



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

DISTRIBUCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA DE
[Ca²⁺]_i DE TIROTROPOS A TRH EN REBANADAS DE
HIPÓFISIS DE RATÓN MACHO ADULTO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A:

DIANA CECILIA DEL RÍO VALDÉS

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. TATIANA FIORELISIO COLL

2012





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Dedicatoria

“Cogitate humo ad eius potentiam non reditur”

*Con amor y respeto a la memoria de mis abuelos Pipe y Pancho, y a mis tías
Tota y Licha.*

*A mis padres, Jesús y Claudia, por su infinita confianza, cariño y constante
aliento. Mi más profundo agradecimiento por ofrecerme una educación
íntegra.*

A mi hermana Cali, mi mejor amiga en la vida.

A Alejandro Olloqui, por su amor y paciencia.

*A mis abuelas Queta y Martha, y toda mi hermosa familia, por su apoyo
incondicional.*

Por supuesto, a la Doña.

Distribución y caracterización de la respuesta de $[Ca^{2+}]_i$ de tirotropos a TRH en rebanadas de hipófisis de ratón macho adulto

Resumen

La hipófisis anterior es una glándula heterogénea con múltiples tipos celulares. Los tirotropos representan aproximadamente el 5% de la población de estas células, sintetizan y secretan la hormona estimulante de la tiroides (TSH) y son positivamente reguladas por la hormona liberadora de TSH (TRH) del hipotálamo. La TSH se une a su receptor específico en la glándula tiroides, regula el metabolismo del yodo en la tiroides, la síntesis de hormonas tiroideas y el crecimiento de esta glándula.

Se han reportado diferencias en atributos anatómicos y fisiológicos en algunas poblaciones de tipos celulares endocrinos con respecto a su distribución en la glándula hipófisis. Sin embargo, la información concerniente a los tirotropos no es tan basta en comparación con otros tipos celulares adenohipofisarios. Más aún, muchos de estos estudios se han conducido bajo condiciones que comprometen la relación anatómica-funcional del tejido.

En este trabajo se identificó si la población de tirotropos en las regiones central (RC) y lateral (RL) de la glándula, al ser estimulados con TRH, exhiben respuestas diferentes de $[Ca^{2+}]_i$ y la caracterización de las mismas. Para ello, se empleó el registro de la actividad espontánea y regulada de $[Ca^{2+}]_i$ de tirotropos en rebanadas de hipófisis de ratones macho adulto. Se adquirieron secuencias de imágenes de registros de fluctuaciones de $[Ca^{2+}]_i$ mediante espectrometría e imagenología del indicador sensible a Ca^{2+} Fluo-4 AM, en un microscopio estereoscópico de fluorescencia. El TRH se aplicó en el baño a concentraciones de 0.1, 1, 10 y 100 nM, con un periodo de 15 min entre cada dosis; con el fin de discriminar entre tirotropos y lactotropos, posterior a las dosis de TRH se administró una dosis compuesta de TRH 100 nM -DA 2 μ M – TRH 100 nM con el fin de discriminar entre lactotropos y tirotropos; para comprobar la viabilidad de las células. al final se administró una solución de alto potasio. Las células responsivas a TRH y cuya actividad no fue inhibida por DA fueron considerados como tirotropos. Así mismo, se graficó y analizó la respuesta de $[Ca^{2+}]_i$ de forma individual.

El porcentaje de tirotropos identificados en la adenohipófisis fue de 6%. En comparación con la RL, un mayor número de tirotropos de la RC exhiben una respuesta de $[Ca^{2+}]_i$ ante el estímulo con TRH, pese a que el número de células positivas a TSH en esta región sea menor; al igual que

responden en mayor proporción a una, dos y tres exposiciones de TRH. En comparación con la RC, un mayor número de tirotropos de la RL presentan actividad espontánea, respuesta a baja concentración de TRH (0.1 nM) y a las cuatro dosis de TRH a las que fueron expuestas. Además, en esta misma región la intensidad máxima promedio de la respuesta de $[Ca^{2+}]_i$ producida a baja concentración de TRH y en condición basal, y el área bajo la curva en todas las dosis, fueron significativamente mayor.

Los resultados sugieren que existe una diferencia fisiológica de la respuesta de $[Ca^{2+}]_i$ de los tirotropos a las distintas concentraciones de su agonista, en relación a su distribución espacial en la adenohipófisis.

Palabras clave

Regionalización, plasticidad secretora, calcio intracelular, adenohipófisis, células productoras de TSH.

Prefacio

Una de las opciones de titulación que ofrece el Departamento de Biología, de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM; es la tesis. La tesis es un reporte de resultados originales de investigación.^{1, 2} Weissberg y Buker² señalan que este tipo de documentos tienen el propósito de explicar a otros en el campo los objetivos, métodos y hallazgos del estudio realizado. Estos reportes pueden presentarse en diversos formatos, como artículos de investigación, monografías, o como tesis o disertaciones. En estos últimos casos, cumpliendo un requisito para la obtención de un título o grado académico, como es el caso que me ocupa.

La tesis incluye en su descripción el propósito, el método y los resultados del estudio. Además, se complementa con cuadros y figuras, así como con un listado de referencias sobre otros trabajos publicados en la misma área de estudio; asimismo presenta un resumen que abarca la información más importante en el reporte. El formato de organización para todos los reportes de investigación experimental es básicamente el mismo. El formato más utilizado en la ciencia, en los últimos 100 años, es el denominado IMRYD: Introducción, Material y métodos, Resultados y Discusión.¹

El formato IMRYD se generalizó casi universalmente en las revistas de investigación. La lógica del IMRYD puede definirse mediante una serie de preguntas: ¿Qué cuestión (problema) se estudió? La respuesta es la Introducción. ¿Cómo se estudió el problema? La respuesta son los Métodos. ¿Cuáles fueron los resultados o hallazgos? La respuesta son los Resultados. ¿Qué significan esos resultados? La respuesta es la Discusión.¹

El conocimiento de la estructura de la tesis en cuanto a sus apartados y la función y organización de la información dentro de cada uno de ellos es fundamental, ya que el reporte debe tener un hilo conductor, así como una coherencia lógica de manera que el lector pueda pasar de lo general a lo particular y de lo simple a lo complejo del problema que se aborda. Es por ello que como parte de mi formación me aboqué a seguir la norma internacional más importante para estructurar un trabajo de tesis, la ISO7144-86,³ y algunas obras relevantes sobre el tema en la literatura disponible.^{1, 2, 4, 5}

Ya que la tesis es un documento que da fe de que el estudiante ha desarrollado los atributos que lo hacen merecedor de ser aceptado en la comunidad de su profesión, la información que contiene debe ser cuidadosamente estructurada para que se cumpla el atributo de comunicar con claridad, rigor y precisión las ideas de su investigación⁵. Robert Day señala:

Si el estudiante graduado o el científico en ciernes pueden comprender plenamente el sentido de la estructura IMRyD, la tarea de escribir debe resultarles mucho más fácil. La confusión es consecuencia de una tarea amorfa. La tarea fácil es aquella en que se sabe exactamente qué hay que hacer y en qué orden se ha de proceder.¹

Dentro del plan de estudios de la licenciatura en Biología, los alumnos tenemos la obligación de cursar un taller, para lo cual tenemos la oportunidad de elegir uno en particular entre múltiples opciones. Dado mi interés en la fisiología celular, y particularmente en la endocrinología, me inscribí en el taller “Endocrinología molecular y señalización intercelular” impartido en laboratorio BL-305 del departamento de Biofísica en el Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. Ahí conocí a la Dra. Tatiana Fiordeliso Coll, quien me dio la oportunidad de incorporarme a su equipo de trabajo, que se enfoca en el estudio de la glándula hipofisaria.

A lo largo de los dos años del taller, tuve la fortuna de convivir y trabajar con estudiantes de posgrado de nivel doctorado y otros compañeros de licenciatura, así como investigadores asociados y personal de apoyo técnico, que me permitieron desarrollar habilidades propias del laboratorio. Uno de mis compañeros, el hoy Biólogo Luis Miguel Rendón Pérez, realizó su trabajo de tesis sobre la distribución de la respuesta de calcio intracelular de lactotopos a TRH en rebanadas de hipófisis de ratón macho.

Conversando con él y con la Dra. Fiordeliso, vimos que era factible obtener un provecho adicional del material utilizado para la tesis de Luis Miguel para estudiar un tipo celular que ha sido muy desatendido por la comunidad científica, los tirotropos. En la literatura científica existen escasas publicaciones concernientes a tirotropos en comparación con los demás tipos celulares, esto los volvía atractivos desde el punto de vista de novedad y posible impacto de una investigación que se realizara sobre ellos; por lo que se decidió hacer una revisión de literatura para determinar las posibles vetas de investigación.

Por tanto, se vio la conveniencia de aprovechar al máximo dicho material y generar una segunda tesis, que es la que estoy presentando. Esto, aparte de implicar un gran ahorro de recursos para el laboratorio, ofrece trabajar un nuevo objeto de estudio con un enfoque original, ya que no está reportado en la literatura consultada, y por lo tanto con altas posibilidades de llegar a generar eventualmente una publicación.

Agradecimientos

Durante el tiempo transcurrido en esta licenciatura hubo muchas personas e instituciones que me brindaron su ayuda moral, material, económica e intelectual, por lo que deseo expresarles mi más profundo agradecimiento.

A la Dra. Tatiana Fiordeliso Coll, asesora, profesora, amiga y consejera, quien ha dado todo en su lucha incansable en pro de la educación científica en esta universidad; por sus consejos, comentarios, observaciones, enseñanzas, confianza y cariño.

A la Dra. Hortensia Gertrudis González Gómez, a la Dra. Arantza Leticia Lassala Irueste, al Dr. José Gerardo Perera Marín, y al Biol. Pedro David Segura Chama, por dedicar su valioso tiempo al análisis y la discusión del documento, por sus sabias observaciones y críticas constructivas.

Un reconocimiento especial al Biol. Luis Miguel Rendón Pérez, por su amistad y constante apoyo en la elaboración de este proyecto.

Al Dr. Arturo Hernández, jefe del laboratorio BL-305 del IFC, por las facilidades que me brindó en su laboratorio para la realización de esta tesis.

A mis compañeros y amigos del Taller de Biofísica (Cubil) y el laboratorio BL-305 del IFC: Nicolás, Adán, Alejandra, Omar, Luisa, Tzitzitlini, Vladimir, Avelino, José Alfredo, Carlos, Alicia, Araceli, Jaime, Laura, Arturo, Jorge.

A mis compañeros y amigos quienes contribuyeron en mi formación académica y personal: Marcela, Ana Paulina, Cristina, Ivone, Paola, Rodrigo V., Diego, Sonia, Chelito, Priscila, Christian, Iván, Miguel, Coquis, Lupe, Claudia, Bernardo, Felipe, Samantha, Maira, Nihuib, Erick, Mónica, Sandra, Briseida, Alejandra, Jesús, Jhonatan, Rodrigo, Rafael, Montserrat, Pablo, Oscar, Alejandro M., Alejandro J., Dr. Galina, Martha T., Maricarmen V., Adrián, Alejandra F., Lorena, Gaby, Jaime, Federico, Carolina, Silvia, Yolani, Anna, Adriana, Armando, Luis O. y a quien mi ingrata memoria haya omitido.

Este proyecto fue apoyado por CONACYT 81760-Q y parcialmente por PAPIIT IN223310.

Tabla de contenido

Dedicatoria	2
Resumen	3
Palabras clave	4
Prefacio.....	5
Agradecimientos	6
Índice de ilustraciones.....	10
Índice de Figuras	10
Índice de cuadros	11
Lista de abreviaturas y símbolos.....	12
Introducción.....	15
Hipófisis	16
Localización y estructura	16
Sistema vascular	17
Tipos celulares.....	19
Regulación de la secreción hormonal.....	20
Tirotropos	22
TSH.....	24
THs	25
TRH	28
Calcio intracelular.....	29
Canales de calcio	30
Actividad eléctrica espontánea y regulada	30

Receptores acoplados a proteínas G	31
Dinámica de la actividad de calcio intracelular	32
Desensibilización del receptor a TRH	35
Regionalización	36
Hipótesis	39
Objetivos.....	39
Material y métodos	40
Obtención de rebanadas	40
Obtención de los registros de calcio intracelular.....	40
Análisis de resultados.....	41
Resultados	43
Identificación de tirotropos	43
Proporción de tirotropos en la adenohipófisis y en las regiones central y lateral.....	46
Respuesta de $[Ca^{2+}]_i$ a TRH de tirotropos de la región central y lateral	48
Discusión.....	55
Conclusión.....	57
Referencias	59

Índice de ilustraciones

Índice de Figuras

Figura 1 <i>Glándula hipófisis.</i> ¹⁶	16
Figura 2 <i>Mecanismos de comunicación entre el hipotálamo y la hipófisis.</i> ²⁰	18
Figura 3 <i>Anatomía vascular de la glándula hipófisis.</i> ¹²	19
Figura 4 <i>Modelo de regulación de la secreción hormonal hipofisaria.</i> ²⁸	21
Figura 5 <i>Eje Hipotálamo-Hipófisis-Tiroides.</i> ²⁸	23
Figura 6 <i>Tirotropos.</i> ²⁸	24
Figura 7 <i>Hormonas Tiroideas.</i> ⁴⁹	27
Figura 8 <i>Activación e inactivación de las THs en una célula que expresa D2 y D3.</i> ⁵⁰	27
Figura 9 <i>TRH.</i> ²⁰	29
Figura 10 <i>Principales cambios del flujo de Ca^{2+} ante el estímulo de TRH.</i> ⁷¹	34
Figura 11 <i>Tránsito del TRHR.</i> ⁷⁴	36
Figura 12 <i>Regionalización de la hipófisis.</i> ⁷⁸	38
Figura 13 <i>Gráficos de superficie de intensidad de fluorescencia de rebanadas de hipófisis de ratón macho adulto.</i> ¹⁶	44
Figura 14 <i>Identificación de células que responden positivamente a TRH.</i> ¹⁶	45
Figura 15 <i>Discriminación entre tirotropos y lactotropos.</i>	46
Figura 16 <i>Porcentaje de tirotropos en la adenohipófisis.</i>	47
Figura 17 <i>Inmuntinción de TSH en adenohipófisis de ratón, se muestran las regiones central y lateral.</i>	47
Figura 18 <i>Efecto de diferentes dosis de TRH en la respuesta de $[Ca^{2+}]_i$ a TRH.</i>	49
Figura 19 <i>Actividad espontánea.</i>	50

Figura 20 <i>Respuesta a diversas concentraciones de TRH</i>	50
Figura 21 <i>Respuesta a distinto número de exposiciones a TRH</i>	51
Figura 22 <i>Seguimiento temporal de la intensidad de fluorescencia (FI) de los tirotrapos en cada región a diferentes concentraciones de TRH</i>	52
Figura 23 <i>Intensidad máxima promedio de la respuesta de $[Ca^{2+}]_i$ a TRH</i>	53
Figura 24 <i>Área bajo la curva de la respuesta de $[Ca^{2+}]_i$ a TRH</i>	54

Índice de cuadros

Cuadro 1 <i>Síntesis de resultados</i>	58
--	----

Lista de abreviaturas y símbolos.

Abreviatura símbolo	Significado
$[Ca^{2+}]_i$	Concentración de calcio intracelular
μM	Micromolar
AC	Adenilato ciclasa
ACTH	Hormona adrenocorticotrópica, corticotropina
APs	Potenciales de acción
Ca^{2+}	Ion calcio
cAMP	Monofosfato cíclico de adenosina
D_2	Receptor de dopamina tipo 2
DA	Dopamina
DAG	Diacilglicerol
DIO_2 , D2	Desyodasa tipo 2
DIO_3 , D3	Desyodasa tipo 3
DNA	Ácido desoxirribonucleico
<i>e.g.</i>	Por ejemplo
EM	Eminencia media
ER	Retículo endoplásmico
Ets	Endotelinas
F	Fluorescencia
F_0	Fluorescencia inicial
FS	Célula folículo estrellada
FSH	Hormona folículo estimulante
GH	Hormona de crecimiento
GPCR	Receptor acoplado a proteínas G
GRKs	Cinasas de receptores acoplados a proteínas G
h	Horas
HHT	Eje hipotálamo-hipófisis-tiroides
HVA	Canal de alto voltaje de activación
ICA	Arteria carótida interna
IF	Intensidad de fluorescencia
IHA	Arteria inferior hipofisaria
IP_3	1,4,5-trifosfato de inositol
IP_3R	Receptor de IP_3

Abreviatura símbolo	Significado
IRD	Desyodación en el anillo interno
KCl	Cloruro de potasio
Kg	Kilogramo
LA	Lóbulo anterior
LAT	Transportador de aminoácidos de tipo L
LH	Hormona luteinizante
LP	Lóbulo posterior
LVA	Canal de bajo voltaje de activación
MCT	Transportador monocarboxilado
MgCl ₂	Cloruro de magnesio
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MP	Membrana plasmática
mRNA	RNA mensajero
ms	Milisegundos
mV	Milivolt
NaCl	Cloruro de sodio
NaH ₂ PO ₄	Fosfato monobásico de sodio
NaHCO ₃	Bicarbonato de sodio
NH	Neurohipófisis
nM	Nanomolar
OATP	Transportador de aniones orgánicos
ORD	Desyodación en el anillo externo
PIP ₂	4,5-bifosfato de fosfatidilinositol
PKA	Proteína cinasa A
PKC	Proteína cinasa C
PLC	Fosfolipasa C β
PRL	Prolactina
PVN	Núcleo paraventricular hipotalámico
RC	Región central
RL	Región lateral
rT ₃	Triyodotironina reversa
RXR	Receptor de retinoide X
s	Segundos
SHA	Arteria superior hipofisaria
SNC	Sistema nervioso central
t _{1/2}	Tiempo medio
T ₂	3,3'-diyodotironina

Abreviatura símbolo	Significado
T ₃	3,5,3'-L-triyodotironina
T ₄	3,5,3',5'-L-tetrayodotironina, tiroxina
TBG	Globulina de unión a tiroxina
THs	Hormonas tiroideas
TR	Receptor nuclear a la hormona tiroidea
TRES	Elementos de respuesta a la hormona tiroidea
TRH	Hormona liberadora de tirotropina
TSH	Hormona estimulante de tiroides, tirotropina
TSHR	Receptor de TSH
V _m	Potencial de membrana
VGCC	Canal de calcio activado por voltaje
α	Alfa
α-GSU	Subunidad alfa de la hormona glucoproteica
β	Beta
β-TSH	Subunidad beta de TSH

Introducción

La tiroides es una glándula relativamente pequeña situada en la parte media e inferior del cuello. Produce las hormonas tiroideas, las cuales influyen prácticamente en cada célula del organismo. El funcionamiento de esta glándula es regulado por la hipófisis a través de la hormona estimulante de la tiroides, la cual es secretada por las células hipofisarias llamadas tirotrópos. A su vez, estas células son reguladas por factores provenientes del hipotálamo, entre otros, constituyéndose así lo que se conoce como el eje hipotálamo-hipófisis-tiroides (HHT) ⁶. Existen desórdenes en este eje, referidos como enfermedades tiroideas o problemas de tiroides, que tienen una alta prevalencia en la población general. ⁷

Uno de los países en donde se le ha dado mayor seguimiento a estos problemas es Estados Unidos de América. Se estima que en este país un 12% de la población desarrollará algún problema de tiroides durante su vida, lo que implica que 20 millones de norteamericanos padecen desórdenes tiroideos, sin embargo, aproximadamente el 60% de ellos no lo saben. Lo anterior es muy grave, porque las enfermedades tiroideas no diagnosticadas los ponen en riesgo, ya que dan pie a condiciones severas como las enfermedades cardiovasculares, la osteoporosis y problemas de infertilidad. ^{6,8}

El panorama es más gris para las mujeres, se estima que una de cada ocho mujeres desarrollará un problema de tiroides a lo largo de su vida, considerándose que son de cinco a ocho veces más propensas que los hombres. En el caso del hipotiroidismo, condición de producción insuficiente de hormona tiroidea, si este no es diagnosticado o tratado de forma adecuada durante el embarazo se incrementará el riesgo de aborto, un parto prematuro o severos problemas en el desarrollo del crío. ⁶

No obstante la gravedad de estos problemas, y de que son condiciones que duran toda la vida, pueden sobrellevarse con atención médica adecuada. Actualmente 13 millones de norteamericanos consumen diariamente medicamentos para tratar enfermedades tiroideas, lo que implica un reto para la Administración Federal de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos para garantizar el abasto ininterrumpido de medicamentos. ⁹

Las causas que generan los desórdenes tiroideos no han sido establecidas. Lo cual ofrece un campo fértil para la investigación científica. Por consiguiente, todas las aportaciones que se hagan para dilucidar los aspectos fisiológicos o fisiopatológicos del eje HHT, o alguno de sus componentes, tienen un valor potencial muy grande para ayudar a mitigar estas condiciones que han sido catalogadas como un problema de salud pública a nivel mundial.

