



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Facultad de Ciencias**

**Biología experimental**

**CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA DE  $[Ca^{2+}]_i$  DE TIROTROPOS A  
TRH EN REBANADAS DE HIPÓFISIS DE RATÓN HEMBRA EN  
DIFERENTES FASES DEL CICLO ESTRAL**

**TESIS**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:**

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**PRESENTA:**

**Biol. Carlos Jesús Terrón de Alba**

**TUTORA PRINCIPAL DE TESIS:**

**Dra. Tatiana Fiordeliso Coll**

**Facultad de ciencias UNAM**

**COMITÉ TUTOR:**

**Dr. Charli Casalonga Jean Louis, IBT UNAM.**

**Dr. Cerbón Cervantes Marco Antonio, Facultad de Química UNAM.**

**MÉXICO, D.F.**

**MES AGOSTO, AÑO 2015**



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.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Facultad de Ciencias**

**Biología experimental**

**CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA DE  $[Ca^{2+}]_i$  DE TIROTROPOS A  
TRH EN REBANADAS DE HIPÓFISIS DE RATÓN HEMBRA EN  
DIFERENTES FASES DEL CICLO ESTRAL**

**TESIS**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:**

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**PRESENTA:**

**Biol. Carlos Jesús Terrón de Alba**

**TUTORA PRINCIPAL DE TESIS:**

**Dra. Tatiana Fiordeliso Coll**

**Facultad de ciencias UNAM**

**COMITÉ TUTOR:**

**Dr. Charli Casalonga Jean Louis, IBT UNAM.**

**Dr. Cerbón Cervantes Marco Antonio, Facultad de Química UNAM.**

**MÉXICO, D.F.**

**MES AGOSTO, AÑO 2015**



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
FACULTAD DE CIENCIAS  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OFICIO FCIE/DEP/413/15

ASUNTO: Oficio de Jurado

**Dr. Isidro Ávila Martínez**  
**Director General de Administración Escolar, UNAM**  
**Presente**

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **11 de mayo de 2015** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **Biología Experimental** del (la) alumno (a) **TERRÓN DE ALBA CARLOS JESÚS** con número de cuenta **304168167** con la tesis titulada "**CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA DE  $[Ca^{2+}]_i$  DE TIROTROPOS A TRH EN REBANADAS DE HIPÓFISIS DE RATÓN HEMBRA EN DIFERENTES FASES DEL CICLO ESTRAL**", realizada bajo la dirección del (la) **DRA. TATIANA FIORELISIO COLL**:

· Presidente: DRA. GERTRUDIS HORTENSIA GONZÁLEZ GÓMEZ  
Vocal: DR. LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA  
Secretario: DR. JEAN LOUIS CHARLI CASALONGA  
Suplente: DRA. LOURDES BASURTO ACEVEDO  
Suplente: DR. JUAN CARLOS GÓMORA MARTÍNEZ

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**Atentamente**  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"  
Cd. Universitaria, D.F., a 30 de junio de 2015

Dra. María del Coro Arizmendi Arriaga  
Coordinadora del Programa



MCAA/MJFM/ASR/gr\*

## *Agradecimientos*

**Agradezco al Posgrado en Ciencias Biológicas UNAM, por haberme otorgado la oportunidad de realizar la maestría en ciencias biológicas.**

**Agradezco, al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por haberme otorgado una beca durante la maestría CVU 508747.**

**Gracias a la Dra. Tatiana Fiordeliso Coll por la dirección de este trabajo de investigación.**

**Gracias al comité tutorial integrado por el Dr. Jean-Louis Charli Casalonga y el Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes quienes realizaron valiosas observaciones durante la realización de esta tesis.**

**Gracias a los sinodales Dra. Hortensia González Gómez, Dr. Luis Felipe Jiménez García, Dra. Lourdes Basurto Acevedo, Dr. Juan Carlos Gómora Martínez y Dr. Jean-Louis Charli Casalonga, quienes realizaron importantes observaciones y correcciones a este trabajo.**

**Finalmente agradezco a CONACyT (1666430) Y PAPIIT (IN222613), por el financiamiento otorgado al laboratorio el cual fue crucial para la elaboración de este trabajo de investigación.**

## *Dedicatorias*

**A mis padres quienes siempre han estado al pendiente de mi desarrollo personal, y que me acompañan en los buenos y malos momentos que asechan mi vida. Gracias por todo.**

**A Luisa, mi novia, quien nunca pierde la esperanza en mi y que durante este difícil camino me impulsó y motivó a seguir adelante ante cualquier circunstancia.**

**A mis grandes amigos de vida, Jonny, Christian-OL, Ale, Erick, David, Jack, Cris Agni, Angie, Hugo, Manwell, Ro, Rafa y León, quienes me han acompañado en los mejores momentos de mi vida, y que algunos en los peores. También agradezco a la gente bonita del laboratorio de ecología de ambientes limitantes, quienes me han cobijado y brindado un espacio en su laboratorio y me han permitido formar parte de su vida.**

**A la Familia De Alba y Terrón, especialmente a mi tía Ana de Alba (Anita) quien ocupa un lugar muy importante en mi vida, también a mis abuelos (Ana y Leo) quienes siempre están al pendiente de mi desarrollo personal y académico y a mi abuela Imelda donde sea que estés muchas gracias, yo se que me vigilas.**

**A Luis Rendón y Avelino Guardado, por aquellos buenos momentos fuera y dentro del laboratorio y también por aquellos viajes inolvidables que he tendió el honor de estar con ustedes, “gracias, sigamos adelante”. También quiero agradecer a la gente del laboratorio de Biofísica, quienes me apoyaron de diferentes maneras gracias Alicia, Hortensia, Araceli y Jaime**

**A mis amigos del laboratorio BL305, Tzitzí, Clau, Nicolas, Pedro y Daniel, quienes además de brindarme una amistad sincera y darme la oportunidad de conocerlos, me han apoyado y asesorado con diferentes dudas técnicas para mi desarrollo personal y mi trabajo de investigación. También no quiero dejar de dar un agradecimiento a “Lovely” Daniel, quien siempre me ha brindado una amistad peculiar pero muy sincera.**

**Y mucho agradecimiento a todas las personas que me brindaron su asesoría teórica y que no las menciono en este trabajo pero sin importar ello, siempre están presentes, Gracias.**

## Índice

<b>Agradecimientos</b> .....	<b>2</b>
<b>Dedicatorias</b> .....	<b>3</b>
<b>Abreviaturas</b> .....	<b>5</b>
<b>Resumen</b> .....	<b>6</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>7</b>
<b>Introducción</b> .....	<b>9</b>
<i>Desórdenes tiroideos</i> .....	9
<i>Eje Hipotálamo-Hipófisis-Tiroides</i> .....	9
<i>Hipófisis o glándula hipofisaria</i> .....	10
<i>Localización y distribución anatómica</i> .....	11
<i>Irrigación</i> .....	12
<i>Adenohipófisis</i> .....	14
<i>Regulación adenohipofisaria</i> .....	14
<i>Tirotropos</i> .....	15
<i>Hormona estimulante de la tiroides</i> .....	16
<i>Hormona liberadora de tirotropinas</i> .....	17
<i>Acción de las hormonas tiroideas en hembras</i> .....	18
<i>Estradiol y eje HHT</i> .....	19
<i>Receptor de TRH</i> .....	19
<i>Dinámica de Calcio intracelular</i> .....	20
<i>Ciclo estral</i> .....	22
<i>Rebanadas de glándula hipofisaria y tirotropos</i> .....	23
<b>Hipótesis</b> .....	<b>25</b>
<b>Objetivo general</b> .....	<b>26</b>
<i>Objetivos particulares</i> .....	26
<b>Materiales y métodos</b> .....	<b>27</b>
<i>Determinación de la fase del ciclo estral</i> .....	27
<i>Ovariectomía</i> .....	27
<i>Obtención de rebanadas de hipófisis</i> .....	28
<i>Registros de <math>[Ca^{2+}]_i</math> en rebanadas de hipófisis</i> .....	28
<i>Estimulación con TRH</i> .....	29
<i>Diferenciación entre lactotrofo y tirotrofo</i> .....	29
<i>Análisis de resultados</i> .....	29
<b>Resultados</b> .....	<b>32</b>
<i>Caracterización de la respuesta de <math>Ca^{2+}</math> de los tirotropos a TRH</i> .....	33
<i>Variación poblacional de los tirotropos</i> .....	35
<i>Actividad de <math>[Ca^{2+}]_i</math> en las diferentes condiciones fisiológicas</i> .....	36
<i>Área bajo la curva</i> .....	37
<i>Modificación de la sensibilidad de tirotropos a los estímulos de TRH</i> .....	38
<b>Discusión</b> .....	<b>40</b>
<b>Conclusión</b> .....	<b>48</b>
<b>Referencias</b> .....	<b>49</b>

