cadena urogenital, la cuál se pone de manifiesto como un engrosamiento de la pared posterior del celoma, situándose

la gónada inicial en la superficie medial del mesonefros. Esta gónada primordial está constituida de una pars medular y una pars cortical; precisamente durante este período las células germinales están ocupando ambas partes de la gónada.

Durante este período de desarrollo la gónada va a presentar una bipotencialidad, es decir, se muestra como una gónada indiferente que puede dar lugar a uno ú otro sexo. Aunque veremos con posterioridad que sólo se va a diferenciar en el sexo femenino la gónada izquierda, ya que la derecha sufre un proceso de involución (**ROMANOFF, 1.960 ; MITTWOCH, 1.971**). Posteriormente (5 a 7 días de incubación), van a ocurrir secuencialmente, una serie de procesos en la gónada indiferente que dan como resultado la diferenciación definitiva de la misma. En el caso de la gónada femenina, objeto de nuestra atención, la izquierda va a aumentar en tamaño y complejidad. Hacia el 5º día de desarrollo la gónada derecha va a presentar, aproximadamente, la mitad de los gonocitos que la izquierda (**DELFORGE, 1.965**). La distribución de las células germinales es asimétrica, pero dicha asimetría es más pronunciada en el sexo femenino (**MEYER, 1.964 ; VAN LIMBORGH, 1.968 ; MITTWOCH, 1.971**).

Entre los días 5º y 6º de incubación se van a formar los cordones sexuales de la 1ª proliferación, por invaginación del epitelio germinativo, continuándose este proceso hasta el día 7 y constituir la parte profunda del esbozo por lo que se les ha llamado cordones medulares (ROMANOFF, 1.960 ; DE SIMONE-SANTORO, 1.967 ; CIVININI, 1.979).

Aproximadamente al 7º día de desarrollo embrionario se inicia la diferenciación sexual; dónde el ovario derecho sufre una degeneración, presentando casi una falta total de corteza, siendo por tanto la pars medular su principal constituyente. El ovario izquierdo, sin embargo, aumenta de tamaño. Se produce la 2ª proliferación que va a dar lugar a los cordones corticales constituyéndose el cortex del ovario, el cual va a estar separado de la pars medular por una capa de mesénquima denominada albugínea primaria.

Hacia el 8º día se produce en el cortex una intensa multiplicación de células germinales a las que se les llama oogonias, dato confirmado por STAHL y CARLON (1.973).

En el 9º día los cordones medulares, ó de la 1ª proliferación, adquieren luz, y aparecen una

serie de canales anastomosados de los que deriva el "rete ovarii"; otros cordones medulares degeneran después (hacia el día 12).

Alrededor del día 10 aparece un epitelio germinativo con poco espesor en las zonas donde existen los cordones secundarios y un grosor más notable donde no se han formado aún estos cordones. Los cordones secundarios están poco ordenados pero separados unos de otros, y el mesénquima medular se organiza en la cortical en forma de tabiques incompletos. La cortical está separada del hilio por los cordones de la 1ª proliferación. La medular está constituida por dos partes: una superficial, donde están los cordones germinativos y poco mesénquima, y otra profunda, ó yuxtahiliar, donde los cordones se han transformado en cavidades "rete ovarii" (ROMANOFF, 1.960 ; DELFORGE, 1.963).

Sobre el día 14 se va a desarrollar la albugínea secundaria, capa de tejido conectivo laxo de mesénquima subepitelial que se continúa con los septos del mesénquima subcortical. También alrededor de este día aparecen en el ovario las células intersticiales que se identifican como células

productoras de hormonas, dichas células, y las hormonas que secretan, tienen un papel importante en la diferenciación sexual de las gónadas y en su evolución (JORDANOW, 1.979).

De esta forma, la administración de PTU en los días 7, 9 y 11 de desarrollo van a frenar la puesta en marcha del tiroides en el momento en que el ovario embrionario está en fases de histogénesis para constituir su pars cortical y medular perfectamente organizados, hecho que, como hemos visto anteriormente, ocurre alrededor del 10º al 11º día de incubación, por tanto la deprivación tiroidea en el nuevo ser coincide en una fase importante del desarrollo ovárico, cuyas alteraciones se manifiestan ya desde el día primero de extracción de embriones (día 13).

Por lo que se refiere a los valores relativos, en un principio, día 13 de desarrollo, se ha podido observar que la densidad de superficie de la pars medular de los ovarios de los embriones hipotiroideos es mayor que en los normales; mientras que en la densidad de superficie de la pars cortical ocurre lo contrario, o sea, es menor en las gónadas hipotiroideas que en las de los controles.

Ambos parámetros manifiestan un comportamiento irregular a lo largo de todos los días estudiados por nosotros, hasta llegar al día 21 en que dicho parámetro es en los animales hipotiroideos menor que en los controles en la medular y mayor en la cortical.

El comportamiento que manifiestan los volúmenes es exactamente igual que el seguido en la densidad de superficie.

Dentro de la pars cortical, la densidad de superficie de las células germinativas empieza a ser en el día 13 de incubación, manifiestamente mayor en los ovarios hipotiroideos que en los controles. Sin embargo, la densidad de superficie ocupada por las células no germinativas tienen un comportamiento contrario que las anteriores. La densidad de volumen, tanto de las células germinativas como no germinativas, presenta un comportamiento semejante al que manifiesta la densidad de superficie.