Hipófisis

La hipófisis, o pituitaria, es una pequeña pero compleja glándula que interpreta un papel protagonista en el sistema endocrino de los vertebrados. Incluso, es considerada una glándula “maestra”, pues está constituida por diversos tipos celulares que sintetizan y secretan una o más hormonas tróficas que, en respuesta a diversas señales, regulan una miríada de procesos biológicos importantes tales como: el crecimiento, la reproducción, la lactancia, la respuesta al estrés y la homeostasis metabólica.^{10, 11}

Localización y estructura

En los mamíferos, la hipófisis se localiza en la parte ventral del cerebro por debajo del hipotálamo, en la fosa hipofisaria. Dicha fosa está limitada anterior, posterior e inferiormente por constituyentes óseos de la silla turca, una depresión en el cuerpo del hueso esfenoides. La glándula está unida al hipotálamo por medio del tallo infundibular, esta ubicación le confiere a la hipófisis proximidad con muchos nervios craneales y estructuras vasculares importantes en la base del cráneo.^{12, 13}

La hipófisis está estructurada por dos entidades anatómica, embriológica y funcionalmente distintas, la neurohipófisis y la adenohipófisis. La neurohipófisis incluye el lóbulo posterior, mientras la adenohipófisis está constituida por los lóbulos intermedio y anterior (Figura 1). El lóbulo anterior comprende aproximadamente el 80% de la glándula.^{14, 15}

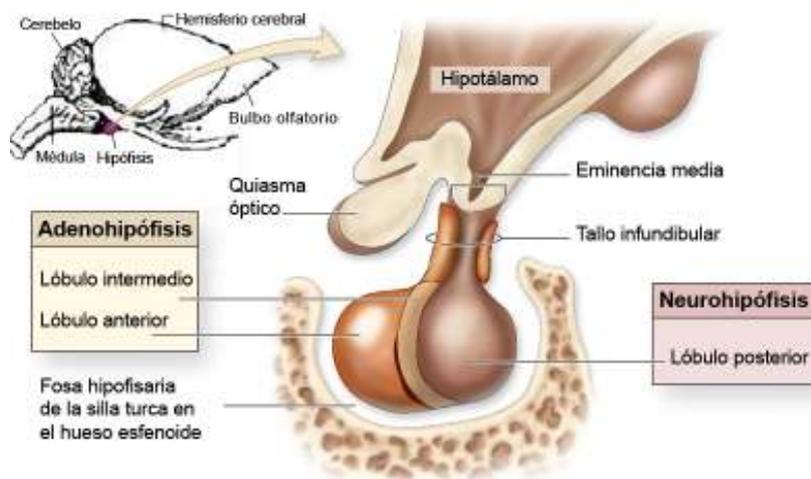


Figura 1 Glándula hipofisaria. Localización anatómica y estructura de la glándula hipofisaria de ratón. Adaptado de Rendón, 2010.¹⁶

Sistema vascular

En un enfoque clásico, la hipófisis ha sido considerada como un oscilador secundario que obedece principalmente a factores hipotalámicos que modulan la secreción de las hormonas hipofisarias. La comunicación inter-orgánica entre el hipotálamo y la hipófisis ocurre por medio de dos mecanismos generales, donde cada cual ocupa una red vascular distinta. Un mecanismo estriba en la proyección directa de terminales axónicas desde el hipotálamo hasta el lóbulo posterior, donde liberan sus productos neurosecretorios directamente en el torrente sanguíneo. El otro mecanismo implica la conducción de factores liberadores producidos en el hipotálamo hasta el lóbulo anterior a través de un sistema de vasos sanguíneos portales muy complejo, y con sentido de flujo descendente, llamado sistema porta hipofisario (Figura 2).^{12,17}

El aporte sanguíneo se recibe de dos grupos de arterias: la arteria inferior hipofisaria (IHA), y la arteria superior hipofisaria (SHA). La IHA surge desde el tronco meningohipofisario, una rama del segmento cavernoso de la arteria carótida interna (ICA), y abastece al lóbulo posterior. En este lóbulo la IHA forma un anillo capilar en donde recibe los productos neurosecretorios provenientes de terminales axónicas hipotalámicas, y se reestructura en una vena eferente hipofisaria que drena al seno cavernoso.¹²

Por su parte la SHA, consiste de una serie de pequeños vasos que surgen de la porción medial inferior de la ICA por debajo del nervio óptico o de la arteria comunicante posterior, suministra a la cara inferior del nervio y quiasma óptico, al tallo hipofisario y al lóbulo anterior. De hecho, de todos los tejidos de los mamíferos el lóbulo anterior de la adenohipófisis es el más vascularizado.¹²

Los vasos de la SHA se anastomosan para formar un plexo de capilares fenestrados, denominado plexo primario, que rodea a la eminencia media y a la porción superior del tallo hipofisario. Es en este plexo capilar primario donde se colectan los estímulos hipotalámicos. Enseguida, los capilares convergen en vénulas para después formar venas portales que descienden por el tallo hipofisario hacia el lóbulo anterior y forman otra red capilar denominada plexo secundario. Ahí se distribuyen los estímulos y se colectan los productos hormonales, los capilares se reorganizan formando venas eferentes que drenan hacia el seno cavernoso (Figura 3).^{12, 17-19}

El lóbulo intermedio es relativamente avascular, aunque puede abastecerse de manera colateral a partir de conexiones anastómicas entre los capilares de los lóbulos anterior y posterior.¹²

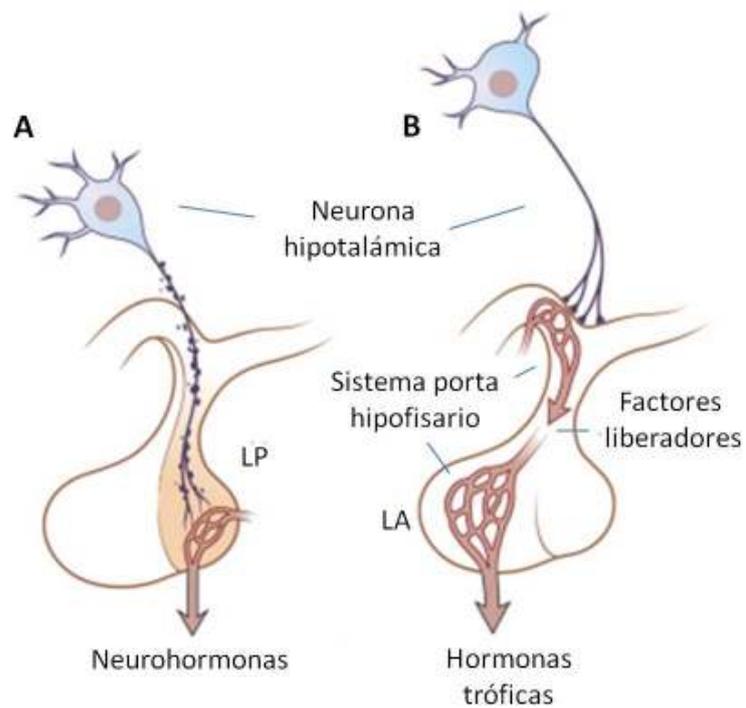


Figura 2 Mecanismos de comunicación entre el hipotálamo y la hipófisis. A Proyección directa de terminales axónicas de una neurona hipotalámica al lóbulo posterior, con la liberación de neurohormonas. **B** Conducción de factores liberadores hipotalámicos hasta el lóbulo anterior a través del sistema porta hipofisario, con la consecuente secreción de hormonas tróficas hipofisarias. LP, lóbulo posterior; LA, lóbulo anterior. Adaptado de Low, 2011.²⁰

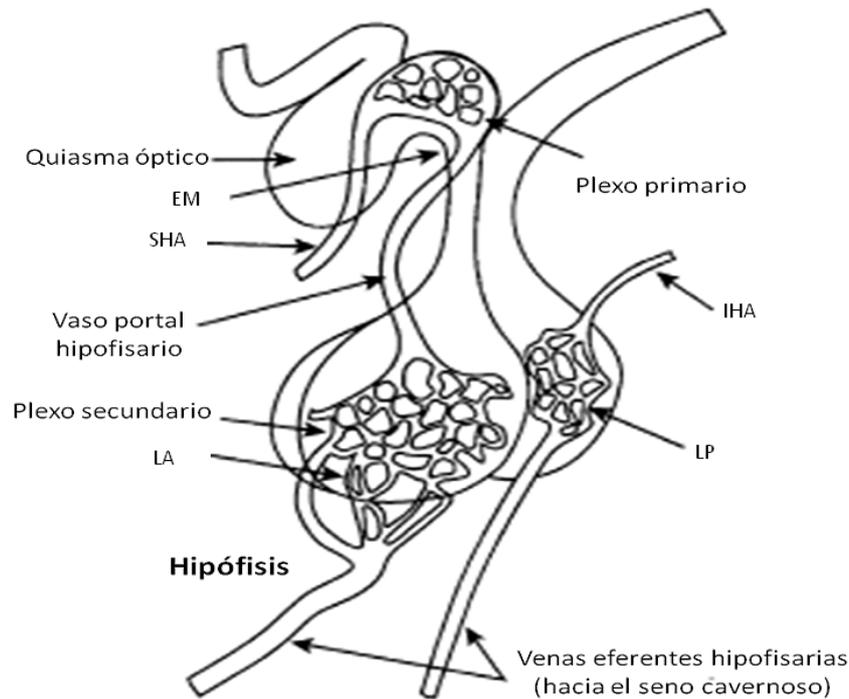


Figura 3 Anatomía vascular de la glándula hipófisis. Esquematación de los elementos vasculares que constituyen el sistema porta hipofisario. EM, eminencia media; SHA, arteria superior hipofisaria; IHA, arteria inferior hipofisaria; LA, lóbulo anterior; LP, lóbulo posterior. Adaptado de Amar y Weiss, 2003.¹²

Tipos celulares

La adenohipófisis es una de las glándulas más complejas del organismo, está compuesta tanto por células secretoras como no secretoras de hormonas. Estructuralmente, asemeja a un laberinto tridimensional donde el tejido conectivo y las células no secretoras forman las “paredes” y las células secretoras de hormonas constituyen los “corredores”. Las células no están distribuidas al azar, se encuentran formando redes homo y heterotípicas geoméricamente conectadas, cuya morfología local y conectividad pueden coordinar la propagación de señales entre las células, lo que les permite modificar el tiempo de la respuesta celular y así optimizar la coordinación de la secreción hormonal pulsátil.^{10, 17, 21, 22}

La población de células no secretoras está formada principalmente por las células foliculo estrelladas (FS) que están ampliamente distribuidas formando redes tridimensionales a lo largo de

la hipófisis anterior; y células endoteliales que recubren los vasos capilares. Ha sido sugerido que las células FS desempeñan un papel importante en la comunicación intercelular.¹⁴

La población de células secretoras de hormonas está formada por al menos cinco tipos celulares principales que son caracterizados fenotípicamente por la hormona trófica que sintetizan y secretan. Así pues, los gonadotropos producen la hormona folículo estimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH), los lactotropos prolactina (PRL), los somatotropos la hormona de crecimiento (GH), los corticotropos la hormona adrenocorticotrópica (ACTH) y los tirotropos la hormona estimulante de tiroides, también denominada tirotropina (TSH). A su vez, estas hormonas regulan selectivamente la síntesis y secreción de órganos blanco para provocar efectos en tejidos periféricos.^{13, 14, 23, 24}

Regulación de la secreción hormonal

La unidad hipotálamo-hipófisis anterior integra señales hipotalámicas, hipofisarias y periféricas, estimuladoras e inhibitorias; para orquestar la síntesis, secreción hormonal y la proliferación celular diferenciada, de los ya mencionados tipos celulares. Estos procesos se deben realizar de forma coordinada, adecuada y oportuna en respuesta a una circunstancia determinada, por lo que se requiere de un sistema de control sumamente preciso (Figura 4).^{13, 24, 25}

A nivel celular, cuando el factor hipotalámico llega a la hipófisis anterior y se une a su receptor específico, provoca la activación de vías de señalización molecular limitadas temporal y espacialmente, resultando así en la activación del tipo celular particular a dicho factor. Miles de células se activan y responden individualmente y secretan la hormona en cuestión de manera pulsátil. Además, las células endocrinas pueden comunicarse con las células vecinas por medio de uniones comunicantes, y son capaces de difundir factores paracrinos. De esta forma, se ha propuesto que las células actúan como una red –semejante a las redes neuronales- para integrar y propagar la información de manera precisa. La información codificada en la amplitud y frecuencia de los pulsos hormonales es decodificada por los tejidos periféricos para preparar una respuesta fisiológica apropiada. Así pues, se establecen ejes de regulación endocrina Hipotálamo-hipófisis-órgano blanco.^{10, 22}

Como la activación celular depende del aporte de nutrientes, oxígeno y factores hipotalámicos, a nivel tisular la regulación se remite a la disposición del sistema vascular, así como a la convección dirigida que actúa para impulsar la hormona secretada a través del espacio extracelular en los vasos sanguíneos aferentes. Los mecanismos que permiten a las células endócrinas actuar como una población a nivel tejido no son del todo claros, aunque se les adjudica la responsabilidad, en ciernes, a unas células llamadas pericitos.¹⁰

Al presentarse anomalías en la regulación de los ejes endocrinos, ocurren desajustes de los mismos que suelen tener repercusiones en la salud del organismo. Como ya se ha expuesto, cabe

destacar que en particular los problemas producto de las perturbaciones en el eje hipotálamo-hipófisis-tiroides (HHT) son graves, alarmantemente frecuentes y son considerados un problema de salud pública a nivel mundial.^{8, 26} Lo anterior no es causal de sorpresa, pues el eje HHT juega un papel esencial en el mantenimiento de la homeostasis del organismo en respuesta a alteraciones en el metabolismo y al ambiente externo.²⁷ Por lo anterior, y dado que existe poca literatura concerniente a los tirotrópos, en comparación con los otros tipos celulares adenohipofisarios; resulta pertinente abordar el estudio de los tirotrópos.

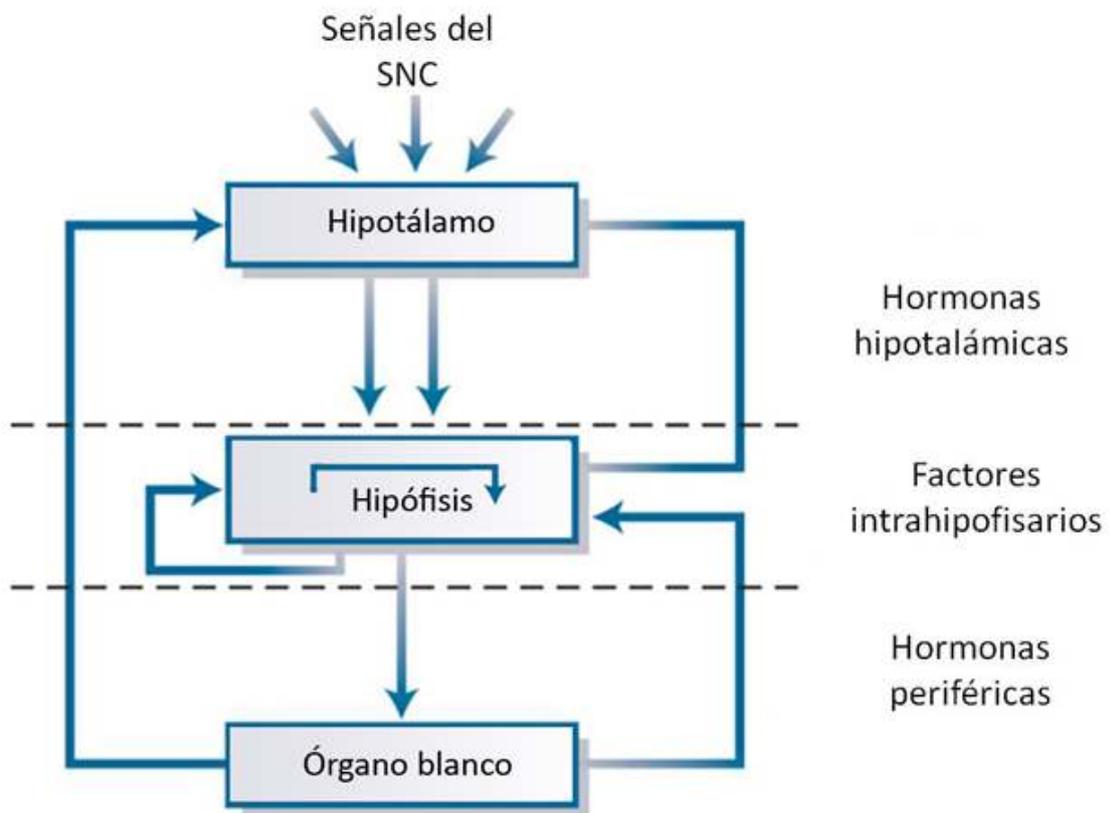


Figura 4 Modelo de regulación de la secreción hormonal hipofisaria. Las hormonas hipotalámicas estimulan a las células adenohipofisarias y éstas secretan hormonas tróficas que actúan en sus órganos blanco. Factores intrahipofisarios controlan la secreción hormonal de forma paracrina y autocrina. Las hormonas periféricas modulan mediante asas de retroalimentación en el hipotálamo y/o hipófisis. SNC, sistema nervioso central. Adaptado de Melmed, et al., 2011.²⁸