## Abreviaturas

Eje Hipotálamo Hipófisis Tiroides.....	HHT
Hormona estimulante de la tiroides.....	TSH
Hormonas tiroideas .....	TH's
3,3',5-triiodotironina.....	T <sub>3</sub>
3,5,3',5'-tetraiodotiroxina.....	T <sub>4</sub>
Adenohipófisis.....	AH
Adenocorticotropina.....	ACTH
Hormona de crecimiento.....	GH
Prolactina.....	PRL
Tirotropina.....	TSH
Hormona luteinizante.....	LH
Hormona foliculo estimulante.....	FSH
Hormona liberadora de gonadotropinas.....	GnRH
Hormona liberadora de tirotropina.....	TRH
Hormona liberadora de corticotropina.....	CRH
Hormona liberadora de GH.....	GHRH
Receptor de TRH.....	TRH-R
Concentración de calcio intracelular.....	[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>
Receptor acoplado a proteínas G.....	GPCR
Inositol 1,4,5-trifosfato.....	IP <sub>3</sub>
Fosfatidilinositol 4,5-P <sub>2</sub> .....	PIP <sub>2</sub>
Diacilglicerol .....	DAG
Receptores de IP <sub>3</sub> .....	IP <sub>3</sub> -R
Proteína mitogenica cinasa.....	MAPK
Calcio ATPasa de sarco-retículo endoplasma.....	SERCA
17β-estradiol.....	E2
Ratón ovariectomizado.....	OVX

## Resumen

La hormona liberadora de tirotropina (**TRH**), estimula la síntesis y secreción de la hormona estimuladora de tirotropina (**TSH**) en la glándula hipofisaria, una vez que la TSH es liberada, estimula la liberación de las hormonas 3,3',5-triiodotironina (**T<sub>3</sub>**) y 3,5,3',5'-tetraiodotiroxina (**T<sub>4</sub>**) en la glándula tiroides, formando así el eje conocido como hipotálamo hipófisis tiroides (**HHT**). Previamente se ha demostrado que en ratas hembra, existe una gran influencia hormonal durante el ciclo estral, que altera la homeostasis de la glándula hipofisaria y las poblaciones de tirotropos, los cuales, durante el ciclo estral modifican su tamaño y forma.

Se sabe que los atributos anatómicos y fisiológicos de las diferentes poblaciones de células endocrinas de la glándula hipofisaria, están íntimamente relacionados con su distribución y conexión dentro del tejido, sin embargo los estudios existentes que han caracterizado la distribución y movilización de calcio intracelular (**[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>**) en tirotropos se han realizado en ratón macho, es por ello que este trabajo está enfocado en caracterizar la dinámica de **[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>** de los tirotropos de “ratón hembra” durante el ciclo estral, para ello se obtuvieron rebanadas “*ex-vivo*” en las diferentes fases del ciclo estral y condiciones de ovariectomía, a las que se les realizaron registros de la actividad de **[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>** en estado basal y ante diferentes estímulos de TRH.

Los resultados obtenidos, muestran que la dinámica de **[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>** de los tirotropos en las diferentes condiciones fisiológicas presentan variaciones importantes, tanto en el perfil de movilización de **[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>**, como en la cantidad de células que responden a TRH. Durante el ciclo estral se observó que en el estro, los tirotropos presentan un incremento en la movilización de **[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>**, mientras que en el diestro se presenta una tendencia al incremento poblacional de los tirotropos con respecto al resto de las distintas condiciones fisiológicas, estas modificaciones muestran la existencia de mecanismos de compensación ante diferentes condiciones fisiológicas.

## Abstract

The thyrotropin-releasing hormone (**TRH**) in the pituitary gland, stimulates the synthesis and secretion of the thyroid-stimulating hormone (**TSH**) which in turn stimulate the thyroid gland to release the hormones 3,3',5-triiodothyronine (**T<sub>3</sub>**) and 3,5,3',5'-tetraiodothyroxine (**T<sub>4</sub>**), this hormonal interaction generates an axis known as the hypothalamic-pituitary-thyroid axis (**HPT**). It has been shown previously in female rats the hormonal influence over the pituitary gland during the estrous cycle, altering the population of thyrotrophs both in form and function.

We now know, that the anatomical and physiological attributes of the different pituitary endocrine cell populations like thyrotrophs are closely related to the distribution and connection within the tissue, however previous researches only describes the intracellular calcium dynamics in thyrotrophs of rat males, for that reason in this study we focused in the intracellular calcium dynamic of thyrotrophs in "mice females" during the estrous cycle and ovariectomy condition, the experimental model for this research was based in perform pituitary slices during the different phases of the estrous cycle (n=5 per phase) and ovariectomy (n=3) and then compared the calcium activity in response of different stimuli of TRH.

Our results shown that the dynamic of intracellular calcium in the thyrotrophs at the different physiological condition, has important variations both duration and form of mobilization profile in function of the estrous cycle phase. During the estrous cycle we seen in the "estrous" phase an important change in the profile of the intracellular calcium mobilization, and during the diestrous phase we seen an increment of the thyrotrophs population in comparison to the other phases. Our data suggest the existence of homeostasis mechanisms who are very necessary to maintain the physiological condition in the pituitary gland during the estrous cycle.

## Introducción

### *Desórdenes tiroideos*

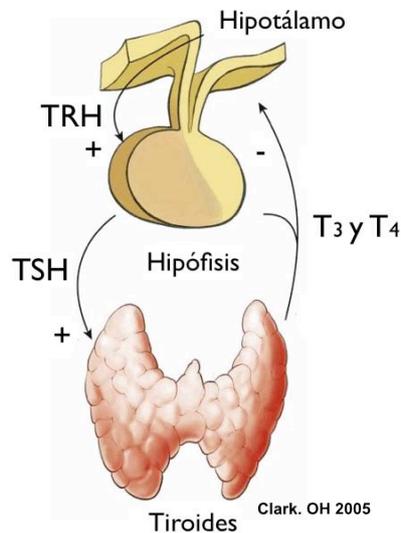
La glándula tiroides es un órgano endocrino que entre otras funciones está encargado de secretar hormonas tiroideas 3,3',5-triiodotironina (**T<sub>3</sub>**) y 3,5,3',5'-tetraiodotiroxina (**T<sub>4</sub>**), las cuales están relacionadas con el crecimiento y el metabolismo de lípidos y carbohidratos entre muchas otras funciones<sup>1</sup>. El correcto funcionamiento de esta glándula se puede ver afectado por diversas circunstancias, que van desde una mala alimentación, consumo de medicamentos, modificaciones en la expresión genética, hasta cambios fisiológicos como es el embarazo y el ciclo reproductivo en las mujeres, sucesos que pueden inducir deficiencias en la liberación de diferentes hormonas<sup>1,2</sup>.