Al estudiar parámetros relativos referidos a la foto realizada en un corte semifino del ovario, hemos podido observar que los parámetros referentes a la densidad de superficie celular (ovocito), así como a la densidad de

superficie nuclear y mitocondrial, se manifiesta en los animales hipotiroideos significativamente menor a la que presentan estos parámetros en los animales controles. Estas diferencias son altamente significativas durante todos los días de desarrollo por nosotros estudiado. Respecto a la densidad de volumen celular, nuclear y mitocondrial que presentan los animales hipotiroideos respecto a la foto, mantienen un valor en todo semejante a la de los parámetros de la densidad de superficie.

Al considerar los parámetros absolutos se ha puesto de manifiesto, a lo largo de todos los días de desarrollo estudiado, que los ovocitos hipotiroideos son ligeramente menores que los controles el día 13 de incubación en cuanto se refiere a la superficie celular, citoplasmática y nuclear. Sin embargo, estas diferencias, comienzan progresivamente a ser altamente significativas conforme van transcurriendo los días 15, 17, 19 y 21 de incubación, fundamentalmente por lo que se refiere a los dos parámetros primeros (superficie celular y citoplasmática). La superficie nuclear del ovocito hipotiroideo también se manifiesta menor que en los animales controles, pero no presenta diferencias tan altamente significativas en el último de los días por nosotros estudiado.

Respecto a las mitocondrias la superficie que presenta cada una de ellas en los animales hipotiroideos es francamente superior a lo normal en casi todos los días de desarrollo, si bien manifiesta diferencias altamente significativas respecto, desde el día 15 al día 21 ambos inclusive. Sin embargo, la superficie total de las mitocondrias del ovocito hipotiroideo es durante todo el proceso de desarrollo significativamente menor a la que ostenta este parámetro en el ovocito normal, con diferencias altamente significativas como hemos podido observar anteriormente ($P < 0,001$).

Al estudiar el volumen del ovocito hipotiroideo, observamos, como es lógico, que este parámetro en ovarios hipotiroideos es menor que lo normal durante todo el período de incubación, con diferencias altamente significativas los días 15, 17 y 19 respecto a los normales ($P < 0,001$), no ocurriendo igual los días 13 y 21 dónde este parámetro arroja unas diferencias significativas ($P < 0,02$). Otro tanto podemos decir respecto a lo que acontece al volumen citoplasmático.

En cuanto al volumen nuclear, menor en los ovocitos hipotiroideos que en los controles, muestra unas diferencias altamente significativas los días 15, 17 y 19,

mientras que tiende a recuperarse, sin lograrlo, en el día 21 de incubación.

Respecto al volumen que presenta cada mitocondria, también es mayor en los ovocitos hipotiroideos que en los controles, estabilizándose dicho aumento desde el día 15 hasta el final de la experiencia, momento en que muestra diferencias altamente significativas respecto a los controles.

En definitiva, podemos decir que los resultados encontrados en los parámetros que hemos analizado en los animales hipotiroideos nos aclaran el hecho de que la privación tiroidea altera el normal comportamiento del desarrollo de la estructura ovárica, durante todo el período de incubación analizado. Fundamentalmente, las células que parecen sufrir en mayor grado el impacto hipotiroideo, son las germinativas, teniendo que decir al respecto que la densidad de volumen de las mismas, en el cortex ovárico, es discontinua durante todo el período analizado, hasta llegar al día 21 de incubación en que la densidad de volumen es ligeramente menor a la que presentan los animales controles.

Dónde más se hace notar la privación tiroidea es

en el ovocito, ya que este se presenta más pequeño de lo normal, tanto respecto a la superficie como al volumen celular y nuclear; otro dato de interés es que estas células presentan un menor número de mitocondrias, aunque sean de mayor tamaño que las que poseen los ovarios de los animales eutiroides. Ello da pues la sensación de que hemos sorprendido a la célula primordial ovárica (ovocito) en un momento especial de su proceso de maduración, el cuál ha sido retrasado al faltarle el estímulo hormonal de la glándula tiroides; ya que esta ha sido puesta fuera de juego en una fase del desarrollo en que empieza a ser funcionante.

No hemos encontrado, en la bibliografía, datos morfométricos en los que poder contrastar los encontrados en nuestra experiencia, sólomente los suministrados por **CSABA** (1.980) el cuál afirma que los efectos de la TSH sobre el ovario son significativos con respecto al incremento del peso del órgano y a las mitosis de los oocitos, pero no aclara más sobre otros parámetros.

Creemos pues, que el estudio morfométrico llevado a cabo en la presente tesis doctoral aporta un mayor conocimiento sobre el comportamiento de la estructura ovárica, durante la fase de su morfogénesis, ante un estado

de hipotiroidismo. Pero si bien esto es cierto, también tenemos que dejar muy claro que las modificaciones encontradas se limitan sólo y exclusivamente a las alteraciones morfométricas obtenidas tras el análisis de determinados parámetros, y que ellos no resultan transportables, por sí solos, para sacar conclusiones sobre el aspecto de posibles modificaciones de carácter funcional.