Tirotropos

Los tirotropos son células endocrinas del lóbulo anterior de la adenohipófisis que, en respuesta al estímulo de la hormona liberadora de tirotropina (TRH) proveniente del hipotálamo, sintetizan y secretan la hormona estimulante de la tiroides- o tirotropina- (TSH). Esta hormona a su vez, como su nombre lo indica, estimula la síntesis y secreción de las hormonas tiroideas al unirse a su receptor específico (TSHR) en las células foliculares de la glándula tiroides (Figura 5).^{11, 29}

Los tirotropos tienen forma irregular de tipo angular, con núcleos planos y gránulos secretorios relativamente pequeños (50 a 100 nm de diámetro), representan la menor población de las células endocrinas adenohipofisarias, pues constituyen solamente del 5-10% de la población celular, y están localizados regionalmente dentro de las porciones anteromedial y lateral de la glándula.^{14, 28} Se ha reportado que en algunos desórdenes endocrinos del eje HHT, como el hipotiroidismo, este porcentaje incrementa hasta el 34%.³⁰ Esto se debe, al parecer, a que esta afectación promueve el reclutamiento de células precursoras de tirotropos y la diferenciación de otros tipos celulares, como los somatotropos a tirotropos (Figura 6).³¹

Al igual que los gonadotropos, los tirotropos expresan la subunidad α de la hormona glucoproteica (α -GSU). Esta subunidad es necesaria para la formación de heterodímeros de FSH, LH y TSH junto con subunidades β específicas de cada hormona. Es decir, los tirotropos son el único tipo celular que expresa la subunidad β -TSH.¹⁴

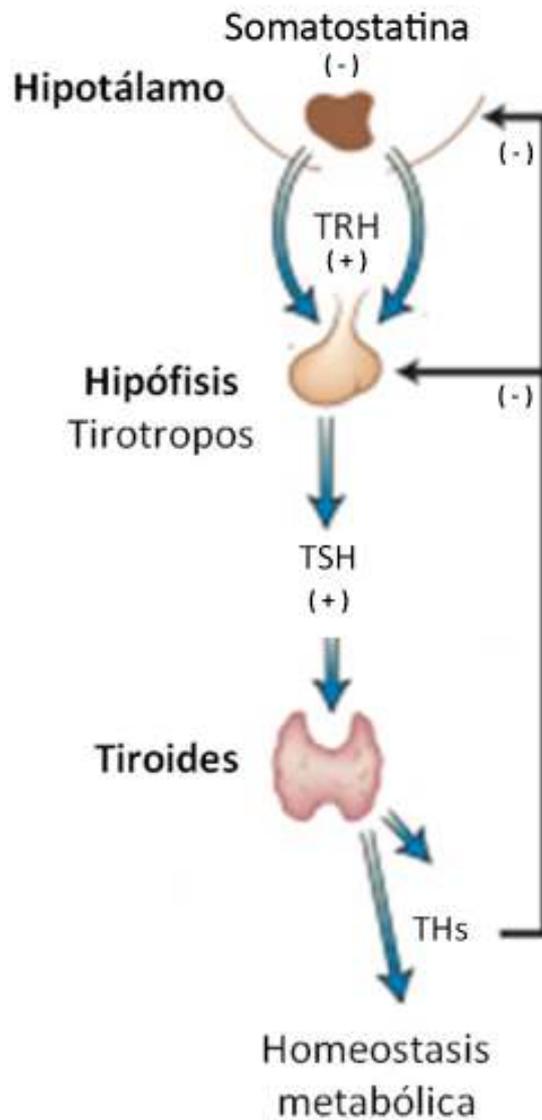


Figura 5 Eje Hipotálamo-Hipófisis-Tiroides. El TRH hipotalámico estimula a los tirotropos, estos sintetizan TSH que actúa en la tiroides produciendo las hormonas tiroideas (THs) que ayudarán al mantenimiento de la homeostasis metabólica. Las hormonas tiroideas ejercen asas de retroalimentación negativa en la hipófisis y en el hipotálamo. La somatostatina inhibe la síntesis de TRH. TRH, hormona liberadora de tirotropina. TSH, hormona estimulante de tiroides. THs, hormonas tiroideas. Adaptado de Melmed, et al., 2011 .²⁸

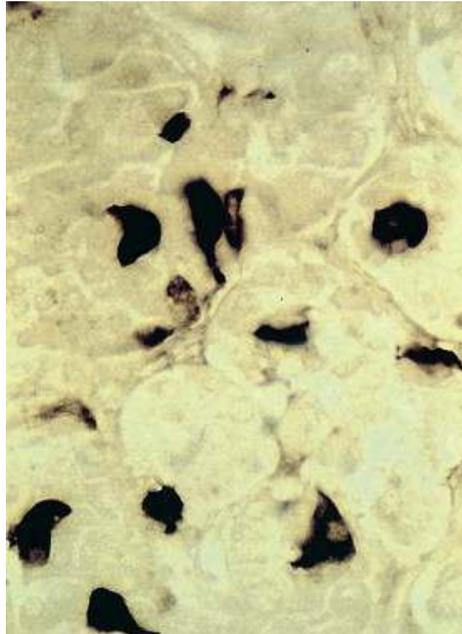


Figura 6 *Tirotropos*. Microfotografía que muestra una porción de la adenohipófisis y los tirotropos (en negro), donde se puede observar la forma angular con procesos elongados. Tomado de Melmed, et al. 2011.²⁸

TSH

La tirotropina (TSH) es una hormona glucoproteica heterodimérica que está constituida por una subunidad β de 110 aminoácidos específica, y una subunidad α -GSU de 92 aminoácidos idéntica a las de LH y FSH.^{7, 32-34} La TSH es empaquetada en pequeñas vesículas secretoras en los tirotropos, al ser secretada se une a su receptor específico, TSHR expresado en las células blanco.^{14, 35}

El TSHR es un receptor acoplado a proteínas G (GPCR) que tiene un ectodominio con sitio de unión a TSH, y un dominio transmembranal de una serpiente de siete segmentos. Además de expresarse en las células foliculares de la tiroides, también se ha reportado la expresión del TSHR en cerebro, riñón, testículos, corazón, hueso, tejido adiposo, fibroblastos, células hematopoyéticas y del sistema inmune.^{36, 37}

Al unirse el TSH a su receptor en las células foliculares de la tiroides, se desencadena una vía de señalización por segundos mensajeros que involucra principalmente al cAMP, resultando en la modulación de la expresión génica. Dentro de los roles fisiológicos que se le atribuyen a la TSH se incluyen: regulación de la síntesis y secreción de las hormonas tiroideas (THs), la captación de yodo y el fomento del crecimiento de la tiroides.^{27, 35, 37}

Fisiológicamente, el punto de ajuste para la síntesis y secreción de TSH es determinado por un balance entre una señal positiva por parte del TRH hipotalámico, y señales negativas pequeñas por parte del neurotransmisor inhibitorio somatostatina, y de mayor intensidad por las THs en los tirocitos. Las THs inhiben la transcripción, la modificación post-traduccional y la liberación de TSH. Así pues, aunque el TRH estimula la síntesis y liberación de TSH, se cree que la retroalimentación negativa por parte de las THs en la hipófisis es el regulador fisiológico más importante de la secreción de TSH.^{14, 38} Sin embargo, nuevos estudios ponen en tela de juicio esta idea, sugiriendo que no son las THs sino el TRH el regulador fisiológico más importante.³⁹ Por otra parte, Janssen y colaboradores⁴⁰ demostraron recientemente que los rexinoides pueden suprimir la síntesis de TSH y, este efecto ocurre en los tirocitos; Kim y colaboradores³³ sugieren que el exceso de insulina disminuye la expresión de la β -TSH de manera dosis-dependiente.

La interacción entre estos reguladores dicta el patrón de secreción de TSH, el cual se caracteriza por una variación diurna de la concentración de la hormona en el suero. Esta concentración se eleva en respuesta a la disminución de las concentraciones de THs circulante, es decir, fisiológicamente su secreción es inversamente proporcional.^{31, 33, 38} La deficiencia de TSH resulta en la inactividad y atrofia de la glándula tiroides, mientras que el exceso de la hormona ocasiona hipertrofia e hiperplasia de la glándula.¹⁵

THs

En la tiroides, las células foliculares sintetizan las hormonas tiroideas (THs): 3,5,3',5'-L-tetrayodotironina (tiroxina, T_4) y la 3,5,3'-L-triyodotironina (T_3), ambas derivadas de aminoácidos (Figura 7). La T_4 es una molécula mínimamente activa y de vida larga (≈ 7 días), mientras que la T_3 tiene una vida corta (≈ 1 día) y alta actividad biológica. En todos los vertebrados, el principal producto de secreción tiroidea es T_4 , en tanto que T_3 es secretada en menores cantidades. Aproximadamente sólo el 20% de la concentración de T_3 en el suero proviene de su secreción directa en la tiroides, sintetizada a partir de la desyodación de la triglobulina, mientras que el porcentaje restante equivale a la derivada por un evento de desyodación de T_4 que tiene lugar en el interior de la célula blanco.^{29, 41}

Los autores de los eventos de desyodación son, valga la redundancia, las enzimas desyodasas; particularmente la tipo 2 (DIO_2 , D2) y la tipo 3 (DIO_3 , D3). La D2 remueve un residuo de yodo en el anillo externo (ORD) de la molécula de T_4 , derivándola a T_3 . Por su parte, D3 cataliza la desyodación de T_4 en el anillo interno (IRD) produciendo una molécula llamada triyodotironina reversa (rT_3), que es considerada inactiva; por la misma reacción T_3 es inactivada a 3,3'-diyodotironina (T_2), este último también es producido por ORD de rT_3 (Figura 8).^{29, 41-43} En el hipotiroidismo la expresión y actividad de D2 está aumentada, incrementando el abastecimiento de T_3 , mientras que en el hipertiroidismo ocurre lo opuesto.⁴⁴

Debido a su naturaleza hidrofóbica, cerca del 95% de las THs en el suero se encuentran unidas a proteínas para su transporte. Dentro de estas proteínas de transporte se encuentran: la globulina de unión a tiroxina (TBG), la transtirretina, la albúmina, y varias lipoproteínas.^{29, 41}

Las hormonas tiroideas son reguladores homeostáticos importantes durante la gestación y toda la vida post-natal, desempeñan un papel crítico en el desarrollo, crecimiento y metabolismo celular, en la regulación de la termogénesis, entre otros procesos. Cabe destacar que desempeñan un papel protagónico en el desarrollo del sistema nervioso central durante la gestación: la causa más común de retraso mental es la causada por el hipotiroidismo en la madre y en el feto, ocasionado por la deficiencia de yodo.^{42, 44, 45}

La actividad celular de las THs se clasifica como no genómica y genómica. Las acciones no genómicas se inician al unirse a sus receptores específicos en la membrana o en el citoplasma celular, activando vías intracelulares ubicuas comunes, por ejemplo, a los moduladores pro-angiogénicos clásicos. Pero la “especialidad” de las THs radica en su actividad genómica.⁴⁶ Sin embargo, las THs activan vías intracelulares específicas a través de su actividad genómica.

El mecanismo de acción genómica consiste en la modulación de la expresión génica celular, en virtualmente todos los tejidos, es protagonizada por T_3 y por diferentes isoformas de receptores nucleares a la hormona tiroidea (TR). Estos receptores, miembros de la superfamilia de receptores nucleares de factores transcripcionales modulados por ligando, se unen a motivos específicos de DNA en los promotores de genes blanco de T_3 interactuando con elementos de respuesta a la hormona tiroidea (TRES). La unión de T_3 con TR induce cambios en la interacción del receptor con proteínas correpressoras/coactivadoras, ocasionando entonces la represión/activación del gen en cuestión.^{42, 46, 47} La expresión y regulación de los TRs varía según la isoforma y el tejido.³⁹

El paso de las THs al interior de la célula se da a través de transportadores. Distintas familias de transportadores han sido identificadas: los transportadores de aniones orgánicos (OATP), los de aminoácidos de tipo L (LAT) y los monocarboxilados (MCT). El MCT8 es muy activo y específico de THs, está altamente expresado en hígado, riñón, corazón y cerebro.^{41, 44}

La disponibilidad de T_3 para su unión a TR, y la modulación del tiempo de respuesta celular a las THs están supeditadas a: la concentración THs en el suero, la saturación de las proteínas de transporte, la concentración y actividad catalítica de las D2 y D3, y a la actividad de los transportadores de THs en la membrana celular.^{29, 42}

Los niveles de las THs en el suero son regulados positivamente por la TSH y por asas de retroalimentación negativa por parte de las mismas THs tanto en las neuronas hipofisiotrópicas de TRH en el hipotálamo, como en los tirotrópos en la adenohipófisis. Esta retroalimentación depende de manera crítica de los niveles de las THs y de que los TRs se encuentren inalterados y disponibles, ya que estos receptores se unen a los promotores de los genes de TRH y de las subunidades de TSH regulando su expresión.^{38, 39, 48}

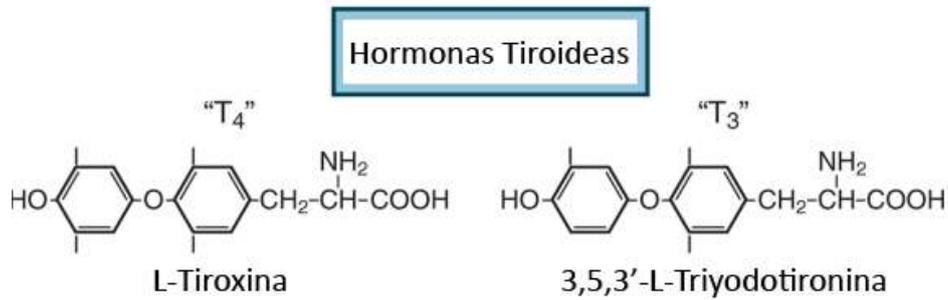


Figura 7 Hormonas Tiroideas. Estructura química de T₄ y T₃. Adaptado de Larsen, et al., 2008 .⁴⁹

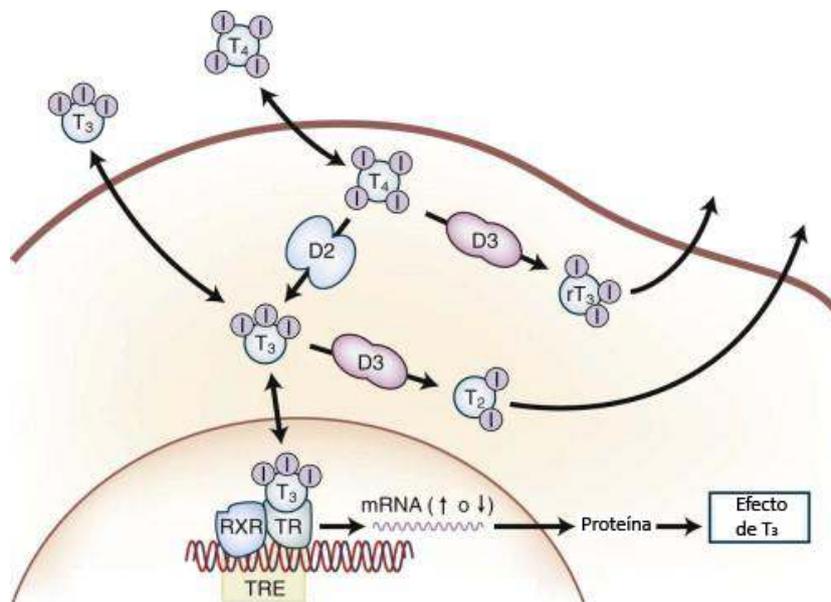


Figura 8 Activación e inactivación de las THs en una célula que expresa D2 y D3. La T₃ que ingresa a la célula puede ser inactivada en su forma T₂ por D3, o puede entrar al núcleo y unirse TR. Una fuente adicional de T₃, es la derivada de la actividad de D2 sobre T₄ dentro de la célula. La interacción de T₃ con TR se enlaza como un heterodímero con RXR al TRE, modificando la tasa de transcripción del gen responsivo a T₃. Esto conlleva cambios en paralelo de las concentraciones de proteínas críticas, lo que produce la respuesta característica a las hormonas tiroideas de dicha célula. D3 inactiva a T₄ produciendo rT₃. TRE, elementos de respuesta a la hormona tiroidea; RXR, receptor de retinoico X; mRNA, RNA mensajero; T₃, 3,5,3'-L-triyodotironina; T₄, tiroxina; T₂, 3,3'-diyodotironina; rT₃, triyodotironina reversa; I, yodo; D2, desyodasa tipo 2; D3, desyodasa tipo 3. Adaptada de Salvatore, et al., 2011.⁵⁰

TRH

La hormona liberadora de tirotropina (TRH) fue el primer factor hipotalámico en ser aislado y caracterizado estructuralmente.⁵¹ El TRH es un tripéptido (pGlu-His-Pro-NH₂) sintetizado a partir de un gran precursor inactivo, prepro-TRH (ppTRH), modificado por procesamientos post-traduccionales (Figura 9).^{27, 52} La secuencia de TRH está altamente conservada en los vertebrados.⁷

El receptor a TRH (TRHR) fue caracterizado mucho tiempo después que su ligando. El TRHR posee siete segmentos transmembranales, pertenece a la familia de los receptores a rodopsina/ β adrenérgicos de la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G (GPCR), y se expresa en diversos tejidos como: la eminencia media (EM), el núcleo paraventricular hipotalámico (PVN), en algunos tipos celulares adenohipofisarios, en la retina, en el tálamo y en el estómago, entre otros.^{53, 54}

El TRH puede ser sintetizado y secretado en muchas regiones del cerebro, pero el sintetizado en el hipotálamo por un subgrupo de neuronas originarias del PVN, es el único regulado por las THs.³⁹ Estas neuronas proyectan sus terminales axónicas hasta la EM y liberan la hormona al sistema porta hipofisario. Al llegar a la adenohipófisis el TRH se une a sus receptores en la membrana plasmática de los lactotrofos y tirotrofos estimulando la liberación de prolactina y TSH, respectivamente. También se ha sugerido que actúa como un neurotransmisor/neuromodulador en el sistema nervioso central.^{14, 27, 55}

Las neuronas de TRH localizadas en el área hipofisiotrópica reciben señales desde otras regiones del cerebro, así como también desde la circulación. Además de las THs, otros factores regulan la expresión del TRH, como por ejemplo el frío y la inanición. Como ya se ha mencionado, Las THs, en especial T₃, regulan la expresión del gen de TRH a través de un mecanismo de retroalimentación negativa, es decir, la expresión de TRH es alta cuando los niveles de las THs son bajos, y es suprimida al incrementarse los niveles de las THs. Bajos niveles de THs estimulan la expresión de la enzima que modifica la ppTRH para producir TRH.^{27, 39}

Ante la exposición al frío, señales adrenérgicas provenientes de la médula oblonga, principalmente catecolaminas, incrementan el umbral de inhibición de la expresión del gen de TRH por parte de la T₃; de esta manera se pueden alcanzar altos niveles circulantes de THs para contribuir al incremento de la termogénesis.^{27, 39}

La inanición reduce la secreción de leptina, incrementando entonces el apetito, disminuyendo el gasto energético y favoreciendo la conservación de energía. Para alcanzar este objetivo, es necesario atenuar la actividad del HHT disminuyendo los niveles de THs. Esto se logra gracias a que neuronas peptidérgicas en el núcleo arqueado median los cambios de leptina, reduciendo la síntesis de mRNA de ppTRH y como consecuencia menguando los niveles de TSH y THs en el suero.