Actualmente, las deficiencias tiroideas son un problema de salud pública a nivel mundial, ya que aproximadamente del 3 al 6% de la población mundial presenta algún desorden tiroideo (hipertiroidismo o hipotiroidismo) y no lo saben. Los padecimientos tiroideos tienen mayor incidencia en mujeres, de las cuales una de cada ocho presenta algún desorden tiroideo a lo largo de su vida<sup>3,4</sup>, es por ello que a estos padecimientos se les relaciona estrechamente con los cambios en los niveles hormonales, en particular con el estradiol; a pesar de que se tiene esta información acerca de los desórdenes tiroideos, las causas no están totalmente establecidas y todas las investigaciones realizadas para comprender más la dinámica de este órgano y la relación que tiene con el eje hipotálamo hipófisis tiroides (**HHT**) son de suma importancia<sup>1,3,4</sup>.

### *Eje Hipotálamo-Hipófisis-Tiroides*

El eje HHT (**Fig. 1**), está compuesto por tres diferentes órganos; hipotálamo, hipófisis y tiroides, los cuales constituyen un eje neuroendocrino, que está relacionado con el control de distintos procesos metabólicos<sup>5,6</sup>. La dinámica del eje HHT, inicia por una estimulación hormonal proveniente del hipotálamo a través de la secreción de la hormona liberadora de tirotrópina (**TRH**), que a su

vez estimula la liberación de la hormona estimuladora de tirotropina (**TSH**) en los tirotrópos de la glándula hipófisis. En consecuencia, la TSH estimula a la glándula tiroidea, para inducir la síntesis y secreción de las hormonas tiroideas (**TH's**), las cuales, a su vez al ser secretadas al medio inhiben la síntesis y secreción de TRH y TSH provenientes del hipotálamo y la hipófisis respectivamente, generando así un asa de retroalimentación negativa<sup>5,7,6</sup>.



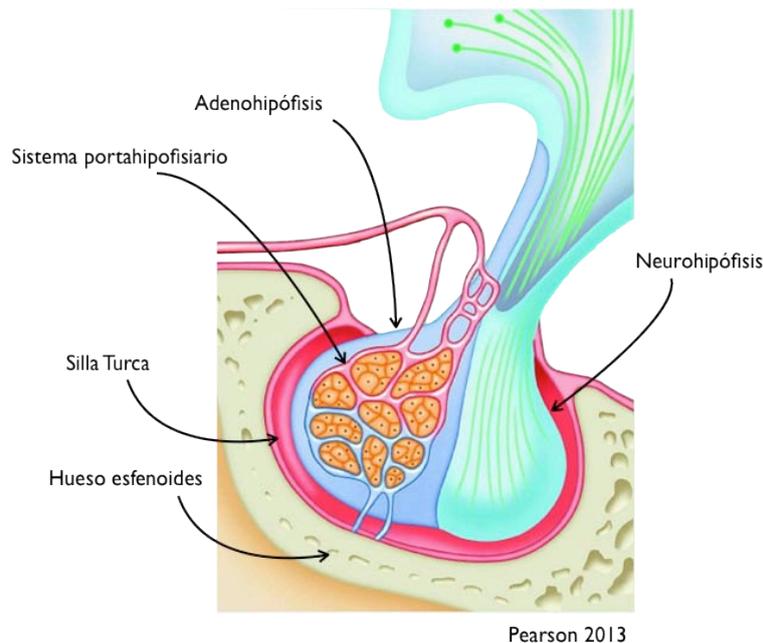
**Fig. 1** Esquema representativo del eje hipotálamo hipófisis tiroidea, el cual está compuesto por tres tejidos; hipotálamo hipófisis y tiroides. Este eje presenta una asa de retroalimentación positiva, comenzando su estimulación por el hipotálamo el cual secreta TRH que estimula la secreción de TSH de la hipófisis, esta hormona estimula a la glándula tiroidea para secretar hormonas tiroideas, formando así el asa de retroalimentación positiva dentro del eje HHT. Por otra parte al ser secretadas las hormonas tiroideas al medio, estas actúan como inhibidores de TRH y TSH, formando así el asa de retroalimentación negativa.

### *Hipófisis o glándula hipofisaria*

La hipófisis o glándula hipofisaria, es un órgano neuroendocrino, que en conjunto con el hipotálamo participa en diversas funciones endocrinas y no endocrinas, tiene la facultad de regular de manera positiva y negativa la secreción y síntesis de diferentes hormonas hipofisarias a través de la liberación de diversas neurohormonas, que actúan de manera directa sobre diferentes células y órganos blanco<sup>9,10</sup> que participan en una amplia gama de procesos metabólicos como: el crecimiento, desarrollo y reproducción. Cabe mencionar que también estas hormonas intervienen con diversas funciones del sistema nervioso<sup>9</sup>.

## Localización y distribución anatómica de la glándula hipofisaria

La glándula hipofisaria (**Fig. 2**) se localiza en la base de la cavidad craneal del hueso esfenoides sobre la silla turca, se comunica con el hipotálamo mediante el *tallo infundibular*. La glándula hipofisaria se ha dividido en dos entidades anatómicas (adenohipofisis y neurohipofisis), en función a la presencia de una lámina delgada de tejido conocida como lóbulo intermedio o *pars-intermedia* (cuando es tomado como parte de la neurohipófisis), la población celular predominante en este lóbulo son los melanotroopos, los cuales sintetizan a los precursores de la proopomelanocorticotropina ( $\beta$ -endorfina y  $\alpha$ -hormona estimulante de melanocitos)<sup>9,11,13,14</sup>.



**Fig. 2** Esquema de la localización y división, de la glándula hipofisaria. La imagen muestra que la glándula hipofisaria se localiza sobre el hueso esfenoides, en la silla turca. Esta glándula está dividida en dos entidades anatómicas; **Adenohipófisis** y **Neurohipófisis**, la primera presenta una red de capilares complejos que conforman el “sistema portahipofisario”, mientras que la segunda presenta principalmente una gran cantidad de terminaciones axónicas.

La neurohipófisis o lóbulo posterior de la glándula hipofisaria, se encuentra fusionado al lóbulo intermedio y se caracteriza por la presencia de fibras peptidérgicas neurosecretoras, que comunican al hipotálamo con la glándula hipofisaria, las cuales atraviesan por el tallo neural y finalizan en la *pars-intermedia*<sup>9,11,12</sup>. El lóbulo anterior, también conocido como adenohipófisis (**AH**),

es dividido en *pars-tuberalis* y la *pars-distalis*, la primera comprende una porción pequeña del lóbulo que adosa en forma de collar a la base del diencéfalo, la segunda es donde se encuentran las células endocrinas de la AH, encargadas de sintetizar y secretar hormonas que son liberadas al torrente sanguíneo y que estimulan a los diferentes órganos blanco<sup>5,9</sup>.

Las células endocrinas presentes en la AH, son clasificadas generalmente en dos familias o poblaciones; las poblaciones secretoras de hormonas proteicas (PRL, GH y ACTH) y las secretoras de hormonas glucoproteicas (TSH, LH y FSH)<sup>9,14</sup>.