Pero, como ocurre con todo trabajo de investigación, los resultados obtenidos en la presente experimentación, además de aportar nuevos conocimientos conlleva, a la par, a nuevas preguntas que no podemos darles respuesta en el contexto de este trabajo. Dichas incógnitas se pueden plantear en muy diversos términos. Así, por ejemplo, ¿Son directamente el resultado de una interferencia en el proceso de maduración celular?.

Por otra parte, podríamos preguntarnos otras cuestiones de no menos trascendencia, fundamentalmente por lo que se refiere al interés clínico, cuál es el hecho que los animales tratados con PTU, durante su fase embrionaria, pueden ó no ser capaces de superar su desviación respecto a la normalidad de su maduración ovárica, morfofuncionalmente considerada, en fases

postnatales, sin ayuda de una opoterapia tiroidea oportuna; ó desde un punto de vista funcional, si esta terapia puede ó no solucionar la posible alteración de los ovarios hipotiroideos.

Nuestra experiencia, en este campo de la teratología experimental, nos hace ser cautos ante tales interrogantes, ya que sería necesario ampliar nuestro estudio morfométrico en edades postnatales próximas, medias y tardías, así como el llevar a cabo otros tipos de experimentación que aclaren a ser posible de forma determinante, el pronóstico de las alteraciones de la funcionalidad ovárica en niñas gestadas en un ambiente hipotiroideo.

CONCLUSIONES

Una vez realizado el análisis morfométrico en los ovarios del embrión de pollo, sometidos a un hipotiroidismo químico tras la administración de PTU, hemos llegado a las siguientes conclusiones:

1.- Existen diferencias entre el ovario control y el ovario tratado con PTU, las diferencias tienen distintos grados de significatividad dependiendo del parámetro y día estudiado.

2.- Se afecta tanto la corteza como la médula. Dentro de la corteza se afectan más las células germinales

que las no germinales.

3.- El ovocito hipotiroideo sufre alteraciones en su tamaño, tanto en superficie como en el volumen citoplasmático y nuclear, los cuales son más pequeños en los tratados.

4.- Los valores absolutos también presentan una disminución en los tratados respecto a los controles, mediante los cuales queda de manifiesto, con toda claridad, que el ovocito hipotiroideo es más pequeño, en su conjunto, que el normal.

5.- El ovocito hipotiroideo muestra un menor contenido mitocondrial, pero estas son de mayor superficie y volumen que las que presentan los ovocitos del animal control.

BIBLIOGRAFIA

ABELLA-PEREZ, M. (1.981) Estudio de la proteina transportadora de las hormonas sexuales (shBG) en sujetos normales y en enfermos con hiper e hipo función tiroidea. ACTUALIDAD MEDICA, 67 (655), 69-75.

ADAMS, A. E. and BULL, A. L. (1.949) The effect of antithyroid drugs an chick embryos. ANAT. REC., 104, 421-444.

ADAMS, A. E. and BUSS, J. A. (1.951) The effect of the antithyroid drug on hiperplasia in the thyroid of the chick embryo. ENDOCRINOLOGY, 37, 382-384.

ADAMS, W. C. and LEATHEM, J. H. (1.964)

Influence of hypothyroidism and chorionic gonadotrophin on ovarian collagen in the rat. *ENDOCRINOLOGY*, 75, 138-139.

AIRE, T. A. (1.981) The rete testis of birds.

J. ANAT., (1), 97-110.

ANDREWS, F. N.; SCHNETZLER, E. E. (1.945) The

effect of feeding thiouracil to hens upon the gland of chicks. *ENDOCRINOLOGY*, 37, 382-384.

APGAR, V. (1.964) Drug in pregnancy. *J. M. A.*,

190, 840.

BAGNASCO, M.; CHIMINI, G.; CROCI, R. y cols.

(1.982) Sex hormone binding globulin (SHbg) radioassay in patients with initial thyroid failure. *J. NUCL. MED. ALLIED. SCI.*, 36 (3), 161-165.

BALLESTER, F. (1.981) Amenorrea-galactorrea

secundaria a hipotiroidismo primitivo. *MEDICINA ESPAÑOLA*, 44 (80), 208-216.

BAYLISS, P. F. C.; VAN'T HOFF, V. (1.969)

Amenorrhea and galactorrhea associated with hypothyroidism.
THE LANCET, 27, 1.399-1.400.

BECKS, H.; SIMPSON, M.; EVANS, H.; RAY, R.;
LI, C. and ASLING, W. C. (1.964) Response to pituitary
growth hormone and thyroxine of the tibias of
hypofisectomized rat after long post-operative intervals.
ANAT. REC., 94, 631-656.

BENNET, M. F. and ADAMS, A. E. (1.952) Changes
in the thyroids of chick embryos injected with successive
doses of thiourea. ANAT. REC., 113, 587-588.

BENOIT, J. (1.937) Relation between thyroid and
growth of testes and penis when stimulated by electric
light. PROC. SOC. EXP. BIOL., 36, 782.

BISPINK, L.; BRANDLE, W.; LINDNER, C. and
BETTENDORF, G. (1.989) Subclinical hypothyroidism and
ovarian insufficiency. GEBURTSHILFE FRAVENEILKD, 94 (10),
881-888.

BONET, H. G.; FIEDLER, K.; LEIDENBERGER, F. A.
(1.981) Subclinical hypothyroidism and infertility.