Por el contrario, niveles elevados de leptina inhiben el consumo de alimentos y estimulan el gasto energético favoreciendo la expresión de TRH.^{56, 57}

El núcleo dorsomedial hipotalámico trabaja como un sensor metabólico para las neuronas hipofisiotrópicas de TRH. La integración de todas estas señales provee un punto de ajuste exacto del eje HHT cuando ocurren cambios en la temperatura o nutricionales.²⁷

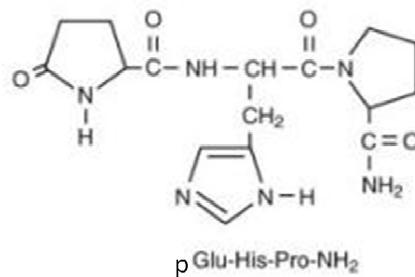


Figura 9 TRH. Estructura química de la TRH, hormona liberadora de tirotrópina. Adaptada de Low, 2011.²⁰

Calcio intracelular

El ion calcio (Ca^{2+}) es el elemento de transducción de señal más común en las células, desde bacterias hasta neuronas especializadas.⁵⁸ El Ca^{2+} que entra a la célula fluye a través de canales iónicos membranales selectivos para este ion, siendo entonces muy importante la participación de estos canales en transducción de señales de Ca^{2+} . La señalización por Ca^{2+} es un proceso muy importante que controla actividades clave en la mayoría de los tipos celulares, entre estos mecanismos se incluyen la contracción muscular, transmisión sináptica, expresión génica y la secreción hormonal.⁵⁹ En este último proceso, el Ca^{2+} es directamente responsable de la movilización de los gránulos de secreción hacia la membrana de secreción y de su posterior liberación en la exocitosis. La acción reguladora de este ion está supeditada a su concentración, localización intracelular, y duración de la señal de Ca^{2+} .^{14, 60, 61}

Las células eléctricamente excitables son aquellas con permeabilidad iónica dependiente de voltaje o de ligando que exhiben actividad eléctrica espontánea, o en respuesta a un estímulo,

regenerativa y propagada. Las células endocrinas de la adenohipófisis son células excitables, por tanto las elevaciones de $[Ca^{2+}]_i$ en estas células ocurren de manera espontánea o en respuesta a su estimulación por agonistas. Estas elevaciones se expresan como oscilaciones de la concentración intracelular de Ca^{2+} y son dependientes de la entrada de Ca^{2+} y/o de su liberación de reservorios intracelulares.¹⁴

Canales de calcio

Las células endocrinas (*e.g.* tirotropos) son células excitables que presentan diferentes tipos de canales iónicos en sus membranas (sodio, calcio, potasio, cloro), confiriéndoles la propiedad de generar modificaciones transitorias del voltaje de membrana (potenciales de acción, APs) de manera espontánea o por medio de estimulación. Durante este proceso se activan los canales de calcio activados por voltaje (VGCC) en la membrana plasmática, permitiendo el paso de Ca^{2+} al medio intracelular. Como previamente se mencionó, el Ca^{2+} actúa entonces como segundo mensajero controlando una miríada de eventos celulares.^{14, 58}

Electrofisiológicamente, los VGCC se dividen en dos grupos: los de bajo voltaje de activación (LVA), es decir, que requieren una débil despolarización de la membrana para abrirse y su inactivación es rápida; y de alto voltaje de activación (HVA), que requieren de una despolarización de moderada a fuerte para su apertura y se inactivan de manera incompleta o más lentamente que los LVA. Esta propiedad de inactivación de los HVA les permite a las células incrementar la $[Ca^{2+}]_i$ a un nivel suficiente para desencadenar los procesos dependientes de Ca^{2+} . Dentro de los canales HVA encontramos canales del tipo N, P/Q, R y L; siendo este último modulado por una amplia variedad de neurotransmisores y hormonas en las células endocrinas.^{14, 61}

Actividad eléctrica espontánea y regulada

Hace más de 30 años que se reportó actividad eléctrica en las células endocrinas de la hipófisis. El potencial de membrana (V_m) de las células hipofisarias no es estable, sino que oscila partiendo de un valor base o potencial de reposo de aproximadamente -60 mV, considerando que el valor del medio externo es de 0 mV. Estas fluctuaciones a menudo se han asociado con la generación de potenciales de acción (APs) en condiciones basales o en respuesta a un estímulo agonista.⁶² Cuando estas oscilaciones alcanzan un valor umbral (aproximadamente -40 mV) se generan APs, invirtiendo de manera transitoria el voltaje de la membrana llegando a aproximadamente +30 mV, seguido de una hiperpolarización de hasta -85mV. El patrón de los APs dependerá de la amplitud y duración de las oscilaciones de V_m , proporcionando un mecanismo muy efectivo de señalización intracelular.⁶³

Aunque en los tirotropos no se conoce con certeza cuáles son las corrientes iónicas subumbrales responsables de la depolarización de la membrana desde el reposo hasta el valor umbral, las

oscilaciones espontáneas se asocian con la salida de Ca^{2+} de reservorios intracelulares, y su entrada a la célula a través de los VGCC; así como también por el aporte de los canales de Na^+ . Los canales de potasio son esenciales para alcanzar nuevamente el potencial de reposo, son modulados por voltaje, Ca^{2+} y otros segundos mensajeros intracelulares.⁶³ El patrón de la actividad eléctrica varía entre los diversos tipos celulares.^{14, 64} Recientemente, y gracias a la aplicación de la técnica de preparación de rebanadas de hipófisis, se mostró que las células endocrinas presentan depolarizaciones transitorias breves de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ debido a su actividad eléctrica *in situ*.¹⁷ Poco se sabe de la actividad eléctrica espontánea de los tirotrópos.¹⁴

En la actividad eléctrica regulada de los tirotrópos intervienen señales químicas que actúan como agonistas a receptores específicos expresados en la membrana celular. Como ya ha sido mencionado, estos agonistas pueden ser los factores hipotalámicos o productos secretados por las mismas células hipofisarias, u otras hormonas o estímulos que actúan de forma paracrina o autocrina. La activación, en todos los tipos celulares, de los receptores de movilización de Ca^{2+} genera señales globales de Ca^{2+} de gran amplitud que estimulan la secreción. Dentro de dicho grupo se encuentran los receptores acoplados a proteínas G.¹⁴

Receptores acoplados a proteínas G

Los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) son una vasta superfamilia de receptores que comparten una estructura común de siete dominios transmembranales con los extremos amino y carboxilo terminal localizados al exterior y al interior de la célula, respectivamente; y un dominio extracelular de unión a ligando. Como su nombre lo indica, estos receptores están acoplados a proteínas G heterotriméricas, las cuales al ser activadas por la unión del ligando desencadenan diferentes vías de señalización, produciendo mensajeros intracelulares que amplifican la señal de Ca^{2+} .^{14, 65}

Los GPCRs vinculados a la vía de señalización $G_q/11$ son activados por agonistas en todos los tipos celulares de la adenohipófisis, y dentro de estos receptores se incluye el TRHR del tipo 1 expresado en lactotópos y tirotrópos.⁶⁴ En estas células el TRH se une al TRHR ocasionando la disociación de la proteína $G_q/11$, cuya subunidad α estimula a la enzima fosfolipasa $\text{C}\beta$ (PLC). Esta enzima funciona como un amplificador al hidrolizar al 4,5-bifosfato de fosfatidilinositol (PIP_2) produciendo dos mensajeros intracelulares: el 1,4,5-trifosfato de inositol (IP_3) y diacilglicerol (DAG). El IP_3 se une a sus receptores específicos (IP_3R) en el retículo endoplásmico (ER), que es el principal reservorio de Ca^{2+} , y junto con el Ca^{2+} activa al IP_3R . Tras su activación, el IP_3R funciona como un canal de Ca^{2+} permitiendo el eflujo de este ion desde el lumen del ER al citosol, incrementando entonces la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Durante la permanencia sostenida del agonista, la movilización de Ca^{2+} es acompañada por el influjo de Ca^{2+} a la célula desde el espacio extracelular. Si bien en los tirotrópos la vía de señalización $G_q/11$ es activada principalmente por TRH, las endotelinas (ETs) también pueden activarla.^{14, 66-68}

Una de las moléculas más importantes que contribuyen al control de la exocitosis durante la activación de los receptores de movilización de Ca^{2+} es el DAG. En conjunción con el Ca^{2+} , el DAG activa a la proteína cinasa C (PKC) quien incrementa la afinidad por el Ca^{2+} durante la exocitosis.^{14, 22}

Los estímulos inhibidores como la somatostatina y la dopamina, emplean vías dependientes de Ca^{2+} para disminuir la secreción hormonal de sus respectivas células hipofisarias disminuyendo la disponibilidad de Ca^{2+} en la célula.¹³ En lactotrofos la dopamina (DA) se une a sus receptores específicos tipo 2 (D_2), los cuales están asociados con las proteínas $\text{G}_{i/o}$ sensibles a la toxina pertussis. Esta unión ejerce un estímulo de inhibición tónico de la secreción de PRL, es decir, con sólo remover la DA se estimula la secreción de PRL.^{14, 69}

En cuestión de segundos de exposición, la DA incrementa la actividad de canales de potasio, ocasionando una hiperpolarización de la membrana plasmática y por consecuencia se inactivan los VGCC, en particular el de tipo L, con ello reduciendo así la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y por ende la secreción hormonal. Estudios sugieren que ésta es la principal vía por la cual la DA ejerce su estímulo inhibitor. Si la exposición se prolonga durante minutos u horas, se abole la actividad de la enzima adenilato ciclasa (AC), resultando en la disminución de la producción de cAMP y la consecuente supresión de la proteína cinasa A (PKA). Lo anterior ocasiona la reducción del metabolismo de fosfato de inositol, y la supresión de la expresión del gen de PRL. A diferencia de los lactotrofos, en los tirotrofos, la aplicación de DA no inhibe por completo su actividad secretora.^{14, 69}

Dinámica de la actividad de calcio intracelular

Al unirse el TRH a su receptor, en lactotrofos y tirotrofos, se produce un incremento bifásico en $[\text{Ca}^{2+}]_i$, donde se observa un pulso o espiga inicial de gran amplitud, seguido por un lento decaimiento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ hasta llegar a una meseta. El pulso inicial transitorio de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ es debido al aporte súbito y rápido de Ca^{2+} proveniente del ER; la elevación sostenida de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ resulta del incremento del influjo del ion a través de los VGCC tipo L, y del influjo del Ca^{2+} inducido por Ca^{2+} . La espiga inicial es finalizada al disminuir la concentración de IP_3 , al agotarse el Ca^{2+} del ER y al ser secuestrado el Ca^{2+} citoplasmático y posteriormente bombeado fuera de la célula y/o regresado al ER (Figura10).^{14, 66, 70}

Entonces, el pulso inicial de Ca^{2+} es derivado a la acción del IP_3 y Ca^{2+} , en tanto la actividad de la vía DAG-PKC es responsable del mantenimiento de la respuesta de secreción.⁶⁴ A altas concentraciones de TRH predomina la fase inicial de la respuesta, mientras la fase prolongada de la respuesta se observa a concentraciones de moderadas a bajas de TRH. Una célula puede exhibir diferentes amplitudes de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en respuesta a distintas concentraciones de TRH.⁷¹ La información disponible sobre la dinámica de respuesta a TRH en las células endocrinas proviene, casi en su totalidad, de estudios realizados en lactotrofos.

El patrón de señalización o movilización de Ca^{2+} es específico al tipo celular, pero no receptor-específico. Cada tipo celular expresa un conjunto único de componentes celulares para la señalización de Ca^{2+} y así crear sistemas de señalización con diferentes propiedades espaciales y temporales.⁷² Pese a que los lactotrofos y tirotrofos son tipos celulares distintos ambos responden de forma similar al TRH, sin embargo, el evento de respuesta en los lactotrofos está supeditado estrictamente a la presencia de DA. No obstante, la caracterización de las vías de señalización de Ca^{2+} en los tirotrofos aún se encuentra en fase preliminar.^{14, 70}

Al parecer, la actividad eléctrica espontánea en los tirotrofos no desencadena secreción sobresaliente, considerándose entonces la idea de que es posible que este tipo de actividad mantenga a los tirotrofos en un estado responsivo con la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ cercana al nivel umbral. Este tipo de estudios sólo se han realizado en experimentos que emplean células aisladas.¹⁴

Utilizando rebanadas de hipófisis y registros de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ fluorescentes de larga duración, Bonnefont y colaboradores⁷³ reportaron un comportamiento en las células endocrinas que era insólito en registros en células aisladas. Descubrieron que las células tienen la habilidad de desencadenar ráfagas rítmicas de transitorios de $[\text{Ca}^{2+}]_i$, y que éstas son inducidas y moduladas por factores hipotalámicos como el TRH. Sugieren que la regulación de estas ráfagas rítmicas pueden optimizar el tiempo y la cantidad de hormona secretada; y que es probable que mecanismos célula-célula (*e.g.* sincronización celular mediada por uniones de tipo comunicantes, y factores paracrinós) ayuden a coordinar el tiempo de secreción de una célula.

Este tipo de aporte provoca incertidumbre, pues no se sabe si los patrones de los transitorios de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ observados en células aisladas tienen un significado funcional diferente en comparación con los exhibidos en células endocrinas que se encuentran en su ambiente nativo. Es por ello que se ha motivado el diseñar los experimentos relativos a la señalización por $[\text{Ca}^{2+}]_i$ utilizando preparaciones de la glándula que preserven tanto la arquitectura del tejido y la ocurrencia como la actividad espontánea de $[\text{Ca}^{2+}]_i$.^{14, 73}

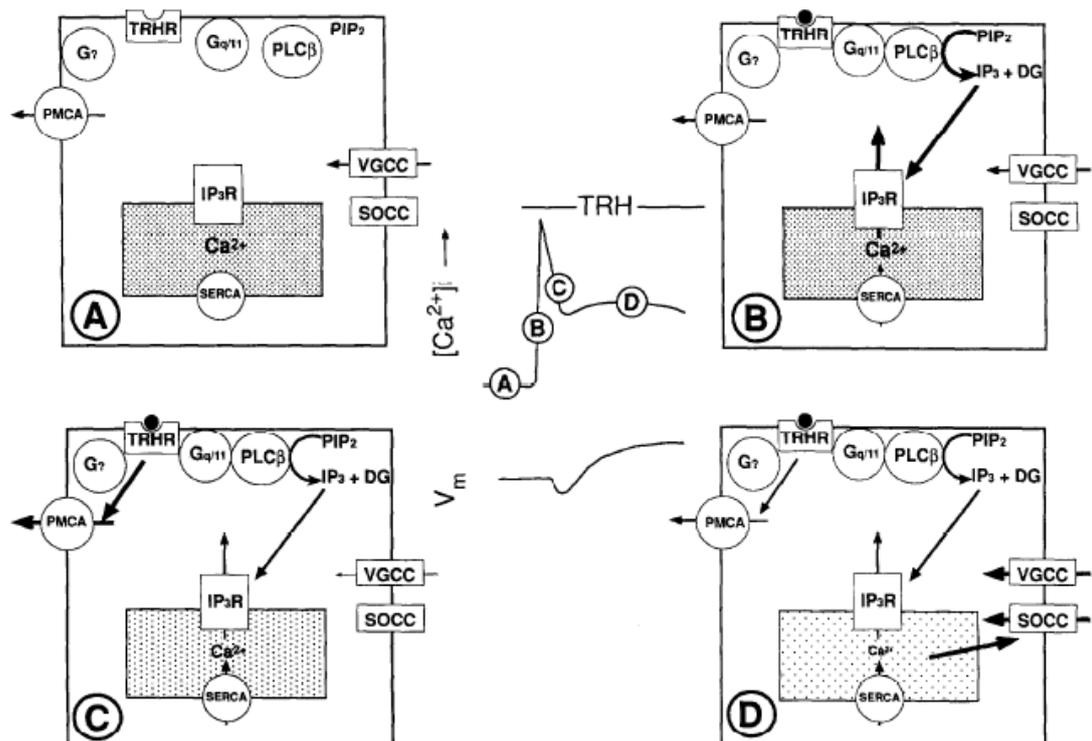


Figura 10 Principales cambios del flujo de Ca^{2+} ante el estímulo de TRH. **A** Célula en reposo. **B** Comienzo de la espiga inicial de $[Ca^{2+}]_i$ en respuesta a TRH. El IP_3 libera Ca^{2+} del retículo endoplásmico. **C** Terminación de la espiga inicial de $[Ca^{2+}]_i$. Declina la producción de IP_3 y la liberación de Ca^{2+} del retículo endoplásmico. El Ca^{2+} citoplasmático es bombeado fuera de la célula por la PMCA, y disminuye el influjo de Ca^{2+} a la célula a través de VGCC. Se activan canales de potasio y se hiperpolariza la célula. **D** Meseta de $[Ca^{2+}]_i$. El Influjo de Ca^{2+} a través de VGCC incrementa cuando los múltiples canales de potasio son inhibidos para depolarizar la célula. El influjo de Ca^{2+} a través de los SOCCs incrementa mientras que los reservorios intracelulares se agotan. TRH, hormona liberadora de tirotrópina; TRHR, receptor de TRH; Ca^{2+} , ion calcio; $[Ca^{2+}]_i$, concentración de calcio intracelular libre; V_m , potencial de membrana; PMCA, ATPasa de Ca^{2+} ; VGCC, canal de calcio activado por voltaje; IP_3 , 1,4,5-trifosfato de inositol; IP_3R , receptor de IP_3 ; SERCA, ATPasa de Ca^{2+} del retículo sarco(endo)plásmico; PIP_2 , 4,5-bifosfato de fosfatidilinositol; DG, diacilglicerol; PLC β , Fosfolipasa C β ; SOCCs, canales operados por Ca^{2+} . Tomada de Hinkle, et al., 1996.⁷¹

Desensibilización del receptor a TRH

Se define desensibilización como la disminución en la respuesta a un agonista en el tiempo, o como la disminución en la respuesta a la subsecuente exposición al agonista.⁶⁶ Las células en las que el TRHR está unido a TRH se mantienen refractarias a futuras estimulaciones con TRH, es decir están desensibilizadas, hasta que el agonista es removido y la vía de señalización permita la recuperación de la capacidad de respuesta al TRH o resensibilización. Se ha considerado a la internalización de GPCRs como una estrategia celular para controlar su capacidad de respuesta hacia señales extracelulares, y la duración de este proceso de resensibilización dependerá de la tasa de degradación y reciclaje de estos receptores internalizados.⁷⁴

Tras la unión con su agonista el TRHR es rápidamente fosforilado ($t_{1/2} \approx 15$ s) en múltiples sitios en el extremo citoplasmático por cinasas de receptores acoplados a proteínas G (GRKs), ello permite el reclutamiento de β -arrestinas del citosol hacia el receptor. Al asociarse las β -arrestinas el receptor se desacopla de la proteína G, se desensibiliza y el complejo TRHR- β -arrestina es internalizado de una manera dinamina-clatrina dependiente. Como ya se mencionó, para resensibilizarse los receptores deben ser reciclados hacia la membrana plasmática. Experimentalmente, cuando el agonista es removido por lavados, la MP es gradualmente repoblada con TRHR en un $t_{1/2} \approx 30$ minutos, aunque está bien establecido que la capacidad de respuesta de $[Ca^{2+}]_i$ a altas dosis de TRH requiere de 5-20 minutos. No es del todo claro si este periodo resulta de la desensibilización del receptor o del agotamiento de los reservorios de Ca^{2+} . Cuando se retira el agonista, el receptor es desfosforilado en un $t_{1/2}$ menor a 5 min, y antes de que se haya llevado a cabo un reciclaje extenso de receptores desfosforilados, se recluta un pozo de receptores que es llevado a la MP.^{66, 74-76} Jones y colaboradores⁷⁴ diseñaron una estrategia de monitoreo del tránsito de los TRHR al ser internalizados. Concluyen que la mayoría de los receptores no retornan a la MP hasta después de más de 2h; sin embargo la densidad de receptores en la superficie fue restablecida en menos de 1h, indicando que los receptores reclutados a la MP contribuyen mayormente en la repoblación de la MP (Figura 11). Yu y colaboradores⁷⁷ reportan que el TRHR puede ser resensibilizado sin su internalización.