### *Irrigación hipofisaria*

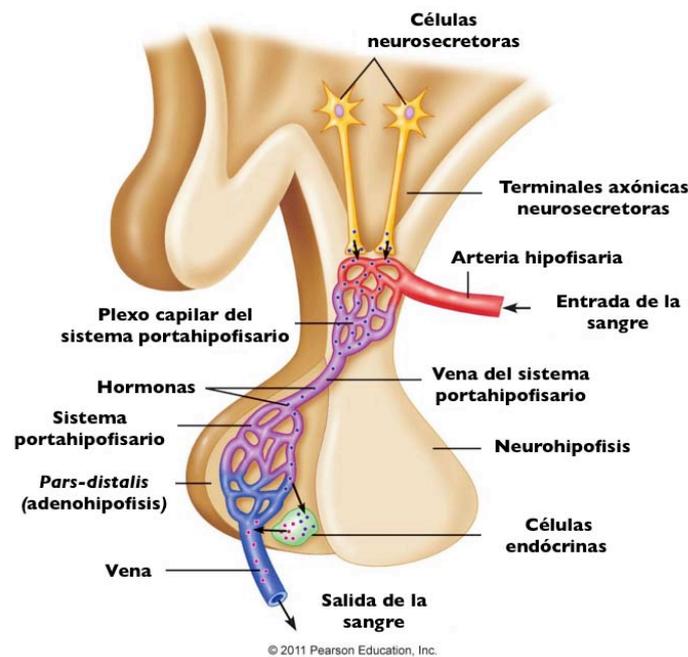
En la AH la irrigación sanguínea es crucial (**Fig. 3**), debido a que la sangre es la vía exclusiva por la cual las hormonas son enviadas a los diferentes órganos y/o tejidos blanco, ya sea dentro de la glándula o fuera de ella. La irrigación sanguínea de la AH está dada por el sistema portahipofisario, el cual está compuesto por dos lechos capilares intrincados uno en la parte externa de la eminencia media y otro en la AH<sup>9,11</sup>.

El flujo sanguíneo de la glándula hipofisaria (**Fig. 3**) sigue una dirección descendente, que comienza por la arteria hipofisaria superior la cual se capilariza y anastomosa dentro de la eminencia media, principalmente en la zona externa y en el extremo superior del tallo infundibular, dichos capilares constituyen el plexo capilar primario del sistema portahipofisario, que entra en contacto directo con múltiples terminales axónicas neurosecretoras del núcleo arcuato y núcleo paraventricular, posteriormente los capilares se unen mediante vasos porta largos, los cuales corren principalmente por la cara anterior del tallo infundibular donde se forma un plexo capilar secundario, que conecta por un sistema de vénulas la *pars-distalis* con la *pars-tuberalis* y desemboca en la circulación general<sup>11,16,17</sup>.

Las neurohormonas (inhibidoras y/o estimuladoras) provenientes del hipotálamo, son depositadas a la luz de los capilares de sistema portahipofisario a través de las

uniones axónicas, viajan en dirección descendente y actúan directamente sobre las diferentes poblaciones de células endocrinas de la AH<sup>7,9,11,15</sup>.

Las arterias que irrigan a la neurohipófisis provienen de la carótida interna, forman una red anular que rodea a la neurohipófisis y presenta una disposición hacia el plano medial, esta red capilar se ramifica en vasos capilares pequeños que entran en contacto directo con los axones provenientes del sistema supraóptico y núcleo paraventricular del hipotálamo. En la neurohipófisis también surgen pequeños vasos capilares que se adosan hacia la *pars-distalis*, zona en la cual se anastomosan con los capilares adenohipofisarios, conocidos como los vasos porta hipofisarios cortos<sup>11,16</sup>.



**Fig. 3** Irrigación sanguínea y ordenamiento de los capilares en la adenohipófisis. El ordenamiento de los capilares que forman el sistema “porta hipofisario” es de suma importancia, ya que este es el medio por el cual son secretadas diferentes hormonas tróficas que estimulan a las diferentes poblaciones de células endocrinas presentes en la adenohipófisis, y también a través del sistema porta hipofisario son secretadas hormonas hacia diferentes órganos blanco.

### *Adenohipófisis*

La AH está compuesta por cinco poblaciones de células endocrinas en diferentes proporciones, a estas células se les ha nombrado en función al tipo de hormona que secretan: Corticotropos (10%), células secretoras de adenocorticotropina

**(ACTH)**, Somatotropos (42%), secretan la hormona de crecimiento **(GH)**, Lactotropos (28%) secretores de prolactina **(PRL)**, Tirotropos (5%) secretores de tirotrópina **(TSH)** y Gonadotropos (15%) secretores de hormona luteinizante **(LH)** y hormona folículo estimulante **(FSH)** conocidas como gonadotropinas; dentro de la glándula también se presentan células relacionadas con la comunicación intercelular conocidas como células folículo estrelladas <sup>11,14,17</sup>.

### *Regulación adenohipofisaria*

A pesar de que la regulación de la AH está dada principalmente por hipotálamo no es exclusiva de este, también puede ser regulada por estímulos hormonales proveniente de diferentes tejidos y/o células blanco, que en respuesta a los estímulos recibidos, envían señales a la AH y que como resultado se genera una retroalimentación que puede ser negativa o positiva **(Tabla 1)**, un ejemplo claro de esto es el eje HHT, donde se induce la secreción de la TSH de la AH por acción del estímulo de las HT's<sup>7,11</sup>.

Los mecanismos autocrinos y paracrinos varían en función a los cambios fisiológicos que se presentan en el tejido y/o célula, es por ello que las poblaciones celulares presentan receptores específicos a diferentes moléculas que pueden modular su actividad de manera específica<sup>11</sup>. En la modulación de la glándula hipofisaria, el hipotálamo tiene un papel de suma importancia, ya que este se encarga de liberar hacia el sistema porta hipofisario factores estimuladores e inhibidores que actúan de manera rápida sobre la secreción y/o síntesis de diferentes hormonas en la glándula hipofisaria, algunos de estos factores son<sup>9,11</sup>:

- o Hormona liberadora de gonadotropinas **(GnRH)**, se encarga de estimular la liberación de LH y FSH <sup>9</sup>.
- o Hormona liberadora de tirotrópicas **(TRH)**, estimula la secreción de PRL y TSH <sup>9</sup>.
- o Hormona liberadora de corticotropina **(CRH)**, la cual induce la síntesis y liberación de ACTH <sup>9</sup>.

- o Hormona liberadora de GH (**GHRH**), que estimula la síntesis y liberación de hormona de crecimiento <sup>9</sup>.

**Tabla 1;** Función y porcentaje de los diferentes tipos celulares de la glándula hipofisaria y su relación con otros órganos.

Tipo celular	Porcentaje poblacional	Hormona trofica	Órgano blanco	Función
<b>Gonadotropos</b>	15%	Gonadotropinas ( <b>LH y FSH</b> )	Ovarios y Testículos	Relacionada con procesos reproductivos y secreción de hormonas sexuales
<b>Lactotropos</b>	28%	Prolactina ( <b>PRL</b> )	Glándula mamaria	Involucrada con la actividad lactogénica.
<b>Tirotropos</b>	5%	Tirotropinas ( <b>TSH</b> )	Glándula tiroides	Regula la secreción de TH's, involucrada con el metabolismo de lípidos y carbohidratos
<b>Corticotropos</b>	10%	Corticotropinas ( <b>ACTH</b> )	Glándula adrenal	Relacionada con la secreción y crecimiento de la corteza adrenal
<b>Somatotropos</b>	42%	Somatotropinas ( <b>GH</b> )	Hígado y tejidos adiposos	Regula el crecimiento y desarrollo

### *Tirotropos*

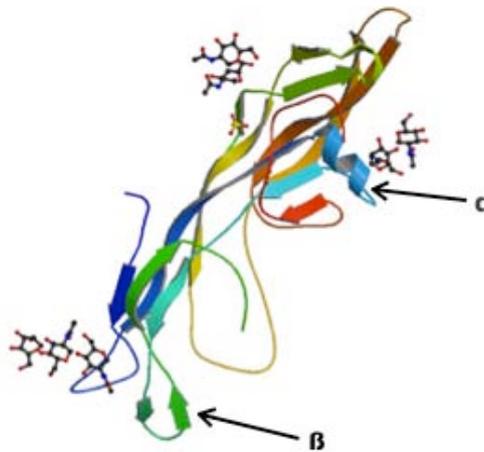
Los tirotropos ocupan el 5% de la población celular endocrina dentro de la AH, presentan una geometría ovalada o polimórfica y se encargan de sintetizar y secretar TSH, se les puede encontrar a partir del día 16.5 del desarrollo embrionario que es cuando ocurre la expresión del gen **Pit-1** (factor de transcripción específico en la glándula pituitaria). Los tirotropos se encuentran distribuidos dentro de la AH en pequeños grupos o aislados, su ontogénesis inicia en la región dorsal de la glándula hipofisaria y generalmente están ubicados en la zona media de la *pars-tuberalis* <sup>9,18,19</sup>.