THE LANCET, 8.258 (II), 1.278.

CHAHAL, P.; SIDHU, R.; JOPLIN, G. F. and HAWKINS, D. F. (1.981) Treatment of thirotoxicosis in pregnancy. J. OBSTET. GYNECOL., 2 (1), 11-19.

CHERON, R. G.; KAPLAN, M. M.; LARSEN, P. R.; SELENKOW, H. A. and CRIGLER, J. F. (1.981) Neonatal thyroid function after propylthiouracil therapy for maternal Graves disease. THE NEW ENGLAND J. OF MEDICINE, 304 (9), 525-528.

CHOPRA, I. J. (1.975) Gonadal steroids and gonadotropins in hyperthyroidism. MED. CLIN. N. AMER., 59 (5), 1.119-1.121.

CIVININI, A. and MASTROLLA, L. (1.979) Quelques obsevations sur la formation de la tunica albuginea primaire dans l'ovarie embryonnaire de poulet. ARCHIVES D'ANATOMIE MICROSCOPIQUE, 68 (2), 99-120.

CONTOPOULUS, A. N.; KONEFF, A. A. (1.963) Pituitary hormone production and release in the thyroidectomized rat after thyroxine administration. ACTA

ENDOCRINOL., 42, 275.

CONTOPOULUS, A. N.; SIMPSON, M. E.; KONEFF, A. A. (1.958) Pituitary function in the thyroidectomized rat. ENDOCRINOLOGY, 63, 642.

COOPER, D. S. (1.984) Antithyroid drug. N. ENGL. J. MED., 311 (21) 1.353-1.362.

CSABA, G.; SHAHIN, M.A. and DOBOZY, O. (1.980) The overlapping effect of gonadotropins and TSH on embryonic chicken gonads. ARCH. ANAT. HISTOL. EMBRYOL., 63, 31-38.

CUMINGE, D. and DUBOIS, R. (1.971) Etude ultrastructurale et autoradiographique de l'organogenèse sexuelle précoce chez l'embryon de poulet. EXPERIMENTAL CELL RESEARCH, 64, 243-258.

DELFORGE, J. P.; SCHIPPERS, M. (1.965) Activités enzymatiques dans les ébauches des deux gonades femelles de *Gallus domesticus* pendant l'ontogénèse et après l'éclosion. ACTA. ANAT., 61, 355-378.

DE SIMONE-SANTORO, I. (1.967) Remarks on the fine

structure of the ovary in chicken embryos. BOLLETINO DELLA SOCIETA ITALIANA DI BIOLOGIA SPERIMENTALE. NAPOLES., 43, 1.305-1.308.

DUBOIS, R. et CUMINGE, D. (1.968) On the ultrastructural and histochemical aspect of germ cells of the chick embryo. ANNALES D'HISTOCHIMIE, PARIS., 13, 35-50.

FAYRS, J. T. (1.966) Thyroid and central nervous development. SCI. BASIS. MED. ANNV. REV. G. B., 317-339.

FAYRS, J. T.; TAYLOR, S. H. (1.951) The effect of thyroid deficiency induced by methyl thiuracil on the maturation of the central nervous system. J. ANAT., 85, 350-358.

EVERS, J. L. H. and ROLLAND, R. (1.981) Primary hypothyroidism and ovarian activity evidence for an overlap in the synthesis of pituitary glycoproteins. BRITISH JOURNAL OF OBSTETRICS AND GYNAECOLOGY, 88, 195-202.

FARROQUI, A. A. ; ELKOUBY, K. ; MANDEL, P.
(1.977) Effect of the of hydrocortisone and thiroxina and arylsulfatases A and B of cultured cells of neuronal and glial origh. J. NEUROCHEM., 29, 365-369.

FAY, M.; ROTI, E.; FANG, S. L.; WRIGHT, G.
et al. (1.984) The effects of propylthiouracil, iodothyronines, and other agents on thyroid hormone metabolism in human placenta. JOURNAL OF CLINICAL ENDOCRINOLOGY AND METABOLISM, 58 (2), 280-286.

FERGUSON, T. (1.966) Thyroxine effect upon the mitotic activity of the medula oblongata after unilateral excision in embryos of the frog. GEN. COOMP. ENDOCRINOLOGY., 7, 74-79.

FISH, L. H.; MARIACH, C. N. (1.988)
Hyperprolactinemia, infertility and hypothyroidism. ARCH. INTERN. MED., 148, 709-711.

FRASCA, J. M. and PARKS, V. R. (1.965) A routine technique for double-staining ultrathin sections using uranyl and lead salts. J. CELL. BIOL., 25, 157.

FREEDLAND, R. A.; MURAD, S. (1.969) Effect of thyroid hormones on metabolicus. III Effect of thyroxine and thyroidectomy on adrenal gland enzyme activities. *ENDOCRINOLOGY.*, 84, 692-694.

FUJIMOTO, T.; UKESHIMA, A.; KIYOFUJI, R. (1.976) The origin, migration and morphology of the primordial germ cells in the chick embryo. *ANAT. REC.*, 185, 139-154.

GARCIA-ARGAIZ, C. A.; PASQUINI, J. M.; KAPLUM, B.; GOMEZ, C. J. (1.967) Hormonal regulation of brain development I.I. Effect of neonatal thyroidectomy on succinate dehydrogenase and other enzymes in developing cerebral cortex and cerebellum of the rat. *BRAIN RESEARCH*, 6, 635-646.