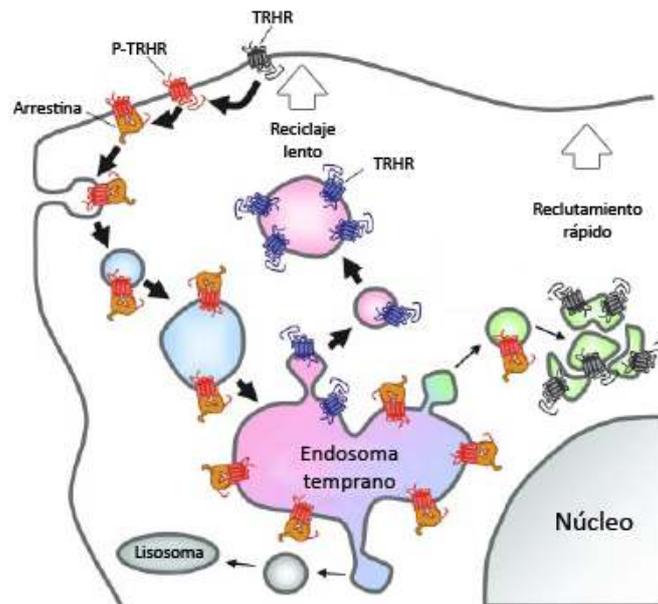


Figura 11 *Tránsito del TRHR*. Tránsito del TRHR en respuesta a su unión con TRH. Las principales vías se representan con flechas gruesas y las menos utilizados con flechas delgadas Modificada de Jones, et al., 2009.⁷⁴

Regionalización

Se han reportado diferencias en atributos anatómicos y fisiológicos de poblaciones de tipos celulares endocrinos con respecto a su distribución en la glándula hipófisis. En lactotrofos, por ejemplo, se han observado diferencias en relación al tamaño celular, la respuesta a TRH, así como también a la influencia de otros agonistas de PRL provenientes de los lóbulos posterior e intermedio que acceden al lóbulo anterior vía los vasos portales cortos. Esta distribución obedece una disposición central y lateral del lóbulo anterior, por lo que diversos estudios se han desarrollado respetando esta división: la central, que comprende la región que rodea a los lóbulos intermedio y posterior; y la lateral, región ubicada en la periferia del lóbulo anterior (Figura 12).⁷⁸⁻⁸¹

Los mismos autores de los trabajos anteriores sugieren que la acción de factores paracrinos y/o disponibles por la disposición de la vasculatura en cada región, pueden estar influenciando a que

se presente esta regionalización. No obstante, dichos estudios se condujeron bajo condiciones que comprometen la relación anatómica-funcional del tejido, como por ejemplo cultivos celulares o preparaciones de la glándula seccionada. La comunidad científica ya se ha percatado de esta situación, viéndose renovado el interés de la aplicación en el campo de la endocrinología de la técnica de preparaciones de rebanadas de hipófisis.⁷⁸⁻⁸¹

Fauquier y colaboradores⁸², entre otros grupos de trabajo, aseguran que la hipófisis rápidamente removida del cráneo y bañada en una solución Ringer casi congelada, cortada en rebanadas de (120-300 μm) con un vibrátomo; conserva intacta su arquitectura tisular. En nuestro grupo de trabajo, se estudió la caracterización y regionalización de la respuesta de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ de lactotopos a TRH utilizando rebanadas de hipófisis; y los resultados obtenidos indican que hay una respuesta de mayor intensidad en la región central, pero difiere con la literatura en que la inhibición por la dopamina no fue significativa entre ambas regiones.¹⁶

La información concerniente a los tirotropos no es tan basta en comparación con otros tipos celulares, y dentro de la búsqueda que se realizó no se identificó estudio alguno relacionado a la regionalización. La escasa información disponible se obtuvo a partir de experimentos conducidos bajo condiciones que comprometen la relación anatómica-funcional del tejido.

Las demandas fisiológicas varían a lo largo de la vida de un organismo, y por tanto se presentan diversos escenarios en donde la hipófisis- su población celular- modifica su actividad para con esos ajustes abastecer las necesidades que dicho panorama demanda. Los ajustes implican cambios en la población celular, que van desde modulaciones en la expresión de receptores, en la respuesta a los mismos, en la cantidad de hormona secretada, hasta reclutamiento de otras células, hiperplasia de la glándula, entre otros. Podría pensarse como un sistema complejo autoorganizado. Como acertadamente McArdle y Evans definen, es un circo.

*La glándula (hipófisis) no ha sido caracterizada como un escuadrón formal de células, sino como un circo en donde sus actores cambian disfraces, se inmiscuyen en los actos de otros y nos asombran con hazañas de contorsiones funcionales.*⁸³

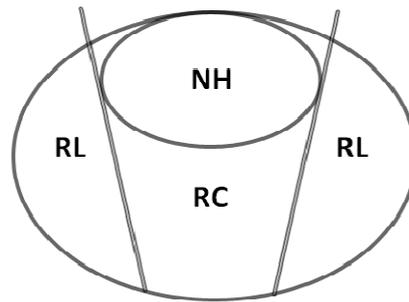


Figura 12 Regionalización de la hipófisis. Esquema que representa a la adenohipófisis dividida en las regiones central (RC) y lateral (RL). NH, neurohipófisis. Adaptado de Diaz, et al., 2002.⁷⁸

Dado que los estudios publicados alusivos a tirotrópos se han realizado bajo condiciones que comprometen la relación anatómica-funcional del tejido, y a que actualmente se dispone de una técnica precisa de preparación de rebanadas de hipófisis que respeta dicha relación; resulta interesante investigar si en rebanadas de hipófisis de ratón macho existe alguna diferencia fisiológica entre las poblaciones de tirotrópos con relación a su distribución en la glándula. De ahí surge la pregunta de si es posible que exista diferencia en la respuesta de calcio intracelular de los tirotrópos a TRH entre la región central y lateral de la hipófisis.

La respuesta a esta pregunta aportaría material que ayude a conocer un poco más los procesos de plasticidad que podrían darse ante un evento fisiológico que demande grandes ajustes en la secreción hormonal, como por ejemplo en la condición de hipotiroidismo e hipertiroidismo.

Hipótesis

Dado que en los lactotrofos se ha reportado una actividad diferencial entre las regiones central y lateral de la hipófisis, y que la fisiología de las células endocrinas hipofisarias comparten muchos elementos comunes, se considera que en los tirotrofos existirá una respuesta diferencial expresada por variaciones de calcio intracelular a TRH entre la región central y lateral de la glándula.

Objetivos

Identificar si las poblaciones de tirotrofos, definidos como células que presentan una respuesta positiva a TRH y cuya actividad no fue inhibida por dopamina, al ser estimulados con TRH exhiben variaciones en su respuesta de calcio intracelular con referencia a su ubicación regional en la adenohipófisis.

- Estimar la proporción de tirotrofos en la adenohipófisis en la RC y RL.
- Comparar las poblaciones de tirotrofos en la regiones central y lateral con base en las variaciones de $[Ca^{2+}]_i$, en ausencia y presencia del agonista TRH a distintas concentraciones, el número dosis de TRH a las que respondieron, así como la magnitud de la respuesta.

Material y métodos

Para identificar si las poblaciones de tirotrupos, con referencia a su distribución regional en la glándula, exhiben variaciones de la respuesta de calcio intracelular, se emplearon registros de la actividad espontánea y regulada por el agonista TRH de tirotrupos en rebanadas de hipófisis de ratón macho adulto.¹⁶

Obtención de rebanadas

Ratones macho adulto de dos meses de edad fueron anestesiados con Pentobarbital (1 mL /2.5 Kg) vía intraperitoneal y sacrificados por decapitación. Tras la remoción del cerebro, la hipófisis fue extraída e inmediatamente después embebida en agar de alto punto de fusión al 3% (Invitrogen; Carllab Cal, USA). Una vez enfriado, el cubo de agar se colocó en la platina de un vibratomo (Leica VT1000S) y se realizaron cortes transversales de 130 μm . Durante este proceso, las rebanadas se mantuvieron sumergidas en solución salina normal (125 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 2 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 , 1.25 mM NaH_2PO_4 , 26 mM de NaHCO_3 , y 10 mM glucosa), a temperatura ambiente y con burbujeo continuo con carbógeno (95% O_2 , 5% CO_2) para mantener el pH a 7.4 y oxigenación constante. Una vez obtenidas, las rebanadas se mantuvieron por un máximo de cuatro horas en estas condiciones. Del conjunto de rebanadas de hipófisis obtenidas por animal, se seleccionó solamente una rebanada que presentara el tejido sin daños.

El manejo de los animales se realizó bajo el protocolo aceptado institucionalmente similar a la Guía de USPH para el uso y cuidado de animales de laboratorio.

Obtención de los registros de calcio intracelular

Se registraron las fluctuaciones de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ mediante espectrometría e imagenología del indicador intensiométrico sensible a Ca^{2+} Fluo-4 AM en un microscopio estereoscópico de fluorescencia. Para realizar los registros, las rebanadas fueron inmovilizadas en triángulos de acetato recubiertos con poli-L-lisina 0.3% y posteriormente incubadas durante 30 minutos a temperatura ambiente con solución salina adicionada con Fluo-4 AM 2 μM (Teflabs; Austin, USA) y 0.5% de ácido plurónico F-127 (Sigma, St Louis MO, USA).

Una vez incorporado el Fluo-4 AM, las rebanadas fueron lavadas con solución salina normal y colocadas en el fondo de la cámara de registro de plexiglás, directamente sobre la platina de un

microscopio estereoscópico de fluorescencia (Leica MZ 16F Fluo combi III), en donde se mantuvo perfusión constante de solución salina burbujeada (1mL/min).

Se obtuvieron secuencias de 300 imágenes de fluorescencia, en ausencia y presencia del agonista, a partir de la excitación del Fuo-4 AM con una longitud de onda de 480 nm de excitación y 510 nm de emisión, durante una exposición de 300 ms y un intervalo de 300 ms entre cada imagen, siendo entonces la duración de cada registro de tres minutos. La adquisición se realizó con una cámara digital CCD enfriada (RS Photometrics Sensys) y el software Image Pro Express versión 4.5.1.3.

Se aplicó el agonista TRH (Sigma-Aldrich) a través de perfusión en baño durante los primeros 30 s de cada registro, en concentraciones de 0.1, 1, 10 y 100 nM, con lavados de 15 min entre cada dosis para evitar efectos acumulativos del TRH; posteriormente se aplicó una dosis compuesta de TRH 100 nM – DA 2 μ M (Sigma) – TRH 100 nM; al final administró una solución de alto potasio KCl 140mM para comprobar la viabilidad de las células con el fin de discriminar entre lactotrofos y tirotrofos.

Análisis de resultados

Las secuencias de imágenes se procesaron con el programa de cómputo Image J (NIH, USA). Para obtener una serie de imágenes corregidas se aplicó la función matemática F-F0 a partir de la substracción: $i_2 = (i_1 - i_2) * k_1 - k_2$ donde i_1 es la secuencia de imágenes obtenida, i_2 la primera imagen de la secuencia obtenida (condición basal), $k_1=1$ y $k_2=2$.

El análisis de las células individuales se realizó en la secuencia de imágenes resultantes del procesamiento (i_2). Se seleccionaron y analizaron las células que respondieron a cada una de las dosis, esto es, aquellas que cambian su concentración de calcio intracelular en respuesta a la estimulación con TRH y por lo tanto su nivel de fluorescencia, los registros obtenidos se visualizaron en el programa Origin 6.0 (Microcal Software) discriminando así las respuestas espontáneas de las respuesta por estímulo con la TRH de cada una de las células individuales.

Para observar la amplitud de la respuesta de cada célula se utilizó el programa Igor (WaveMetrics 2006) en el que se le da un seguimiento célula por célula de la intensidad de la respuesta de $[Ca^{2+}]_i$. Los protocolos en Igor fueron descritos por el Dr. León Islas (Facultad de Medicina, UNAM) y Piere Fontaneaud (Insitute of Functional Genomics, Montpellier Francia).

Se consideraron para el análisis todas las células de la rebanada que respondieron al estímulo de KCl, es decir, que se consideraron como células viables, y a partir de esta extracción se seleccionaron para la región central y lateral de la AH aquellas células que exhibieron una respuesta positiva a TRH y cuya actividad no fue inhibida por DA, fueron definidas como tirotrofos.

Se estimó y comparó la población de tirotrópos para la región central y lateral de la AH, con base en el análisis del promedio de número de tirotrópos normalizado al área que presentaban actividad de $[Ca^{2+}]_i$ ante el estímulo de TRH en sus diferentes concentraciones, o sin él; la proporción de tirotrópos que respondían a determinado número de dosis de TRH a las que fueron expuestos, el promedio de la intensidad máxima de fluorescencia máxima y el área bajo la curva para inferir la magnitud de la respuesta. Los resultados fueron sometidos a análisis utilizando los estadísticos ANOVA, t y χ^2 con el programa de cómputo Excell (Microsoft 2010.)y Origin 6.0.

Resultados

Los resultados obtenidos a partir del protocolo presentado fueron los siguientes:

Identificación de tirotropos

La Figura 13 ilustra una rebanada de hipófisis, con sus respectivas RC y RL, que ha incorporado el indicador intensiométrico sensible al Ca^{2+} Fluo-4 AM **(A)**. Además se presenta una serie de gráficas de superficie de cambio de intensidad de fluorescencia, que se traduce en variaciones de $[\text{Ca}^{2+}]_i$, sin estimulación **(B)**, es decir en condiciones basales; ante la presencia del agonista TRH **(C)**, en donde se observa un cambio de la intensidad de fluorescencia ($F-F_0$) en aquellas células que responden de forma positiva al estímulo; y con la estimulación final de una solución alta en potasio **(D)**, considerándose como vivas aquellas células que incrementen $F-F_0$. En todos los registros se observó aumento en la actividad de calcio asociada a la perfusión con TRH y la solución alta en potasio.

Una vez comprobada la viabilidad de la rebanada, se procedió a seleccionar a aquellas células cuyos registros de actividad de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ durante los registros exhibían una respuesta positiva a TRH, descartando aquellas que no lo hacían (Figura 14). Dado que tanto los lactotropos como los tirotropos responden a TRH, se efectuó una segunda selección con base a la acción de la DA en los mismos en la dosis compuesta administrada TRH-DA-TRH. Esto es, al ser la secreción de PRL de los lactotropos inhibida tónicamente por la DA, se imposibilita la respuesta al secretagogo cuando previamente se ha expuesto a DA. Por el contrario, los tirotropos al no estar sujetos a un estímulo inhibitorio tónico de la DA, están posibilitados a responder al estímulo de TRH posterior al de la DA. En la Figura 15 se ejemplifica la discriminación entre estos dos tipos celulares, donde se seleccionaron los tirotropos como aquellas células que en sus registros de actividad de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ respondieron de manera positiva tanto a la primera como a la segunda exposición a TRH, al no ser inhibidos por DA.