### *Hormona estimulante de la tiroides*

La TSH u hormona liberadora de tirotropinas (**Fig. 4**) es una glicoproteína con un peso molecular de 28 a 30kDa, está compuesta por dos subunidades ( $\alpha$  y  $\beta$ ). La subunidad  $\alpha$  es característica de la familia de las hormonas glicoproteicas de la glándula hipofisaria, mientras que la subunidad  $\beta$  es específica para esta hormona,

por tanto el TSH pertenece a la familia de hormonas glicoproteicas y el papel fisiológico específico que presenta está relacionado con la estimulación diferencial de algunas funciones dentro de la glándula tiroides, como es el control de la secreción de TH's, organificación, producción y liberación de yodotironinas<sup>9,22</sup>.

La TSH se almacena en gránulos de secreción dentro de los tirotopos, su síntesis y secreción es estimulada por la interacción de la TRH con su receptor específico (**TRH-R1**) ubicado en la membrana<sup>9</sup>. Simultáneamente a la estimulación de la secreción de TSH se activan mecanismos de transcripción y post-transcripción, que inducen la síntesis de TSH <sup>9,19,21</sup>.

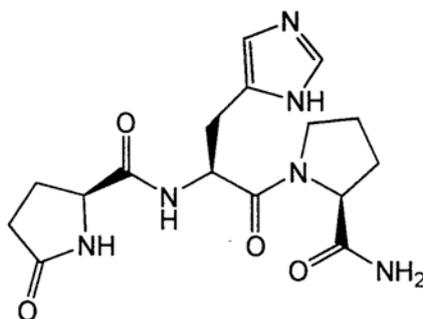


**Fig. 4** Esquema 3D de la estructura de la hormona liberadora de tirotropina, en este esquema se muestran las dos subunidades, " $\alpha$  y  $\beta$ ".

#### *Hormona liberadora de Tirotropina*

La TRH (**Fig. 5**) es un tripeptido (**pyro-Glu-His-ProNH<sub>2</sub>**) hipotalámico sintetizado en el núcleo paraventricular, dentro de la AH estimula la síntesis y liberación de TSH y PRL<sup>9</sup>. La síntesis de la TRH es resultado del procesamiento del pro-TRH (precursor de alto peso molecular), macromolécula que contiene cinco repeticiones de secuencias progenitoras<sup>9,28</sup>, la cual pasa por una serie de procesos enzimáticos en los que intervienen dos convertazas (**PC1/3 y PC2**) y múltiples intermediarios para su síntesis, una vez terminadas estas reacciones las secuencias de TRH sufren modificaciones postranccripcionales adicionales en el C y N terminal,

los eventos postraduccionales ocurren en la vía de secreción regulada en el transGolgi y en los gránulos de secreción<sup>29</sup>.



**Fig. 5** Esquema de la estructura química de la hormona liberadora de tirotropinas o TRH (**pyro-Glu-His-ProNH<sub>2</sub>**)

El estímulo de la TRH sobre los tirotrópos en la glándula hipofisaria, actúa como regulador positivo en la síntesis y secreción de TSH, este estímulo se genera de manera pulsátil y en promedio se secreta 0.6 mU/L con una frecuencia de 5 a 20 veces cada 24 horas siguiendo un ritmo circadiano que alcanza su nivel máximo de secreción durante la noche. Por tanto, debido a la baja amplitud de las pulsaciones, la variación de la secreción de TSH es moderada<sup>9,20</sup>.

Una vez sintetizada y almacenada en los gránulos de secreción la TRH es transportada, a través de los axones de las neuronas TRHérgicas, para ser liberada al sistema portahipofisario, cabe mencionar que a esta hormona se le ha encontrado en algunos otros órganos como por ejemplo en ovarios, testículos, placenta y retina<sup>29,30</sup>.

#### *Acción de las hormonas tiroideas en hembras*

Diversos trabajos sugieren que las TH's pueden interferir directa e indirectamente en funciones reproductivas, de desarrollo embrionario y de maduración sexual, dado que la función de los receptores de algunas hormonas como las gonadotropinas, PRL, TSH, pueden afectarse por efecto de las TH's.<sup>8,23-25</sup>.

La síntesis y secreción de las TH's está regida por la liberación de la TSH y TRH, es por ello que la captura de yodo en la glándula tiroides y su acoplamiento con las tiroglobulinas (macromoléculas precursora de TH's), depende principalmente del funcionamiento adecuado del eje HHT<sup>1</sup>. La liberación adecuada de las TH's también puede verse seriamente afectada, por causa de los cambios súbitos de las hormonas ováricas y en particular del estradiol **(E2)**, esta hormona tiene receptores en diferentes tejidos, principalmente en el endometrio y ovarios, durante el ciclo reproductivo los cambios en los niveles de E2 son radicales y pueden desencadenar alteraciones en los niveles de TH's en la sangre y por ende desórdenes fisiológicos que afectan directamente al eje HHT<sup>23,24</sup>.

### *Estradiol y eje HHT*

Poco se sabe acerca de los efectos específicos que ejerce la presencia de E2 sobre el eje HHT, a pesar de ello se ha observado que esta hormona tiene un fuerte efecto sobre dicho eje a nivel de hipófisis, afectando la respuesta a los estímulos de TRH<sup>18</sup>. Cuando los niveles de E2 se elevan en el plasma sanguíneo, se ha visto que la población de los tirotrapos se vuelve más sensible a los estímulos de retroalimentación negativa de las TH's <sup>26,27</sup>.

También se ha descrito que el E2 está relacionado con la modulación de la actividad de la enzima 3,3',5-triiodotironina deiodinasa enzima responsable de convertir T4 en T3, la cual ante la ausencia de estradiol disminuye y por tanto la síntesis de T3 también, alterando directamente la secreción pulsátil de TRH, y la síntesis de TSH en los tirotrapos, es decir que el asa de retroalimentación negativa presenta deficiencias<sup>23</sup>. Se ha reportado que al existir cambios en los niveles de estradiol, también se hacen presentes variaciones en los tirotrapos relacionadas con la morfología y tamaño así como una disminución en la cantidad de receptores de TRH expuestos en la membrana plasmática<sup>19</sup>.

### *Receptor de TRH*

El receptor a TRH (**TRH-R**), forma parte de la familia de los receptores de rodopsina y se localiza en la membrana plasmática de los tirotropos, aunque también se le puede encontrar en algunas otras células como los lactotropos, así como en diferentes partes del sistema nervioso central e inclusive en otros tejidos como por ejemplo el hígado, riñones y testículos<sup>9</sup>. El TRH-R presenta un amino terminal extracelular, siete dominios transmembranales hidrofóbicos y un carboxilo terminal intracelular con residuos Cys, acoplados a proteínas  $G\alpha_{q/11}$  (**GPCR**), por tanto el receptor al ser activado, desencadena una vía de señalización que involucra segundos mensajeros los cuales inducen la secreción y síntesis de TSH en los tirotropos<sup>9,31</sup>.