GEEL, S. E.; VALCANA, T.; TIMARAS, S. P. (1.967) Effect of neonatal hypothyroidism of thyroxine and L-¹⁴C leucine incorporation protein in vivo and the relationship to in vivo levels in the developing of the rat. *BRAIN RESEARCH*, 4, 143-150.

GIRKIN, G.; KAMPSCHMIDT, R. F. (1.961) Effect

of thiouracil on liver enlargement in tumor-bearing rats.
AM. J. PHYSIOL., 200 (1) 61-63.

GOMMERS, A. (1.967) Recherches sur le rôle de la
thyroïde maternelle dans le développement prénatal du rat.
THESIS BRUSSEL.

GONZALEZ-SANTANDER, R. (1.968). Técnicas de
microscopía electrónica en biología. MADRID. ED.
AGUILAR.

GRAVE, G. D. ; SATTERTHWJTE, S. ; KENNEDY, C.
; **SOKOLOFF, L.** (1.973) Accelerated postnatal
development of D (-) hydroxybutyrate dehydrogenase
(EC I.I.I.30) activity in brain in hyperthyroidism. J.
NEUROCHEM., 20, 495-501.

GROSSOWICZ, N. (1.946) Influence of thiourea on
development of the chick embryo. PROC. SOC. EXP. BIOL.,
63, 151-152.

HAMBURGH, M. ; BUNGE, R. P. (1.964) Evidence
for a direct effect of thyroid hormone on maturation
of neurones tissue growth "in vitro". LIFE SCIENCES.,

3, 1.423-1.430.

HAMBURGH, M.; VICAR, J. E. (1.957) Effect of thyroid hormone on nervous system maturation. *ANAT. RECOR.*, 127, 302.

HAMERS, R. T.; CASTERMAN, C. (1.961) Synthesis by *Echericha coli* of an Ab normal. Galactosidase in the presence of thiouracil. *J. MOLEC. BIOL.*, 3, 166-174.

HAYAT, M. A. (1.981) Principles and techniques of electron microscopy. *BIOLOGICAL APPLICATIONS.*, VOL 1, ED. ARNOLD.

HEMADY, Z. S.; SILER-KHODR, T.M. and NAJJAR, S. (1.978) Precocius puberty in juvenile hypothyroidism. *THE J. PEDIATRICS*, 92 (1), 55-59.

HERRERA-POMBO, J. L. (1.969) Correlación tiroides-gónadas. *REVISTA CLINICA ESPAÑOLA*, 115, 11-16.

HEYBURN, P. J.; GIBBY, O. M.; HOVRIHAN, M. et al. (1.986) Primary hypothyroidism presenting as amenorrhea and galactorrhea with hiperprolactinaemia

and pituitary enlargement. BR. MED. J., 292 (6.536),
1.660-1.661.

HOFF, H. G.; WINDECK, R. and REINWEIN, D.
(1981) Treatment of thyroid disease during pregnancy.
THERAPIEWACHE, 32 (8), 1.028-1.039.

HOPPER, A. F. (1.962) Uptake of P^{32} by cystic
ovary of rat. ENDOCRINOLOGY, 71, 740.

**HORGER, E. O.; KENIMER, J. G.; AZUKIZWA, H. et
al.** (1.976) Failure of triiodothyronine to prevent
propylthiouracil induced in hypothyroidism and goiter in
fetal sheep. OBSTET. GYNECOL. (NY), 47 (1) 46-49.

**JONCKHEER, M. H.; DECOSTRE, P. and BASTENIE,
P. A.** (1.976) Hyperthyroidism and pregnancy. REV. FRANC
GYNECOL., 71 (3), 205-209.

JORDANOV, J. and ANGELOVA, P. (1.979) Some
relationship among germ, satellite and interstitial
cells during chick gonad differentiation: A tissue culture
study. ANN. BIOL. ANIM. BIOCH. BIOPHYS., 19 (4B),
1.279-1.288.

KAMIJO, K.; SAIT , T.; SAITO, M. et al. (1.990)
Transient subclinical hypothyroidism in early pregnancy.
ENDOCRINOL JON, 37 (3), 397-403.

KAMPMANN, J. P.; HANSEN, J. M.; JOHANSEN, K.
and HELWEG, J. (1.980) Propylthiouracil in human milk.
THE LANCET, 1, 736-738.

KASAI, K.; SUZUKI, H.; SHIMODA, S.I. (1.980)
Effects of propylthiouracil and relatively small doses of
iodide on early phase treatment of hyperthyroidism. ACTA
ENDOCRINOLOGICA, 93, 315-321.

KIDD, G. S.; GLASS, A. R. and VIGERSKY, R.
A. (1.979) The hypothalamic-pituitary-testicular axis in
thyrotoxicosis. ENDOCRINOL. METAB., 48 (5), 798-802.

KING, B. D.; DELFINER, J. S. (1.974) Effect of
the goitrogen methineazole on skeletal muscle growth of
chick embryos. GEN. COMP. ENDOCRINOL., 24, 17-27.

KLEIN, R. Z.; HADDOW, J. E.; FIX, J. D. et al.
(1.991) Prevalence of thyroid deficiency in pregnant women.
CLIN. ENDOCRINOL., 35 (1), 41-46.