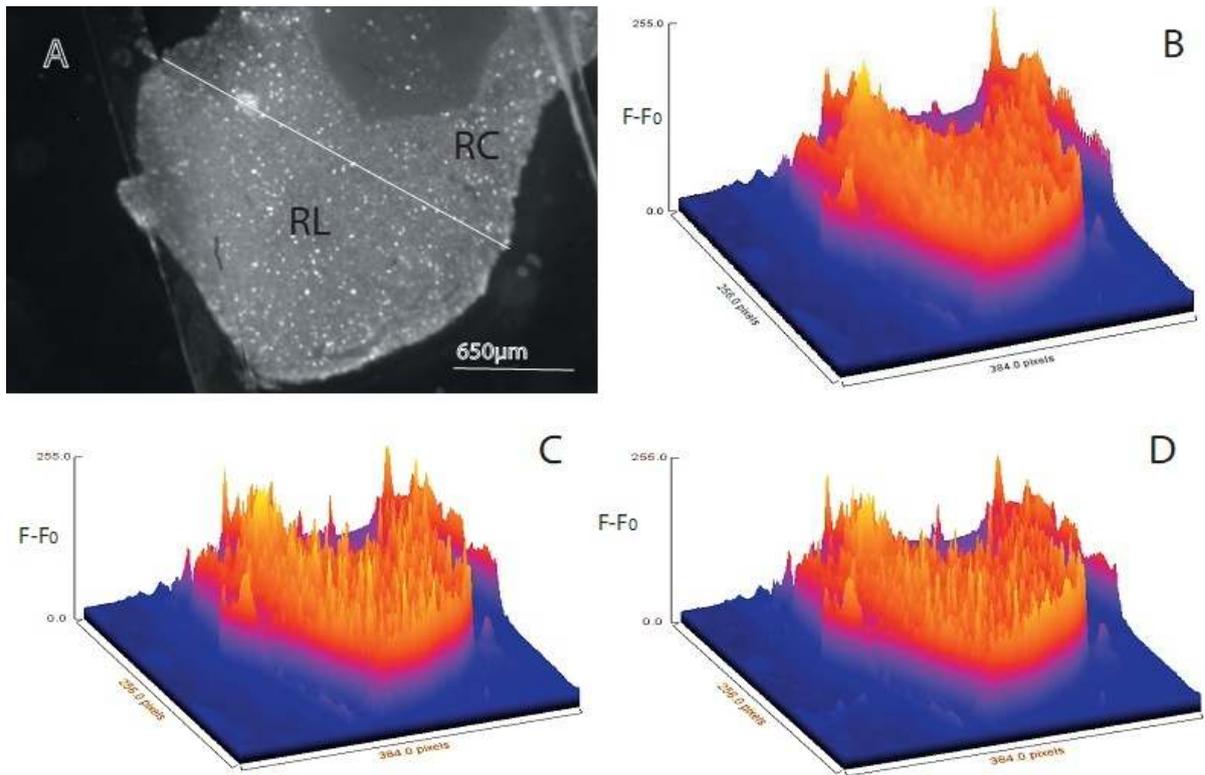


Figura 13 Gráficos de superficie de intensidad de fluorescencia de rebanadas de hipófisis de ratón macho adulto. Los picos indican un aumento en la intensidad de fluorescencia. **A** Rebanada de hipófisis con el Fluo-4 AM incorporado. **B** Actividad basal de la rebanada. **C** Estimulación con TRH 100 nM. **D** Estimulación con solución alta en potasio. RC, región central; RL, región lateral; F-F₀, cambio de intensidad de fluorescencia. Rendón, 2010.¹⁶

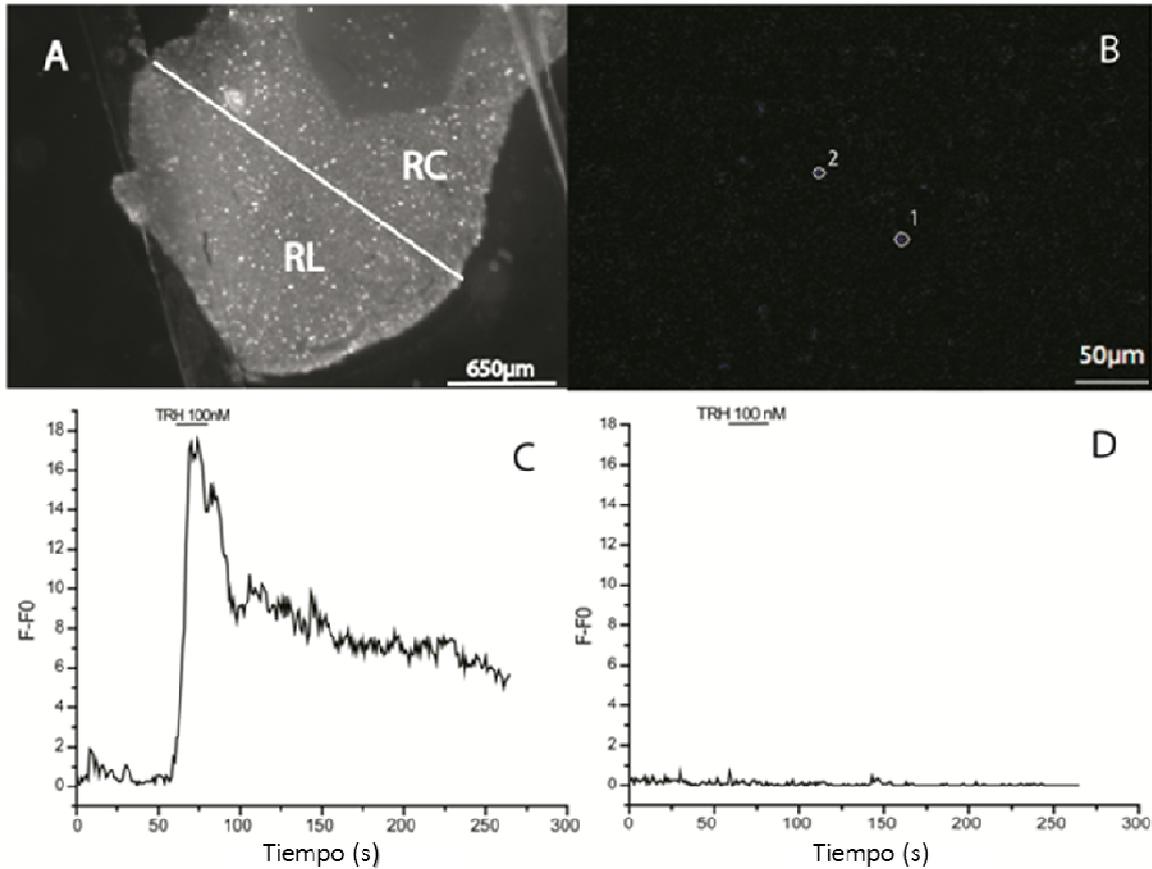


Figura 14 Identificación de células que responden positivamente a TRH. A Rebanada de hipófisis con el Fluo 4 AM incorporado. **B** Ejemplificación de selección de dos células en el campo. **C** Registro de actividad de $[Ca^{2+}]_i$ de célula que exhibe respuesta positiva a TRH 100 nM. **D** Registro de actividad de $[Ca^{2+}]_i$ de célula que no exhibe respuesta positiva a TRH 100 nM, se mantiene silente. RC, región central; RL, región lateral; TRH, hormona liberadora de tirotropina; DA, dopamina; F-F0, cambio de intensidad de fluorescencia. Rendón, 2010.¹⁶

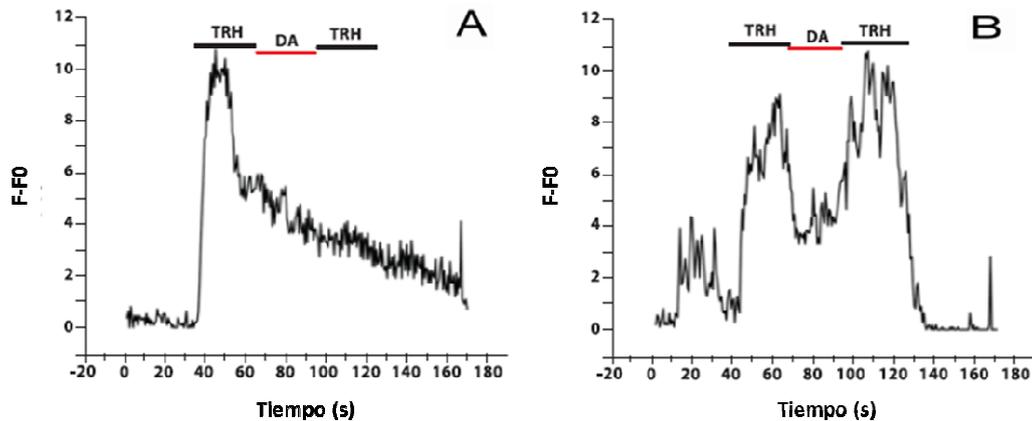


Figura 15 *Discriminación entre tirotrópos y lactotrópos*. Registros de actividad de $[Ca^{2+}]_i$ en respuesta a una dosis compuesta de TRH 100 nM – DA 2 μ M – TRH 100 nM. A Lactotrope; responde al estímulo de TRH, después es inhibido por la DA, y por tanto no responde a la segunda exposición a TRH. B Tirotrope, responde de forma positiva a ambas exposiciones a TRH. TRH, Hormona liberadora de tirotrópin; DA, dopamina; F-F0, cambio de intensidad de fluorescencia.

Proporción de tirotrópos en la adenohipófisis y en las regiones central y lateral

Para estimar la proporción de tirotrópos en la AH, se contabilizaron las células que respondieron al estímulo de alto potasio y se consideraron como el 100% de población celular de la adenohipófisis. A partir de ahí, se calculó que el porcentaje de tirotrópos de esta población es de 6%. Con base en lo anterior, se estimó el número de tirotrópos normalizado al área (μ m) en la RC y RL, siendo mayor el número en la RC (Figura 16). Complementariamente, se realizaron inmunotinciones de rebanadas de hipófisis y se calculó el promedio de células positivas a TSH (tirotrópos) normalizadas al área (μ m) en cada región. Se realizó un análisis de varianza, donde se encontró que hay más células positivas a TSH en RL (Figura 17).

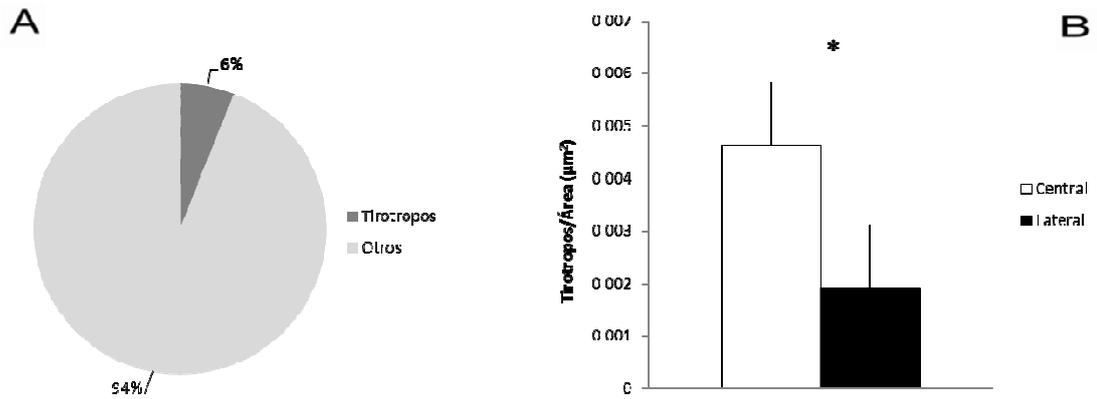


Figura 16 *Porcentaje de tirotropos en la adenohipófisis. A* Porcentaje de la población de tirotropos con respecto a la población celular endocrina de la adenohipófisis. **B** Número de tirotropos por unidad de área en la región central y lateral de la adenohipófisis. Prueba ANOVA * $p < 0.05$, $n = 3$.

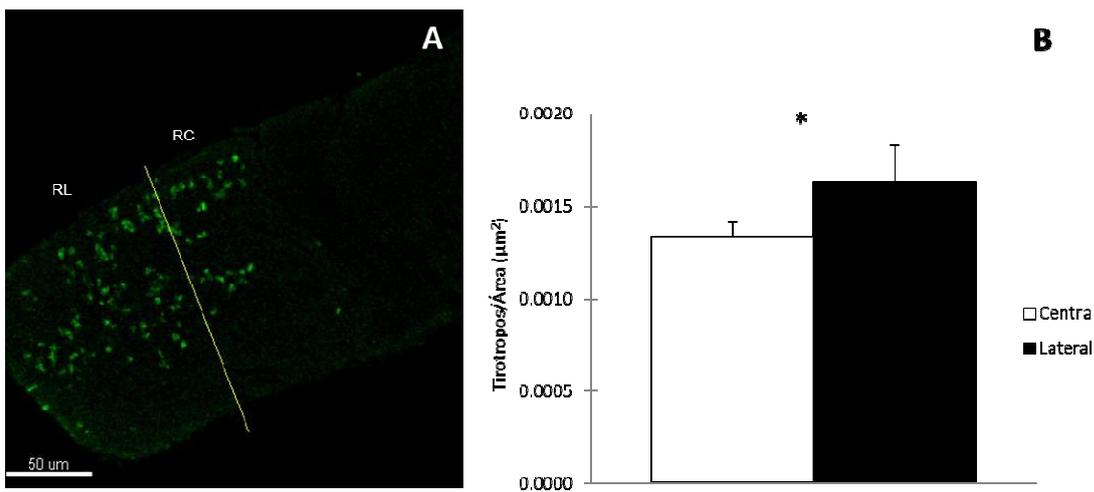


Figura 17 *Inmunotinción de TSH en adenohipófisis de ratón, se muestran las regiones central y lateral. A* Inmunotinción de rebanada de hipófisis en donde se muestra en verde las células positivas a TSH (tirotropos). **B** Células positivas a TSH normalizadas al área (μm) en la región central y lateral de la adenohipófisis. Prueba ANOVA * $p < 0.05$, $n = 4$.

Respuesta de $[Ca^{2+}]_i$ a TRH de tirotropos de la región central y lateral

La figura 18 ilustra el seguimiento de la respuesta de $[Ca^{2+}]_i$ espontánea y regulada por TRH a concentraciones de 0.1, 1, 10 y 100 nM. Se graficó y analizó el seguimiento de cada tirotropo, y se comparó la respuesta de la RC y RL bajo diversos parámetros como presencia/ausencia de actividad espontánea; porcentaje de células que responden a cada concentración y a distinto número de exposiciones; promedio de la intensidad máxima y área bajo la curva.

En cuanto a la presencia/ausencia de actividad espontánea, se encontraron diferencias entre ambas regiones adenohipofisarias ($p < 0.05$), siendo que el 70% de la población de tirotropos de RL presentó actividad espontánea, mientras que sólo el 40% de la población central lo hizo (Figura 19).

No se observaron diferencias en la respuesta de los tirotropos en ambas regiones anatómicas a las distintas concentraciones de TRH, con la excepción de la dosis de 0.1 nM, donde los tirotropos de la RL respondieron en mayor proporción ($p < 0.005$) (Figura 20). Con respecto al número de exposiciones a TRH, un mayor número de tirotropos de la RC respondieron a una, dos y tres dosis de TRH; mientras que en la RL presentó mayor proporción de células que respondieron a cuatro dosis (Figura 21).

La Figura 22 muestra el seguimiento de la intensidad de fluorescencia (FI) de los tirotropos de la región central y lateral de una rebanada de hipófisis. Se puede observar el cambio de color de los trazos que indican un cambio en la fluorescencia de la célula, y por tanto en la $[Ca^{2+}]_i$ en el curso temporal de los eventos de registro. El promedio de la intensidad máxima de fluorescencia de la población lateral fue mayor en condición basal ($p < 0.0005$) y a TRH 0.1 nM ($p < 0.05$), que el registrado por la población central (Figura 23). El área bajo la curva de la respuesta de la población lateral fue mayor en condición basal y en las cuatro dosis de TRH que se administraron ($p < 0.05$) (Figura 24).

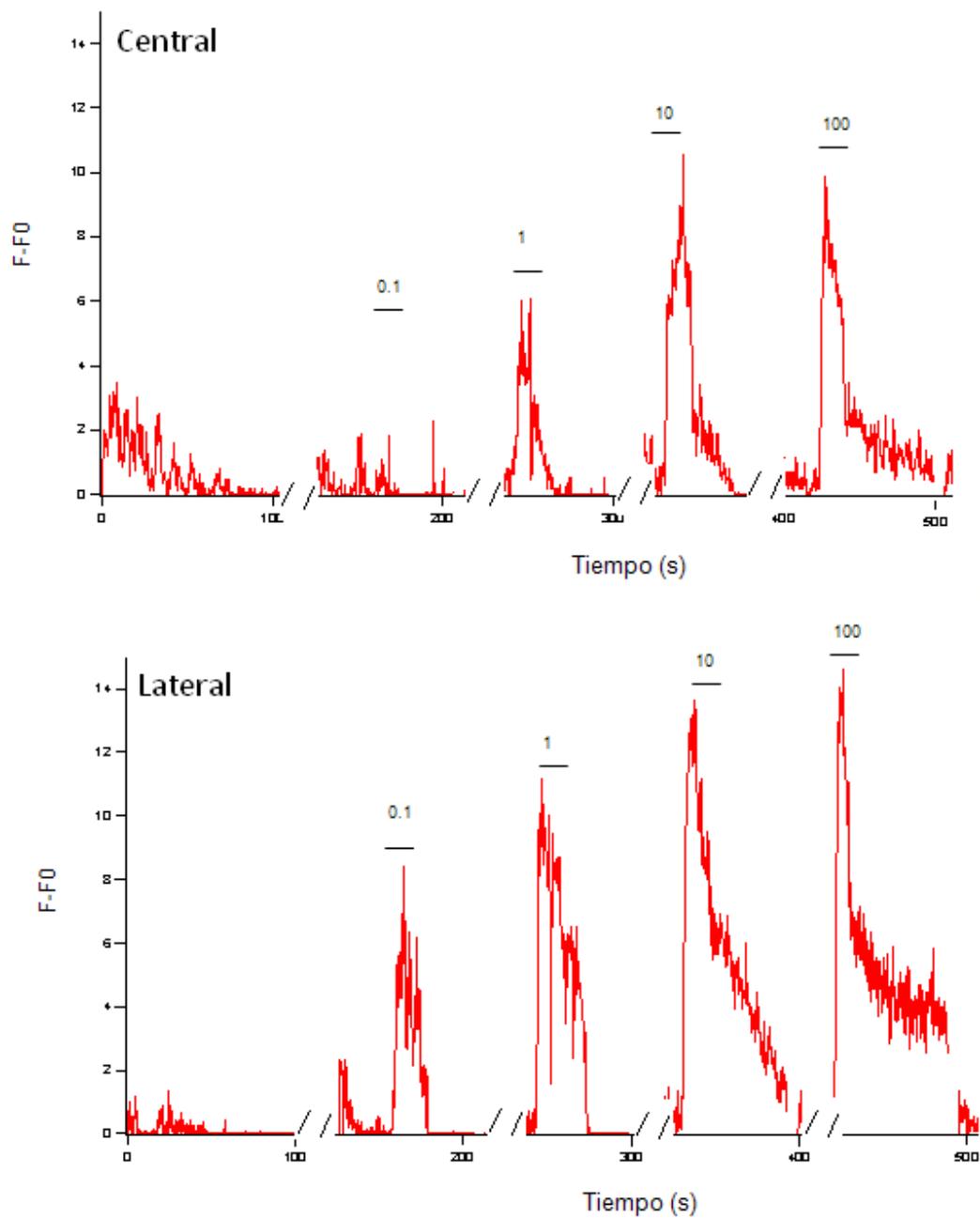


Figura 18 Efecto de diferentes dosis de TRH en la respuesta de $[Ca^{2+}]_i$ a TRH. Se muestran registros de una sola célula de cada región, lateral y central, de la de la adenohipófisis a TRH 0.1, 1, 10 y 100 nM, con un intervalo de 15 minutos de reposo entre cada dosis.