Del TRH-R se conocen dos isoformas, el **TRH-R1** y **TRH-R2**, el segundo no se encuentra en humanos. mientras que el TRH-R1 es exclusivo de la glándula hipofisiaria, por lo que al referirnos al TRH-R en la glándula hipofisaria, de aquí en adelante nos estaremos refiriendo al TRH-R1<sup>31,32</sup>.

Después de ser activado el TRH-R por su ligando, es rápidamente fosforilado ( $t_{1/2} \approx 15\text{sec}$ ) por moléculas de arrestina para ser internalizado de manera dependiente de "claritina-dinamina". Al ser internalizado el TRH-R se, activa una cascada de señalización, el lapso de tiempo que transcurre para ser nuevamente expuestos es de  $\approx 20\text{min}$ , aunque se sabe que el TRH-R en ocasiones puede ser reciclado por la célula y así ser expuesto inmediatamente en la superficie de la membrana plasmática<sup>31</sup>.

### *Dinámica de Calcio intracelular*

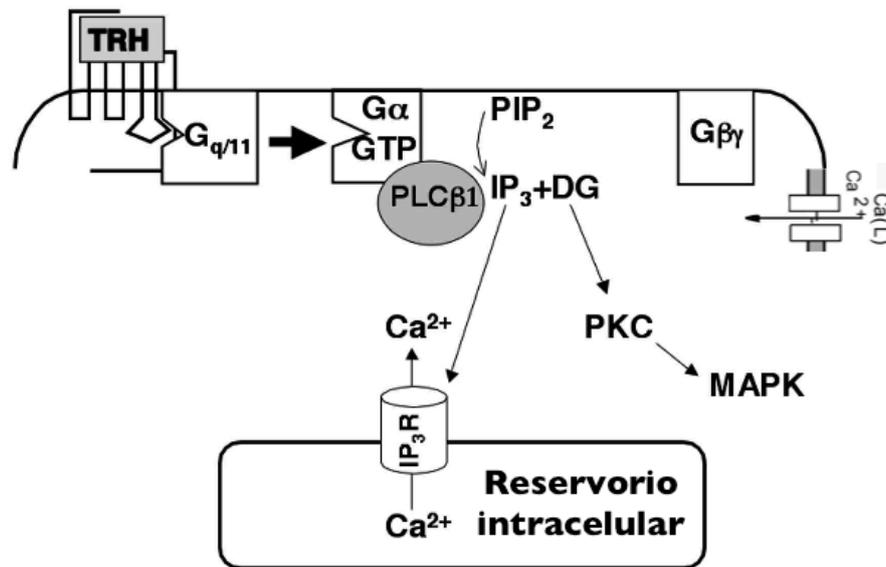
El ion calcio (**Ca<sup>2+</sup>**) es un catión divalente y un segundo mensajero muy importante, relacionado con la regulación de una gran variedad de funciones celulares tales como: la apoptosis, exocitosis y excitabilidad celular, entre muchas otras<sup>33</sup>. El Ca<sup>2+</sup> movilizado en el citoplasma proviene principalmente del medio

extracelular, su entrada es a través de canales iónicos, aunque no es la fuente exclusiva de  $\text{Ca}^{2+}$  ya que también la liberación de este catión hacia el citoplasma puede ser proveniente de diferentes reservorios intracelulares como el retículo endoplásmico y las mitocondrias. La forma en que los cambios de concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  regulan diferentes procesos celulares, varía en función a la duración, velocidad y amplitud con que ocurre el aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  en el citosol<sup>33,34</sup>.

Las células endocrinas de la glándula hipofisaria, también presentan actividad eléctrica y por tanto generan potenciales de acción que involucran la movilización de diversos iones. El potencial de acción está regido principalmente por los cambios de polaridad en la membrana por causa del movimiento de los iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ , los cuales inducen la movilización de otros iones a través de canales<sup>9,33</sup> entre estos otros iones está el  $\text{Ca}^{2+}$ , una parte de este catión es liberado por el retículo endoplásmico hacia el citosol y otra parte es movilizadada del exterior de las células hacia el citosol durante los potenciales de acción. En el caso de los tirotrópos los potenciales de acción pueden ser espontáneos o inducidos por estímulos hormonales (**Fig. 6**)<sup>33</sup>.

A pesar de que la TSH se puede liberar constitutivamente durante los potenciales de acción, no es la vía principal de liberación de esta hormona. La vía de liberación principal está dada por la interacción la TRH con el TRH-R, estimulando de manera indirecta un cambio de concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico mayoritariamente proveniente de los reservorios intracelulares. El aumento de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  inducido por secretagogos en los tirotrópos, sigue una vía de señalización de GPCR<sup>31</sup>; una vez que el TRH interactúa con el TRH-R y activa la vía de señalización por proteínas  $G_{q/11}$ , se activa a la fosfolipasa  $C_{\beta 1}$  (**PLC $\beta$** ) que hidroliza al fosfoinositol bifosfato (**PIP $_2$** ), liberando así diacilglycerol (**DAG**) e inositoltrifosfato (**IP $_3$** ). El DAG activa a la proteína cinasa C (regulada por la calcio-calmodulina), que incrementa la actividad mitogénica de las cinasas (**MAPK**) y la transcripción de los genes que codifican la síntesis de TRH<sup>31</sup>. El  $\text{IP}_3$  por otra parte, difunde a través del citoplasma y se une a su receptor específico (**IP $_3$ -R**) localizado en la superficie del retículo endoplásmico liso, induciendo así una liberación rápida de  $\text{Ca}^{2+}$  lo que se refleja en un aumento de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . El  $\text{Ca}^{2+}$  puede actuar como regulador positivo del receptor

de  $IP_3$ , pero a altas concentraciones de este ion ocurre una retroalimentación negativa promoviendo el cierre del receptor de  $IP_3$ , lo que limita el flujo de  $Ca^{2+}$  hacia el citosol<sup>31,33</sup>.



P. Hinkle 2012

**Fig. 6** Esquema de la secreción de TSH inducida por el TRH, sigue la vía canónica de receptores acoplados a proteínas G (GPCR). El TRH al interactuar con el TRH-R, receptor acoplado a proteína G, activa a la fosfolipasa que esta a su vez hidroliza al  $PIP_2$ , con esta hidrólisis libera dos segundos mensajeros ( $IP_3$  y  $DG$ ), una vez liberado el  $IP_3$  se une a sus receptores localizados en el RE, con lo que se ocasiona un incremento de  $Ca^{2+}$  que eleva a su vez la concentración de  $(Ca^{2+})_i$ . También Se sabe que el aumento de  $(Ca^{2+})_i$  es acompañado por la síntesis y secreción de TSH, que interactuará con los TRH-R localizados en la glándula tiroides.

También la liberación de  $Ca^{2+}$  de los reservorios hacia el citoplasma induce la activación de diferentes tipos de canales de  $Ca^{2+}$  dependientes de voltaje, como los son los canales de  $Ca^{2+}$  tipo-L (su activación es a los  $\approx -55mV$ ) y los canales de  $Ca^{2+}$  tipo-T (su activación es a los  $\approx -60mV$ ), hecho que ocurre durante la despolarización de la membrana y permite el flujo de  $Ca^{2+}$  extracelular hacia el citoplasma, y que también es necesario para que los reservorios de  $Ca^{2+}$  mantengan el volumen adecuado de este ion.