LAL, P. and TAPLIYAL, J. P. (1.982) Thyroid-gonad and thyroid-body weight relationship in the red-vented bulbul, *Molpaster cafer*. GEN. COMP. ENDOCRINOL., 48 (1), 98-103.

LAZO, E. A. (1.960) Pituitary ACTH levels during adrenal involution following thiouracil. PROC. SOC. EXP. BIOL. MED., 103, 300-302.

LEE, P. A.; and BLIZZARD, R. M. (1.974) Serum gonadotropins in hypothyroidism girls with and without sexual precocity. JHONS HOPKINS MED. J., 135 (1), 55-60.

LEGRAND, J. (1.963) Maturation du cerebelet et deficiencie thyroidiene: donues cronologiques. ARCH. ANAT. MORPHOL. EXP., 52 (2), 205-214.

LEGRAND, J.; KRIEGEL, A.; JOST, A. (1 51)
Deficiencie thyroidene et maturation du cerevelet chez le rat blanc. ARCH. ANAT. MORPHOL. EXP., 50, 507-520.

LEHNERDT, F. (1.909) Zur frage der
subtitution des calcims in knochensystem durch

strotium. ZIRGIER. S. BEITR., 46, 468.

LEVAY, G.; MORICZ, F.; SZERZE, P.; PETRANYI, R. G. and LACZKO, J. (1.969) The effect of thyrotropic hormone treatment on the epiphyseal cartilage of the white rat. ACTA MORPHOL. ACAD. SCI. HUNG., 17, 7-15.

LINDSAY, A. N.; VOORHESS, M. L. and MacGILLIVRAY, M. H. (1.983) Multicystic ovaries in primary hypothyroidism. OBSTETRICS & GYNECOLOGY, 61 (4), 433-437.

LINDSAY, A. N.; VOORHESS, M.L. and MacGILLIVRAY, M. H. (1.983) Multicystic ovaries detected by sonography in children with hypothyroidism. AM. J. DIS. CHILD., 134, 588-592.

LIPPE, M. S. (1.977) Thyroidal influence on the lactate dehydrogenase isozyme pattern in pectoralis muscle of chick embryos. GEN. COM. ENDOCRINOL., 33, 405-411.

LORCY, Y. and ALLANNIC, H. (1.979) Hyperthyroidism and pregnancy. REV. FR. GYNECOL. OBSTRET., 74 (1), 19-26.

MARKS, H.; NIX, D. F. (1.973) Growth response of stocks with different growth rates to thiouracil. *POULT. SCI.*, 52, 112-115.

MARTIN, A. Y LUNA, J. D. (1.989) Bioestadística para las ciencias de la salud. MADRID. ED. NORMA S.A.

MARTINEZ, M. A.; FERNANDEZ, E. Y PALACIOS, S. (1.981) Hipotiroidismo y gestación. *REVISTA CLÍNICA ESPAÑOLA*, 163 (2), 163-169.

MASTERSON, E.; EDELHAUSER, H. F.; VAN HORN, D. L. (1.975) Development of corneal transparency in embryonic chick: influence of exogenous thyroxine and thiouracil on structure water and electrolyte content. *DEV. BIOL.*, 43 (2), 233-239.

MEGIAS, L.; RODA, J. A. (1.988) "Embryonic hypothyroidism" I alteration in vertebral column growth. *ARCH. BIOL. (BRUSELLES)*, 99, 385-395.

MESTMAN, J. H.; MANNING, P. R. and HODGMAN, J. (1.974) Hyperthyroidism and pregnancy. *ARCH. INTERN.*

MED., 134 (3) 433-439.

MEYER, D. B. (1.964) The migration of primordial germ cells in the chick embryo. DEVELOPMENTAL BIOLOGY, 10, 154-190.

MILLONIG, G. (1.964) Study on the factors which influence preservation of fine structure. IN: P. BUFFA (ED.), SYMPOSIUM OF ELECTRON MICROSCOPY, P. 347.

MITTWOCH, U.; NARAYANAN, T. L.; DELHANTY, J. D. A. et al. (1.971) Gonadal growth in chick embryos. NATURE (NEW BIOLOGY), 231, 197-200.

MORLEY, G. and SHAFFNER, C. S. (1.949) Chick thyroid size incubation period as influenced by thyroxine, thiouracil and thyroprotein. POULT. SCI., 28, 223-228.

MYANT, N. B. (1.966) On the possible role of the thyroid in the control of the development of the mamalian brain. BIOL. NEONAT., 9, 148-165.

PASQUINI, J. M.; FARYNA DE RAVEGLIA, J. A.;
CAPITAN, N.; SOTO, E. F. (1.981) Neonatal

hypothyroidism early under nutrition in the rat: defective maturation of structural membrane components in the central nervous systems. *NEUROCHEM. RES.*, 6 (9), 979-991.

PASQUINI, J. M.; KAPLUM, B.; GARCIA-ARGAIZ, C. A. GOMEZ, G. J. (1.967) Hormonal regulation of brain development i. the effect of neonatal thyroidectomy upon nucleic acids, protein and two enzymes on developing cerebral cortex and cerebellum of the rat. *BRAIN RESEARCH*, 6, 621-634.