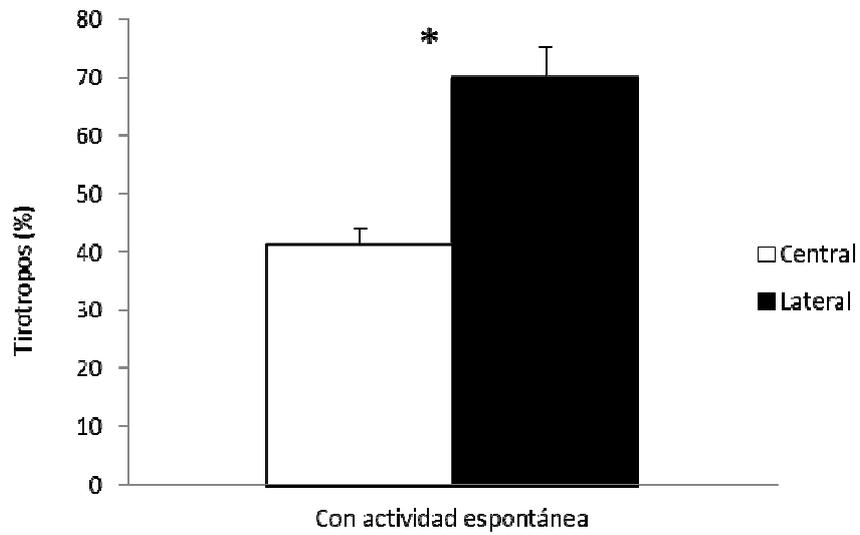


Figura 19 *Actividad espontánea*. Porcentaje de tirotropos que presentaron actividad espontánea en la región central y lateral de la adenohipófisis. * Prueba χ^2 $p < 0.005$, $n=3$.

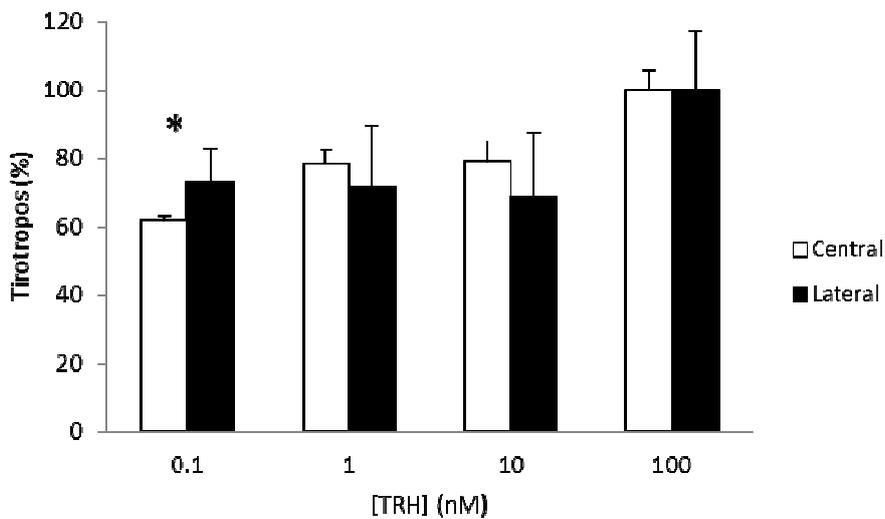


Figura 20 *Respuesta a diversas concentraciones de TRH*. Porcentaje de tirotropos que respondieron en presencia de TRH a 0.1, 1, 10 y 100 nM en la región central y lateral de la adenohipófisis. * Prueba χ^2 $p < 0.005$, $n=3$.

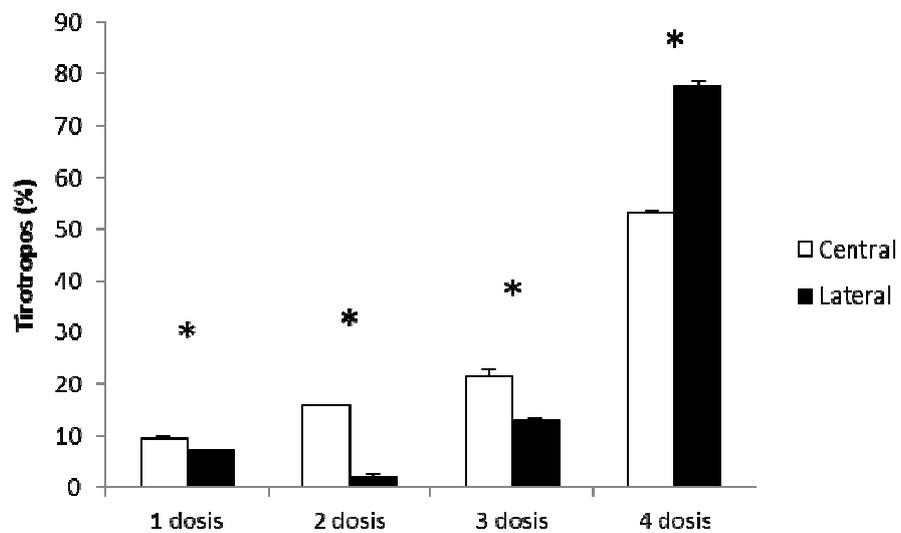


Figura 21 Respuesta a distinto número de exposiciones a TRH. Porcentaje de tirotropos que en la totalidad del registro respondieron a 1, 2, 3 y 4 dosis de TRH. Prueba χ^2 * $p < 0.05$, $n=3$.

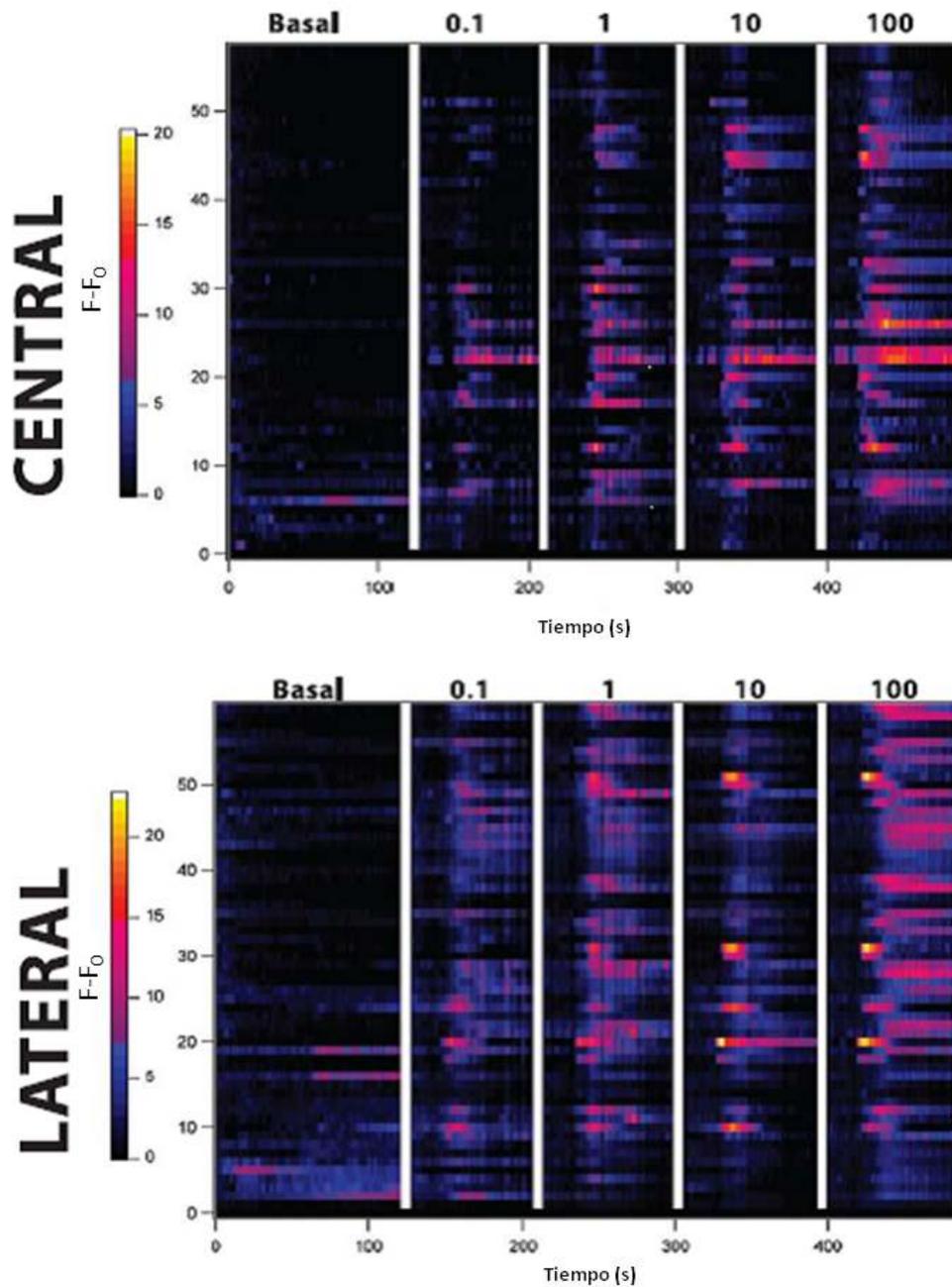


Figura 22 Seguimiento temporal de la intensidad de fluorescencia (FI) de los tirotrópos en cada región a diferentes concentraciones de TRH. La barra de color en la izquierda muestra la FI. En el eje Y, cada línea representa la FI de una sola célula con respecto al tiempo (s) representado en el eje X, en condición basal y en presencia de TRH a 0.1, 1, 10 y 100 nM.

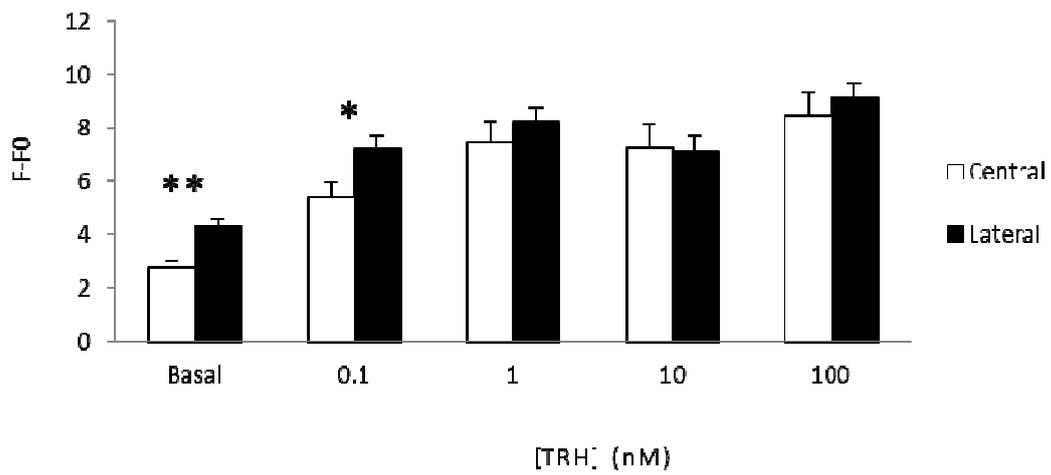


Figura 23 *Intensidad máxima promedio de la respuesta de $[Ca^{2+}]_i$ a TRH.* Se muestra la intensidad máxima promedio de los tirotrpos en cada región en condición basal y en presencia de TRH a 0.1, 1, 10 y 100 nM. Prueba t, ** $p < 0.0005$, * $p < 0.05$, $n=3$.

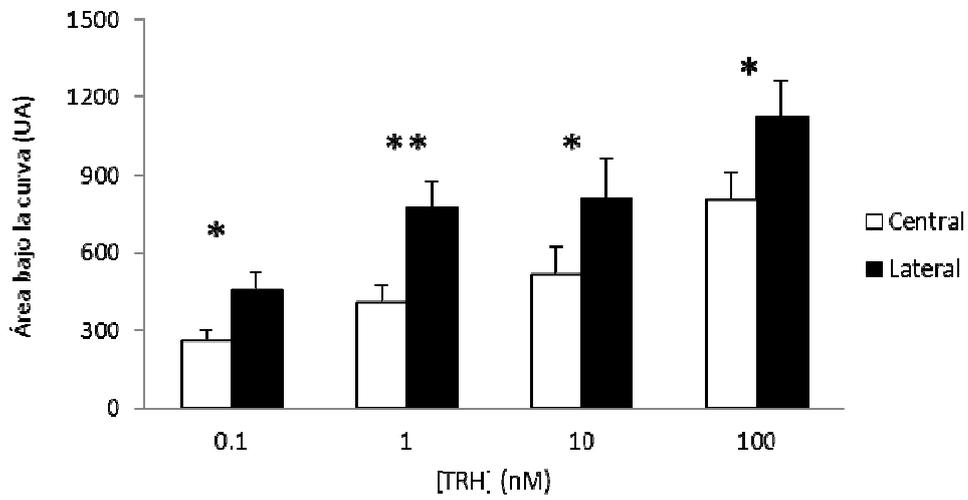


Figura 24 Área bajo la curva de la respuesta de $[Ca^{2+}]_i$ a TRH. Se presenta el promedio del área bajo la curva de la respuesta de los tirotrpos de la región central y lateral en presencia de TRH a 0.1, 1, 10 y 100 nM. Prueba t, ** $p < 0.0005$, * $p < 0.05$, $n=3$.

Discusión

El propósito más importante de esta tesis fue el de identificar posibles diferencias regionales en la respuesta de $[Ca^{2+}]_i$ a TRH de los tirotropos en rebanadas de hipófisis de ratón macho adulto. Esto no con la finalidad de establecer subpoblaciones desde el punto de vista clásico de heterogeneidad de las células endocrinas, es decir una regionalización de subpoblaciones celulares con atributos inherentes. El concepto de heterogeneidad de las células endocrinas se encuentra en evolución, e involucra procesos nuevos, más dinámicos y complejos; por lo que se ha sugerido que es mejor llamarlo “plasticidad secretora”. Gracia-Navarro y colaboradores definen este término como una marcada habilidad de las células endocrinas para adaptar de forma dinámica la respuesta de síntesis y secreción ante demandas fisiológicas del animal, a través de cambios funcionales complejos a nivel molecular y celular⁸⁴. La aportación de esta tesis debe ser vista como una aproximación a un estudio de plasticidad secretora en ciernes.

En este trabajo pudimos establecer una preparación biológica de rebanada de hipófisis viable, y por tanto es posible obtener información a partir de ésta. Las células seleccionadas y denominadas como tirotropos, es decir aquellas que exhiben una respuesta de $[Ca^{2+}]_i$ positiva a TRH y cuya actividad no fue inhibida por la dopamina, presentaron respuestas de calcio similares a las de los lactotropos. Esto concuerda con la descripción que Ashworth y Hinkle (1996) realizaron, sin embargo, aún se desconoce la diferencia del patrón de respuesta entre lactotropos y tirotropos.

Siguiendo nuestro protocolo de selección de tirotropos, la fracción de la población celular representada por los tirotropos es del 6%, cifra concordante con la reportada en la literatura, 5-10%.¹⁴ El análisis de la información obtenida con los registros de la actividad de Ca^{2+} sugiere que la población de tirotropos de la RC responde en mayor proporción a TRH, sin embargo, las inmunotinciones indican que existe un mayor número de tirotropos en la lateral. Lo anterior sugiere que pese a que hay más tirotropos en la RL con respecto a la RC, la población de la RC es fisiológicamente más activa, es decir, ante el estímulo de TRH se involucran más tirotropos de la RC en la respuesta. Estos resultados discrepan con los de Nakane (1970), quien mediante inmunohistoquímica de rebanadas de hipófisis, sostiene que los tirotropos se encuentran principalmente distribuidos en la región central.⁸⁵

Nuestros resultados indican que los tirotropos que exhiben actividad espontánea se encuentran principalmente distribuidos en la RL. Según Stojilkovic, la actividad espontánea en tirotropos no conduce a la secreción de TSH, admite que poco se conoce de la actividad espontánea de los tirotropos, y concluye que es posible que la actividad espontánea mantiene a los tirotropos (así

como a los gonadotropos y corticotropos) en un estado responsivo cerca del nivel umbral.¹⁴ Esto quiere decir que al presentarse actividad espontánea existe un influjo de Ca^{2+} a través de los canales VGCC abasteciendo los reservorios intracelulares, por consiguiente tras la estimulación con el agonista se cuenta con más Ca^{2+} para responder y muy probablemente mayor secreción de TSH.

Considero que la idea anterior respalda el resultado de la prueba de respuesta a diversas concentraciones de TRH en donde, en comparación con la RC, un mayor número de tirotropos de la RL respondieron ante el estímulo de TRH 0.1 nM. Probablemente esta población exprese más receptores a TRH, por lo cual considero sería interesante se realicen inmuntinciones para el receptor. Además, la intensidad máxima promedio de la respuesta en condición basal y baja concentración de TRH (0.1nM) fue significativamente mayor en esta misma región, sugiriendo que se alcanza una $[\text{Ca}^{2+}]_i$ más alta y con ello probablemente mayor secreción.

En cuanto a la respuesta a distinto número de exposiciones a TRH, la RC responde en mayor proporción a 1, 2 y 3 dosis; mientras que la RL lo hace a 4 dosis. Es probable que el mecanismo de tráfico del TRHR sea distinto entre ambas regiones, posiblemente en la RC es más lento y por tanto no están disponibles para responder a la siguiente estimulación; tal vez varíe la síntesis, disponibilidad y/o cantidad de TRHR. Se sugiere se realice un control de desensibilización del receptor. Este resultado difiere al observado por Rendón (2010) en lactotropos, pues reporta que en la RL hay más células que responden a una o dos dosis, que en la RC.¹⁶

En comparación con la RC, el área bajo la curva en todas las dosis fue significativamente mayor en la RL. Esto sugiere, que la movilización Ca^{2+} en la RL es mayor.

Sería interesante el aplicar herramientas de alta resolución temporal y espacial, como la microscopía de fluorescencia de reflexión interna total (TIRFM) o de onda evanescente, que permiten la obtención de imágenes selectivas de eventos que se llevan a cabo en o cerca de la membrana plasmática, como la exocitosis.⁸⁶ De esta forma, sería posible estudiar el movimiento tanto de las vesículas secretoras y la repoblación de los receptores a TRH en la membrana.

Me inclino a suponer que la disponibilidad de receptores y/o los elementos de señalización son distintos entre las células, sin embargo no con esto quiero alentar la idea, por ejemplo, de que algunos tirotropos carezcan de la capacidad para responder a bajas dosis. Comparto con Gracia-Navarro y colaboradores (2002) la idea de que es por la plasticidad secretora que se generan subpoblaciones celulares discretas, como las referidas en la RC y RL, pues de este modo al presentar componentes secretores y/o elementos de señalización distintos les permite a las células ajustar finamente sus dinámicas de respuesta ante un requerimiento hormonal específico⁸⁴.

Es permisible considerar que esta heterogeneidad en la respuesta pueda ser posible por la diferencia en la expresión de distintos elementos de señalización. Sería interesante evaluar estas

diferencias regionales en condiciones fisiológicas demandantes para los tirotrópos, como el hipo/hipertiroidismo, para estudiar la plasticidad secretora de la glándula.

Aunque este estudio se realizó en condiciones experimentales que preservan la arquitectura tisular mejor que en otros diseños experimentales, se deja de lado un componente importante como lo es el sistema vascular y las células asociadas a éste que participan en la regulación de las células endocrinas. El desarrollo de técnicas *in vivo* en el que se sumen estos componentes a los diseños experimentales, así como el uso de animales transgénicos que permiten visualizar tipos celulares; permitirá se realicen estudios más finos, que podrán integrar con mayor facilidad variables que ayuden a responder preguntas interesantes en relación a la hipófisis. Como Evans oportunamente dice:

La adenohipófisis es una glándula misteriosa, seductora, y útil.