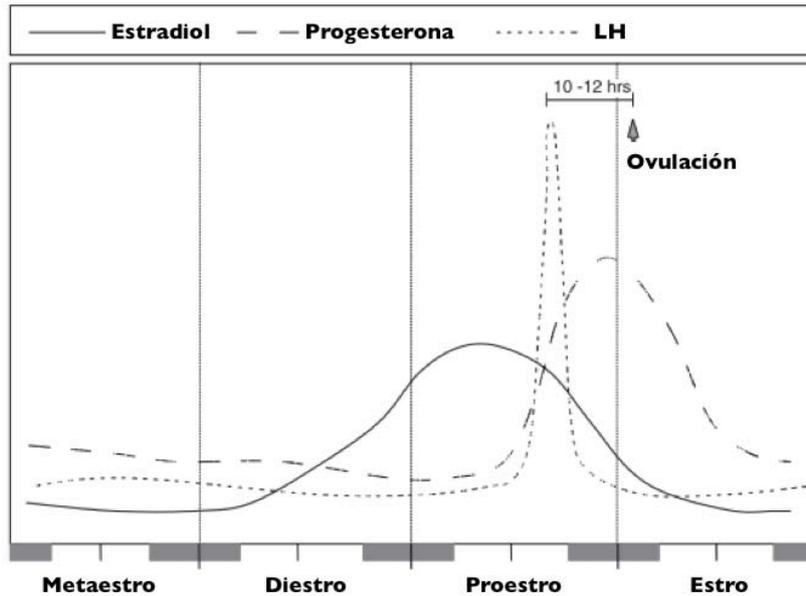
Como se ha mencionado previamente, la elevación de  $[Ca^{2+}]_i$  en tirotropos activa una amplia variedad de procesos celulares, pero hace falta mencionar que el perfil del aumento de  $[Ca^{2+}]_i$  ocasionado por la unión de TRH con su receptor, se puede dividir en la fase inicial que consiste en una elevación rápida, por a la liberación de

$\text{Ca}^{2+}$  de los reservorios intracelulares y la segunda fase consiste en una meseta sostenida, que gradualmente regresa a su estado basal esta segunda fase se debe a la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el exterior al interior, a través de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje<sup>31</sup>.

Debido a que existen pocas investigaciones en tirotropos, poco se sabe acerca del patrón, la frecuencia y amplitud de la movilización de  $\text{Ca}^{2+}$ , únicamente se ha descrito de manera general el tipo de respuesta que presentan los tirotropos ante los estímulos de TRH<sup>31</sup>. Es por ello que se vuelve interesante conocer si existe un perfil canónico de movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  o diferentes tipos de respuestas en la movilización de  $\text{Ca}^{2+}$ , y si estos se deben a estímulos de TRH a diferentes concentraciones o por diferentes condiciones fisiológicas (cambios hormonales), tales como las que se hacen presentes durante el ciclo estral.

#### *Ciclo estral*

El ciclo reproductivo también conocido como ciclo estral en roedores, tiene una duración aprox. de 4 a 5 días, en el cual ocurren variaciones hormonales de estrógenos, progesterona, hormona luteinizante y hormona foliculoestimulante (**Fig. 7**). A este ciclo se le ha dividido en cuatro fases diferentes que son: Estro, Proestro, Diestro y Metaestro; las fases son clasificadas en función de los cambios hormonales y proporción de diferentes células que pueden ser observadas mediante citologías vaginales. En estudios reproductivos, la citología vaginal se ha utilizado para determinar las diferentes fases del ciclo estral<sup>35</sup>



**Fig. 7** Imagen que muestra los cambios hormonales del ciclo estral en roedores, en el cual ocurren variaciones de estrógenos, progesterona, hormona luteinizante (LH) y hormona foliculoestimulante (FSH). Este ciclo tiene una duración aprox. de 4 a 5 días y se ha dividido en cuatro fases diferentes (Metaestro, Diestro, Proestro, y Estro) clasificadas en función a la citología vaginal, así como la secreción de las diferentes hormonas.

Se ha demostrado que las variaciones hormonales generadas a lo largo del ciclo estral, inducen en tirotropos cambios de tamaño, a los que se les relaciona estrechamente con las variaciones en los niveles de las hormonas ováricas, principalmente con el estradiol, el cual presenta grandes variaciones en lapsos cortos de tiempo ( $\approx 24h$ ) y que a pesar de que estos cambios son cortos tienen repercusiones serias sobre la morfología de los tirotropos<sup>18,27</sup>.

#### *Rebanadas de glándula hipofisaria y tirotropos*

En estudios previos del laboratorio de la Dra. Tatiana Fiordeliso se ha observado, que la dinámica de diferentes células endocrinas dentro de la glándula hipofisaria puede verse alterada cuando se estudia fuera de un contexto tisular íntegro, como es el caso de los cultivos celulares primarios que al romper el tejido se pierde el microambiente como por ejemplo las conexiones celulares existentes dentro del ambiente tisular.

Diferentes grupos de investigación se han enfocado en examinar la dinámica de algunos tipos celulares de la glándula hipofisaria dentro del contexto tisular y para ello han desarrollado técnicas con las cuales se logra preservar la integridad del tejido así como su regulación y coordinación entre la secreción hormonal y cambios fisiológicos, como es el movimiento de iones, por ejemplo el ion  $\text{Ca}^{2+}$ . Para mantener las condiciones tisulares se han utilizado preparaciones de rebanadas de hipófisis vivas, las cuales permiten estudiar las diferentes poblaciones celulares dentro del contexto tisular íntegro debido a que las interacciones célula-célula, célula-matriz así como su ubicación y distribución son preservadas <sup>17,37,38</sup>.

Los estudios sobre la dinámica de  $\text{Ca}^{2+}$  realizados hasta este momento se han enfocado en describir los patrones de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  en modelos de células aisladas en cultivos primarios y otra parte en cortes fijados los cuales sólo muestran cambios morfológicos. En este trabajo de investigación nos enfocamos en realizar una caracterización de la población de la dinámica de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  en tirotropos de ratón hembra en rebanadas de glándula hipofisaria. También es importante mencionar que los estudios realizados en rebanadas de glándula hipofisaria “*ex vivo*” se han enfocado en otros tipos celulares: gondotropos, somatotropos y lactotropos, por ello es que poco se sabe acerca de los tirotropos y su dinámica de  $\text{Ca}^{2+}$  dentro de su contexto tisular ante los estímulos por la aplicación del TRH, además de su relación con su entorno dentro de la glándula hipofisaria y los cambios hormonales que ocurren durante el ciclo estral y a los cuales actualmente se les relación con los desórdenes tiroideos suscitados en mujeres, debido a que se ha descrito que en otros tipos celulares de la glándula hipofisaria se ve alterada la secreción hormonal y la movilización de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ <sup>8</sup>.

## **Hipótesis**

La dinámica de  $[Ca^{2+}]_i$  de los tirotropos en respuesta a estímulos de TRH y su localización dentro de la adenohipofisis, presentará modificaciones dependiendo de la fase del ciclo estral de ratón (♀) en la que se encuentre .

## **Objetivo**

Caracterizar la distribución y señal de  $[Ca^{2+}]_i$  en los tirotropos ante el estímulo con TRH, mediante registros de fluorescencia durante las diferentes fases del ciclo estral y OVX en ratón.

## **Objetivos particulares**

Determinar el número de tirotropos que responden a diferentes dosis de TRH según su localización en la glándula.

Determinar la posible distribución de los tirotropos según su respuesta a TRH en las diferentes etapas del ciclo estral.

Caracterizar las variaciones en la dinámica de  $[Ca^{2+}]_i$  de tirotropos durante el ciclo estral, en condiciones basales y ante diferentes estímulos de TRH.