PORTER, C. A. (1.962) Incorporation of 2-thiouracil-S into RNA and Acid-soluble nucleotides of Vamorr 48 Tabasco. *Virology*, 15, 504-506.

POTTER, J. D. (1.980) Hypothyroidism and reproductive failure. *SURG. GYNECOL. OBSTET.*, 150 (2), 251-255.

RABIE, A.; FAVRE, C.; CLAVEL, M. C. and LEGRANL, J. (1.977) Effect of thyroid dysfunction on the development of the rat cerebellum, with special reference to cell death within the internal granular layer. *BRAIN RESCH.*, 120 (3), 521-531.

RAMAYYA, M. V.; RUVALCABA, R. H. and KELLEY, V. C. (1.982) Hypothyroidism in pregnancy its effect on the foetus. *THE LANCET* I junio, 1.281-1.283.

RASCIO, L. (1.967) Effecti dell'acido pantotenico e dell'asociaciones acido pantotenico e tiroxina sullo sviluppo del surrene. Ricerche in embione di pollo. *BOLL. SOC. BIOL. SPR.*, 43 (24), 1.915-1.917.

REDMOND, M. D. (1.978) Hyperthyroidism during pregnancy. *N. ENGL. J. MED.*, 298 (2), 717-718.

REYNAUD, G. (1.971) Sur les durées respectives de pouvoir attractif de l'épithelium germinatif et de la réactivité des cellules germinales à ce pouvoir, chez l'embryon de poulet. *EXPERIENTIA*, 27, 940-941.

REYNOLDS, E. S. (1.963) The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *J. CELL. BIOL.*, 17, 208.

RIDGWAY, E. C.; MALOOF, F. and LONGCOPE, C. (1.982) Androgen and estrogen dynamics in hyperthyroidism. *J. ENDOCRINOL.*, 95 (1), 105-115.

RODA, J. A.; MEGIAS, L. (1.979) Acción del 4-propil-2-tiouracilo en el desarrollo del embrión de pollo. Análisis estadístico. AN. DESARR., 23 (55), 143-151.

RODA, J. A.; MEGIAS, L. (1.981a) Retraso en el desarrollo somático del embrión de pollo, tras la administración de drogas antitiroideas. AN. DESARR., 25 (58), 111-122.

RODA, J. A.; MEGIAS, L. (1.981b) Alteraciones en la evolución del peso del encéfalo de embriones de pollo, tras se sometidos a hipotiroidismo químico. AN. DESARR., 26 (60), 151-168.

RODA, J. A.; MEGIAS, L. (1.989) "Embryonic hypothyroidism" II alteration in lower limb growth. ARCH. BIOL. (BRUSELLES), 100, 273-282.

RODA, J. A.; MEGIAS, L.; BOLAÑOS, M. J. (1.982) Anomalías de la constitución laminar y cisureción del cerebelo en el desarrollo perinatal del pollo hipotiroideo. AN. DESARR., 27 (61), 69-81.

RODRIGUEZ, S.; ZERON, J. E. and DIAZ, J. L.

(1.979) Galactorrhea and hypothyroidism. GINECOL. OBSTET. MEX., 46 (277), 347-353.

ROGLER, J. C. (1.959) Effect of thiouracil and thyroxine on chick embryo development. POULT. SCI., 38, 1.027-1.032.

ROJDMARK, S.; BERG, A. and KALLNER, G. (1.988) Hypothalamic -pituitary-testicular axis in patients with hyperthyroidism. HORMONE RES., 29, 190.

ROMANOFF, A. L. (1.960) The avian embryo. NEW YORK. THE MACMILLAN COMPANY.

ROMANOFF, A. L. and LAUFER, H. (1.956) The effect of injected thiourea on the development of some organs of the chick embryo. ENDOCRINOLOGY, 59, 611-619.

ROSS, F. and NUSINOWITZ, M. L. (1.968) A syndrome of primary hypothyroidism, amenorrhea and galactorrhea. J. CLIN. END. METAB., 29, 591-595.

ROTMENSCH, S. and SCOMMEGNA, A. (1.989) Spontaneous ovarian hyperstimulation syndrome associated

with hypothyroidism. AM. J. OBSTET. GYNECOL, 160,
1.220-1.222.

SCHREIBER, V.; KMENTOYA, V.; ZAVADIL, M.

(1.964) Relationships between gonadotrophin and thyrotrophin secretion: inhibition of compensatory hypertrophy of rat ovaries by methylthiouracil. *PHYSIOLOGIA BOHEMOSLOVACA. PRAGA.*, 13, 554-564.

SERUP, J. (1.978) Maternal propylthiouracil to manage fetal hyperthyroidism. *THE LANCET*, 2, 896.

SHAHIN, M.A.; CSABA, G. and DOBOZY, O. (1.980)

Effect of gonadotropins and thyrotropin on the testes and ovaries of the newly hatched chicken. *ACTA. MORPHOL. ACAD. SCI. HUNG.*, 28 (4), 317-335.

SHAHIN, M.A.; DOBOZY, O. and CSABA, G. (1.985)

The overlapping effect of TSH and FSH on the embryonic chicken gonads at the mid incubation period. *Z. MIKROSK. ANAT. FORSCH. LEIPZIG*, 99 (1), 169-175.