Con base en los resultados obtenidos, resulta razonable suponer que ante un evento en el que se requiera una mayor secreción de TSH, como en el hipotiroidismo, la condición de plasticidad secretora ajustará la respuesta de las poblaciones de tirotrópos a TRH. Por ejemplo, en la RC podrían presentarse más eventos de actividad espontánea, respuesta a mayor número de exposiciones a TRH, así como mayor magnitud de la respuesta; en la RL posiblemente se incremente la proporción de células que exhiben una respuesta a TRH. El caso contrario podría ocurrir al presentarse un cuadro de hipertiroidismo, en donde se requiere disminuya la secreción de TSH.

Conclusión

En conclusión, en los tirotrópos existe una respuesta diferencial expresada por variaciones de calcio intracelular a TRH entre la región central y lateral de la glándula (Cuadro 1). El porcentaje de tirotrópos identificados en la adenohipófisis fue de 6%. En comparación con la RL, un mayor número de tirotrópos de la RC exhiben una respuesta de $[Ca^{2+}]_i$ ante el estímulo con TRH, pese a que el número de células positivas a TSH en esta región sea menor; al igual que responden en mayor proporción a una, dos y tres exposiciones de TRH. En comparación con la RC, un mayor número de tirotrópos de la RL presentan actividad espontánea, respuesta a baja concentración de TRH (0.1 nM) y a las cuatro dosis de TRH a las que fueron expuestas. Además, en esta misma región la intensidad máxima promedio de la respuesta de $[Ca^{2+}]_i$ producida a baja concentración de TRH y en condición basal, y el área bajo la curva en todas las dosis, fueron significativamente mayor.

Cuadro 1 Síntesis de resultados. Distribución y caracterización de la respuesta de $[Ca^{2+}]_i$ de tirocitos a TRH.

	Central	Lateral	Parámetro medido
	+	-	Células que exhiben respuesta de $[Ca^{2+}]_i$ a TRH normalizadas al área (μm).
	-	+	Células positivas a TSH normalizadas al área (μm).
0.1	-	+	Tirocitos que responden a diferentes concentraciones de TRH.
1	=	=	
10	=	=	
100	=	=	
1 dosis	+	-	Tirocitos que responden a distinto número de exposiciones a TRH.
2 dosis	+	-	
3 dosis	+	-	
4 dosis	-	+	
	-	+	Tirocitos con actividad espontánea.
Basal	-	+	Intensidad máxima promedio
0.1	-	+	
1	=	=	
10	=	=	
100	=	=	
0.1	-	+	Área bajo la curva promedio
1	-	+	
10	-	+	
100	-	+	

Referencias

1. Day, R.A. Cómo escribir y publicar trabajos científicos. Publicación Científica y Técnica No. 598 (Organización Panamericana de la Salud - The Oryx Press, Washington, DC, 2005).
2. Weissberg, R. & Buker, S. Writing up research : experimental research report writing for students of English (Prentice Hall Regents, Englewood Cliffs, NJ, 1990).
3. International Organization for Standardization. 10 (International Organization for Standardization, Switzerland, 2000).
4. Wilkinson, A.M. The scientist's handbook for writing papers and dissertations (Prentice Hall, Englewood Cliffs, N.J., 1991).
5. Evans, D. & Gruba, P. How to write a better thesis (Melbourne University Press, Carlton, Vic., 2002).
6. American Thyroid Association. in Press room (American Thyroid Association, Falls Church, VA, USA, 2011).
7. Fliers, E., Noppen, N.W., Wiersinga, W.M., Visser, T.J. & Swaab, D.F. Distribution of thyrotropin-releasing hormone (TRH)-containing cells and fibers in the human hypothalamus. *J Comp Neurol* **350**, 311-23 (1994).
8. Golden, S.H., Robinson, K.A., Saldanha, I., Anton, B. & Ladenson, P.W. Clinical review: Prevalence and incidence of endocrine and metabolic disorders in the United States: a comprehensive review. *J Clin Endocrinol Metab* **94**, 1853-78 (2009).
9. American Thyroid Association. in Public Health Statements (American Thyroid Association, Falls Church, VA, USA, 2008).
10. Hodson, D.J., Molino, F., Fontanaud, P., Bonnefont, X. & Mollard, P. Investigating and modelling pituitary endocrine network function. *J Neuroendocrinol* **22**, 1217-1225 (2010).
11. Dasen, J.S. & Rosenfeld, M.G. Signaling and transcriptional mechanisms in pituitary development. *Annu Rev Neurosci* **24**, 327-55 (2001).
12. Amar, A.P. & Weiss, M.H. Pituitary anatomy and physiology. *Neurosurg Clin N Am* **14**, 11-23, v (2003).
13. Yeung, C.M., Chan, C.B., Leung, P.S. & Cheng, C.H. Cells of the anterior pituitary. *Int J Biochem Cell Biol* **38**, 1441-9 (2006).
14. Stojilkovic, S.S., Tabak, J. & Bertram, R. Ion channels and signaling in the pituitary gland. *Endocr Rev* **31**, 845-915 (2010).
15. John S. Parks & Felner, E.I. in Nelson Textbook of Pediatrics (eds. Kliegman, R.M., Stanton, B.F., St. Geme III, J.W., Schor, N.F. & Behrman, R.E.) 1876 (W.B. Saunders - Elsevier, Philadelphia, USA, 2011).
16. Rendon, L. in Facultad de Ciencias 73 (Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., 2010).
17. Fauquier, T., Guérineau, N.C., McKinney, R.A., Bauer, K. & Mollard, P. Folliculostellate cell network: a route for long-distance communication in the anterior pituitary. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 8891-6 (2001).

18. Lafont, C. et al. Cellular in vivo imaging reveals coordinated regulation of pituitary microcirculation and GH cell network function. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 4465-70 (2010).
19. Taylor, W.A., Evans, N.P., Hertz, C. & Skinner, D.C. Intra-pituitary administration revisited: Development of a novel in vivo approach to investigate the ovine hypophysis. *J Neurosci Methods* (2011).
20. Low, M.J. in Williams textbook of endocrinology (eds. Melmed, S., Polonsky, K.S., Larsen, P.R. & Kronenberg, H.M.) 103-174 (Saunders/Elsevier, Philadelphia, USA, 2011).
21. Bonnefont, X. et al. Revealing the large-scale network organization of growth hormone-secreting cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 16880-5 (2005).
22. Hodson, D.J. et al. Coordination of calcium signals by pituitary endocrine cells in situ. *Cell Calcium*, (En prensa) (2011).
23. Ellestad, L.E. et al. Gene expression profiling during cellular differentiation in the embryonic pituitary gland using cDNA microarrays. *Physiol Genomics* **25**, 414-425 (2006).
24. Melmed, S. Pathogenesis of pituitary tumors. *Nat Rev Endocrinol* **7**, 257-266 (2011).
25. Bilezikjian, L.M. et al. Autocrine/paracrine regulation of pituitary function by activin, inhibin and follistatin. *Mol Cell Endocrinol* **225**, 29-36 (2004).
26. Wright-Pascoe, R. Endocrine disorders in a specialist hospital in Jamaica. *J Int Med Res* **38**, 1808-15 (2010).
27. Nillni, E.A. Regulation of the hypothalamic Thyrotropin Releasing Hormone (TRH) neuron by neuronal and peripheral inputs. *Front Neuroendocrinol* **31**, 134-156 (2010).
28. Melmed, S., Kleinberg, D. & Ho, K. in Williams textbook of endocrinology (eds. Kronenberg, H.M., Melmed, S., Polonsky, K.S. & Larsen, P.R.) 155-262 (Saunders/Elsevier, Philadelphia, USA, 2011).
29. Williams, G.R. & Bassett, J.H.D. Local control of thyroid hormone action: role of type 2 deiodinase. *J Endocrinol* **209**, 261-272 (2011).
30. Salinas, E. & Quintanar, J.L. Neurofilaments in thyrotrophs of hypothyroid rats: An immunohistochemical study. *Endocr Pathol* **11**, 195-200 (2000).
31. Roelfsema, F. et al. Thyrotropin secretion in mild and severe primary hypothyroidism is distinguished by amplified burst mass and basal secretion with increased spikiness and approximate entropy. *J Clin Endocr Metab* **95**, 928-934 (2010).
32. Matsushita, A. et al. Essential role of GATA2 in the negative regulation of thyrotropin beta gene by thyroid hormone and its receptors. *Mol Endocrinol* **21**, 865-884 (2007).
33. Kim, K.K., Park, K.S., Song, S.B. & Kim, K.E. Insulin represses transcription of the thyroid stimulating hormone beta-subunit gene through increased recruitment of nuclear factor I. *J Biol Chem* **285**, 32003-32011 (2010).
34. McNabb, F.M.A. The hypothalamic-pituitary-thyroid (HPT) axis in birds and its role in bird development and reproduction. *Crit Rev Toxicol* **37**, 163-193 (2007).
35. Szkudlinski, M.W., Fremont, V., Ronin, C. & Weintraub, B.D. Thyroid-stimulating hormone and thyroid-stimulating hormone receptor structure-function relationships. *Physiol Rev* **82**, 473-502 (2002).
36. Bassett, J.H.D. & Williams, G.R. Critical role of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis in bone. *Bone* **43**, 418-426 (2008).
37. de Lloyd, A., Bursell, J., Gregory, J.W., Rees, D.A. & Ludgate, M. TSH receptor activation and body composition. *J Endocrinol* **204**, 13-20 (2010).
38. Nikrodhanond, A.A. et al. Dominant role of thyrotropin-releasing hormone in the hypothalamic-pituitary-thyroid axis. *J Biol Chem* **281**, 5000-5007 (2006).

39. Chiamolera, M.I. & Wondisford, F.E. Minireview: Thyrotropin-releasing hormone and the thyroid hormone feedback mechanism. *Endocrinology* **150**, 1091-6 (2009).
40. Janssen, J.S. et al. A rexinoid antagonist increases the hypothalamic-pituitary-thyroid set point in mice and thyrotrope cells. *Mol Cell Endocrinol* **339**, 1-6 (2011).
41. Gereben, B. et al. Cellular and molecular basis of deiodinase-regulated thyroid hormone signaling. *Endocr Rev* **29**, 898-938 (2008).
42. Heuer, H. & Visser, T.J. Minireview: Pathophysiological importance of thyroid hormone transporters. *Endocrinology* **150**, 1078-83 (2009).
43. Boron, W.F. & Boulpaep, E.L. Medical physiology : a cellular and molecular approach (Saunders/Elsevier, Philadelphia, PA, 2009).
44. Patel, J., Landers, K., Li, H., Mortimer, R.H. & Richard, K. Thyroid hormones and fetal neurological development. *J Endocrinol* **209**, 1-8 (2011).
45. Zhang, J. & Lazar, M.A. The mechanism of action of thyroid hormones. *Annu Rev Physiol* **62**, 439-66 (2000).
46. Pinto, M., Soares, P. & Ribatti, D. Thyroid hormone as a regulator of tumor induced angiogenesis. *Cancer Lett* **301**, 119-26 (2011).
47. Cheng, S.Y., Leonard, J.L. & Davis, P.J. Molecular aspects of thyroid hormone actions. *Endocr Rev* **31**, 139-70 (2010).
48. Dumitrescu, A.M., Liao, X.H., Weiss, R.E., Millen, K. & Refetoff, S. Tissue-specific thyroid hormone deprivation and excess in monocarboxylate transporter (mct) 8-deficient mice. *Endocrinology* **147**, 4036-43 (2006).
49. Larsen, P.R., Davies, T.F., Schlumberger, M.-J. & Hay, I.D. in Williams textbook of endocrinology (eds. Kronenberg, H.M., Melmed, S., Polonsky, K.S. & Larsen, P.R.) 299-332 (Saunders/Elsevier, Philadelphia, USA, 2008).
50. Salvatore, D., Davies, T.F., Schlumberger, M.-J., Hay, I.D. & Larsen, P.R. in Williams textbook of endocrinology (eds. Melmed, S., Polonsky, K.S., Larsen, P.R. & Kronenberg, H.M.) 326-361 (Saunders/Elsevier, Philadelphia, USA, 2011).
51. Galas, L. et al. TRH acts as a multifunctional hypophysiotropic factor in vertebrates. *Gen Comp Endocrinol* **164**, 40-50 (2009).
52. Fliers, E., Unmehopa, U.A. & Alkemade, A. Functional neuroanatomy of thyroid hormone feedback in the human hypothalamus and pituitary gland. *Mol Cell Endocrinol* **251**, 1-8 (2006).
53. Sun, Y., Lu, X. & Gershengorn, M.C. Thyrotropin-releasing hormone receptors -- similarities and differences. *J Mol Endocrinol* **30**, 87-97 (2003).
54. Gershengorn, M.C. & Osman, R. Molecular and cellular biology of thyrotropin-releasing hormone receptors. *Physiol Rev* **76**, 175-91 (1996).
55. Duthie, S.M., Taylor, P.L., Anderson, L., Cook, J. & Eidne, K.A. Cloning and functional characterisation of the human TRH receptor. *Mol Cell Endocrinol* **95**, R11-5 (1993).
56. Boelen, A., Wiersinga, W.M. & Fliers, E. Fasting-induced changes in the hypothalamus-pituitary-thyroid axis. *Thyroid* **18**, 123-129 (2008).
57. Santos-Silva, A.P. et al. Neonatal nicotine exposure alters leptin signaling in the hypothalamus-pituitary-thyroid axis in the late postnatal period and adulthood in rats. *Life Sci* **87**, 187-195 (2010).
58. Romoli, R. et al. Expression of calcium-sensing receptor and characterization of intracellular signaling in human pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* **84**, 2848-53 (1999).

59. Petersen, O.H., Michalak, M. & Verkhatsky, A. Calcium signalling: Past, present and future. *Cell Calcium* **38**, 161-169 (2005).
60. Hollingworth, S., Gee, K.R. & Baylor, S.M. Low-affinity Ca²⁺ indicators compared in measurements of skeletal muscle Ca²⁺ transients. *Biophys J* **97**, 1864-72 (2009).
61. Catterall, W.A. Structure and regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels. *Annu Rev Cell Dev Biol* **16**, 521-55 (2000).
62. Bonnefont, X. Electrical activity in endocrine pituitary cells in situ: A support for a multiple-function coding. *FEBS Letters* **548**, 49-52 (2003).
63. Stojilkovic, S.S., Zemkova, H. & Van Goor, F. Biophysical basis of pituitary cell type-specific Ca²⁺ signaling-secretion coupling. *Trends Endocrinol Metab* **16**, 152-9 (2005).
64. Stojilkovic, S.S. & Catt, K.J. Calcium oscillations in anterior pituitary cells. *Endocr Rev* **13**, 256-80 (1992).
65. De Vries, L., Zheng, B., Fischer, T., Elenko, E. & Farquhar, M.G. The regulator of G protein signaling family. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **40**, 235-71 (2000).
66. Yu, R. & Hinkle, P.M. Desensitization of thyrotropin-releasing hormone receptor-mediated responses involves multiple steps. *J Biol Chem* **272**, 28301-7 (1997).
67. Vanderheyden, V. et al. Regulation of inositol 1,4,5-trisphosphate-induced Ca²⁺ release by reversible phosphorylation and dephosphorylation. *Biochim Biophys Acta* **1793**, 959-70 (2009).
68. Nowycky, M.C. Intracellular calcium signaling. *J Cell Sci* **115**, 3715-3716 (2002).
69. Ben-Jonathan, N. & Hnasko, R. Dopamine as a prolactin (PRL) inhibitor. *Endocr Rev* **22**, 724-63 (2001).
70. Ashworth, R. & Hinkle, P.M. Thyrotropin-releasing hormone-induced intracellular calcium responses in individual rat lactotrophs and thyrotrophs. *Endocrinology* **137**, 5205-12 (1996).
71. Hinkle, P.M., Nelson, E.J. & Ashworth, R. Characterization of the calcium response to thyrotropin-releasing hormone in lactotrophs and GH cells. *Trends Endocrinol Metab* **7**, 370-4 (1996).
72. Berridge, M.J., Bootman, M.D. & Roderick, H.L. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 517-29 (2003).
73. Bonnefont, X., Fiekers, J., Creff, A. & Mollard, P. Rhythmic bursts of calcium transients in acute anterior pituitary slices. *Endocrinology* **141**, 868-75 (2000).
74. Jones, B.W. & Hinkle, P.M. Subcellular trafficking of the TRH receptor: effect of phosphorylation. *Mol Endocrinol* **23**, 1466-78 (2009).
75. Jones, B.W., Song, G.J., Greuber, E.K. & Hinkle, P.M. Phosphorylation of the endogenous thyrotropin-releasing hormone receptor in pituitary GH3 cells and pituitary tissue revealed by phosphosite-specific antibodies. *J Biol Chem* **282**, 12893-906 (2007).
76. Gehret, A.U. et al. Role of helix 8 of the thyrotropin-releasing hormone receptor in phosphorylation by G protein-coupled receptor kinase. *Mol Pharmacol* **77**, 288-97 (2010).
77. Yu, R. & Hinkle, P.M. Signal transduction, desensitization, and recovery of responses to thyrotropin-releasing hormone after inhibition of receptor internalization. *Mol Endocrinol* **12**, 737-49 (1998).
78. Diaz, N., Huerta, I., Marina, N., Navarro, N. & Mena, F. Regional mechanisms within anterior pituitary of lactating rats may regulate prolactin secretion. *Endocrine* **18**, 41-6 (2002).
79. Boockfor, F.R. & Frawley, L.S. Functional variations among prolactin cells from different pituitary regions. *Endocrinology* **120**, 874-9 (1987).

80. Vila-Porcile, E. & Barret, A. Structural and functional differences between prolactin cells from the inner and outer zones of the male rat anterior pituitary. *Cell Tissue Res* **284**, 247-59 (1996).
81. Nagy, G.M., Boockfor, F.R. & Frawley, L.S. The suckling stimulus increases the responsiveness of mammotropes located exclusively within the central region of the adenohypophysis. *Endocrinology* **128**, 761-4 (1991).
82. Fauquier, T., Lacampagne, A., Travo, P., Bauer, K. & Mollard, P. Hidden face of the anterior pituitary. *Trends Endocrinol Metab* **13**, 304-9 (2002).
83. McArdle, C.A. & Evans, J.J. The circus in the pituitary. *Trends Endocrinol Metab* **12**, 429-30 (2001).
84. Gracia-Navarro, F. et al. Secretory plasticity of pituitary cells: a mechanism of hormonal regulation. *Arch Physiol Biochem* **110**, 106-12 (2002).
85. Nakane, P.K. Classifications of anterior pituitary cell types with immunoenzyme histochemistry. *J Histochem Cytochem* **18**, 9-20 (1970).
86. Burchfield, J.G., Lopez, J.A., Mele, K., Vallotton, P. & Hughes, W.E. Exocytotic vesicle behaviour assessed by total internal reflection fluorescence microscopy. *Traffic* **11**, 429-39 (2010).