SHAHIN, M.A.; TÖRÖK, O. and CSABA, G. (1.982)

The overlapping effect of thyrotropin and gonadotropins in

ckick embyo gonads "in vitro". ACTA. MORPHOL. ACAD. SCI. HUNG., 30 (2), 119-125.

SHAHSHAHANI, M. N.; WONG, E.T. (1.978) Primary hypothyroidism, amenorrhea and galactorrhea. ARCH. INTERN. MED., 138 (9), 1.411-1.412.

SHAPIRO, S. ; VUKOVICH, K. ; GLOBUS, A. (1.973) Effect of neonatal thyroxine and hydrocortisone administration on the development of dendritic spines in the visual cartex of rats. EXPERIMENTAL NEUROLOGY., 40, 286-296.

SOLOMON, D. H. (1.981) Pregnancy and PTU. N. ENGL. J. MED., 304 (9), 338-339.

STOCKIGT, J. R.; TOPLISS, D. J. (1.989) Hyperthyroidism current drug therapy. DRUG, 37, 375-381.

STAHL, A. and CARLON N. (1.973) Morphogènèse des cordons sexuels et signification de la zone médullaire de la gonade chez l'embryon de poulet. ACTA. ANAT., 85: 248-274.

TANABE, Y. (1.965) Comparison of the effects of thiouracil, propyl-thiouracil and metimazole on I^{131} metabolism by the chick thyroid and measurements of thyroxine secretion rates. GEN. COMP. ENDOCRINOL., 5, 60-68.

TATA, J. R. (1.962) Intracellular and extracellular mechanisms for the utilization on action of thyroid hormones. RECENT PROG. HORMO. RES., 18, 221-68.

TATA, J. R. (1.963) The action of thyroid hormones at the cell level. BIOCHEM. J., 86, 408-428.

THAPLIYAL, J. P. and GUPTA, B. B. (1.984) Thyroid and annual gonad development, body weight, plumage pigmentation, and bill color cycles of Lal munia, Estrilda amandava. GENERAL AND COMPARATIVE ENDOCRINOLOGY, 55, 20-28.

THAPLIYAL, J.P. and PAUDHA, S.K. (1.967) Effect of thyroidectomy on gonads, adrenal and liver of the black-headed, Munia malacca malacca. ENDOKRINOLOGIE, 51, 234-240.

THOMMES, R. C.; VIETH, R. L.; LEVASSEUR, S.

(1.977) Effects of hypothyroidism by means of surgical decapitation on thyroid function in developing chick embryo. GEN. COMP. ENDOCRINOL., 31 (1), 29-36.

TUSQUES, J. (1.956) Recherches experimentales sur le rôle de la thyroïde dans le développement du système nerveux. BIOL. MED., 45, 395-431.

TUSQUES, J. ; LEFRANC, G. ; GEROGE, Y.

(1.967) Analyse par la technique de Golgi-lax de la maturation du cortex cérébelleux sous l'influence de la tiroxine chez le rat norvégien. C. R. SOC. BIOL., 161, 2.256-2.260.

VALENTI, G.; CEDA, G. P.; TARDITI, E. et al.

(1.977) LH and FSH (basal values and pituitary responses to GnRh) in hyperthyroidism. ANN. ENDOCRINOL., 38 (5), 335-341.

VAN WYNSBERGHE, D. M.; BHATJA, S.; IKLIGAARD,

H. M. (1.978) Effects of thyroxine and triiodo-thyroacetic acid on cerebral myelinating lipids. LIFE SCIENCES, 22 (1), 15-18.

VAN LIMBORGH, J. (1.968) Le premier indice de la differentiation sexuelle des gonades chez l'embryon de poulet. ARCHIVES D'ANATOMIE MICROSCOPIQUE, 57 (1), 79-90.

VIDAL, A. (1.952) Influence de la thurée sur le developement de l'embryon de poulet. ANNALES D'ENDOCRINOLOGIE, 13, 982-990.

WALKER, P.; WEJCHEL, M. E.; FISHER, D. A.; GUD, S. M. (1.979) Thyroxine increases nerve growth factor concentration in adult mouse brain. SCIENCE., 204 (4.391), 427-429.

WEIBEL, E. R. and BOLENCER, R. P. (1.973) Stereological techniques for electron microscopic morphometry. IN: PRINCIPLES AND TECHNIQUES OF ELECTRON MICROSCOPY. M. A. HAYAT, ED. VAN NOSTRAND-REINHOLD CO., NEW YORK, 3, 237-296.

WILANSKY, D. L.; GREISMAN, B. (1 989) Early hypothyroidism in patients with menorrhagia. AM. J. OBSTET. GYNECOL., 160, 673-677.

WISHART, G. J.; LEAKEY, J. E. A. and DUTTCN, G. J. (1.977) Differential effects of hormones on precocious yolk sac retraction in chick embryos following administration by a new technique. GEN. COMP. ENDOCRINOL., 31 (3), 373-380.

WORLEY, R. J. Crosby, W. H. (1.974) Hyperthyroidism during pregnancy. AMER. J. OBSTET. GYNECOL., 119 (2), 150-155.

WORTSMAN, J.; ROSNER, W. and DUFAU, M. L. (1.987) Abnormal testicular function in men with primary hypothyroidism. THE AMERICAN JOURNAL OF MEDICINE, 82, 207-212.