Identificar la posible influencia de estrógenos sobre la respuesta de  $[Ca^{2+}]_i$  de los tirotropos en condiciones basales y ante estímulo de TRH.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Determinación de la fase del ciclo estral.*

La determinación de la fase del ciclo estral de los ratones Balb-C de 2 meses de edad (n=5 por fase), fue obtenida mediante la elaboración de frotis vaginales, los cuales se realizaron 5 min antes de iniciar el registro de  $[Ca^{2+}]_i$ . Para la toma de la muestra de tejido vaginal, se empleó solución salina “Krebs Ringer” (125 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 2 mM CaCl, 1 mM MgCl, 26 nM NaHCO<sub>3</sub>, 1.25 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y 10 mM Glucosa), una vez obtenida la muestra, fue observada en un microscopio de contraste de fases (Leica DMIL), para determinar la fase del ciclo estral (Estro, Diestro o Proestro). Este método reconoce la fase del ciclo en base a la proporción de células observadas en un frotis vaginal: células epiteliales, células cornificadas y leucocitos.

- o **Proestro;** Se caracteriza por la presencia predominantemente de células epiteliales, sin embargo se pueden encontrar células cornificadas. Esta es una fase preovulatoria, en la que los niveles de estrógeno se elevan durante la noche y las gonadotropinas son secretadas, como consecuencia a esto ocurrirá la ovulación <sup>35,36</sup>.
- o **Estro;** Se caracteriza por la presencia de células cornificadas y epiteliales agrupadas. Los niveles de estrógeno permanecen elevados durante el día y posteriormente descienden a un estado basal durante la noche, no hay cambios en los niveles de las gonadotropinas <sup>35,36</sup>.
- o **Metaestro;** Se caracteriza por presentar una población heterogénea de leucocitos, células epiteliales y células escamosas, la concentración de estrógenos y las gonadotropinas se mantienen sin aumento <sup>35,36</sup>.

- o **Diestro;** En esta fase se encuentran predominantemente leucocitos. Los niveles de estradiol comienzan a elevarse, mientras que los niveles de gonadotropinas se mantienen bajos <sup>35,36</sup>.

### *Ovarectomía*

Con la finalidad de evaluar los efectos de la falta de E2, un grupo de ratonas Balb-C (n=3) de 8 semanas de edad, sexualmente maduras, fueron ovariectomizadas bilateralmente. El procedimiento quirúrgico fue realizado bajo condiciones asépticas y con anestesia general (Ketamina-Xilacina 5-15mg/1kg). Los ovarios fueron expuestos y extirpados. Durante la fase de recuperación de la anestesia fueron depositados en cajas con un foco de 60 W a una distancia de 30 cm. para mantener su temperatura corporal. Posteriormente los animales se mantuvieron en observación constante durante los 15 días siguientes para descartar una posible infección, los ratones se mantuvieron bajo un régimen de 12 horas de luz-oscuridad y alimentados *ad limitum*, al término de este tiempo los ratones fueron sacrificados y se extirpó la glándula hipofisaria a la que se le realizó el registro de la actividad de  $[Ca^{2+}]_i$ .

### *Obtención de rebanadas de hipófisis.*

Las ratonas fueron sacrificadas por decapitación con previa anestesia, para ello se empleó pentobarbital sódico (0.4ml/kg), posteriormente el cermito ebro fue removido e inmediatamente la glándula hipófisis fue extraída y embebida en agar al 5% (Invitrogen) en solución Krebs-Ringer. Una vez solidificado el cubo de agar, fue montado en un vibratomo (Leica VT 1000 S) y se obtuvieron rebanadas coronales de 130  $\mu$ m de grosor. Durante la obtención de rebanadas, la glándula se mantuvo en solución salina Krebs-Ringer a punto de hielo, con burbujeo de gas carbógeno (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) para mantener el pH a 7.4, lo que permite conservar el tejido viable. Una vez obtenidas las rebanadas, se mantuvieron en condiciones

controladas de temperatura (37°C) y con gas carbógeno, durante todo el registro por fluorescencia de la dinámica de  $[Ca^{2+}]_i$ .

#### *Registros de $[Ca^{2+}]_i$ en rebanadas de hipófisis.*

Para realizar los registros por fluorescencia de la actividad de  $[Ca^{2+}]_i$ , las rebanadas fueron incubadas con el indicador intensiométrico de calcio Fluo-4 AM (22.2  $\mu$ M) (Invitrogen) con 0.5% de ácido plurónico F-127 (Sigma-Aldrich) en solución Krebs-Ringer durante 30 minutos a 37°C, posteriormente se montaron en una cámara de registro, que fue recubierta previamente con poli-L-lisina hydrobromide (Sigma-Aldrich) al 20% para adherir las rebanadas a la superficie.

Una vez incorporado el sensor de  $Ca^{2+}$ , las rebanadas fueron lavadas con solución Krebs-Ringer y colocadas directamente en una cámara de registro sobre la platina de un microscopio estereoscópico (Leica M205 FA). Las rebanadas se mantuvieron perfundidas con solución Krebs-Ringer a una velocidad constante (1ml/min) y burbujeada con gas carbógeno.

Para medir los cambios en la intensidad de fluorescencia, se empleó un microscopio que cuenta con un sistema de iluminación que consta de una lámpara de mercurio conectada al microscopio. Para la excitación del Fluo-4 AM, se requiere una longitud de onda de 480 nm. La adquisición de las imágenes se realizó con una cámara digital CCD (Sensys), enfriada y controlada con el software "image Pro". La secuencia de imágenes constan de 300 imágenes, cada imagen fue tomada con un tiempo de exposición de 300 ms, cada 500ms con un delay de 200ms.

#### *Estimulación con TRH*

La estimulación de los tirotrópos fue realizada con el agonista TRH (Sigma-Aldrich) durante 30s, a través del sistema de perfusión en concentraciones crecientes de 0.1, 1, 10 y 100 nM, las cuales fueron aplicadas con un intervalo de

tiempo de 15 minutos (tiempo de lavado) con solución Krebs-Ringer entre una dosis y otra para evitar efectos acumulativos del agonista en el tejido.

### *Clasificación de lactotropos y tirotropos*

Dado que los tirotropos como los lactotropos pueden responder al estímulo con TRH, pero solo lactotropos presentan el receptor a dopamina, para poder discriminar entre estos dos tipos celulares, se aplicó una dosis de dopamina  $2\mu\text{M}$  (Sigma-Aldrich), a través del mismo sistema de perfusión, de manera que aquellos que no respondieron a dopamina fueron seleccionados como tirotropos. El protocolo consistió en 10 segundos de actividad basal, seguido de 30 segundos de estimulación con TRH  $100\text{nM}$ , y una dosis de dopamina  $2\mu\text{M}$  por 30 segundos seguida de una dosis de TRH  $100\text{nM}$ , finalmente se aplicó un lavado con solución Krebs-Ringer. Al final del registro se aplicó una dosis de KCl ( $140\text{mM}$ , Hepes  $10\text{mM}$  y  $\text{CaCl}$   $2\text{mM}$ ), para inducir un cambio en la polaridad de la membrana y asegurarnos de que la rebanada de glándula se encontraba viva durante todo el registro.

### *Análisis de resultados*

La selección de las células que responden a TRH y KCl en las secuencias de imágenes (películas) para su análisis, fue realizada en el Software Image J (NIH, USA) haciendo una selección de  $3 \times 3$  píxeles, escala que equivale a  $15\mu\text{m}$  (diámetro aprox de un tirotropo). De la selección de píxeles fueron extraídos los valores numéricos de los cambios de fluorescencia que reflejan la movilización de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  inducida por el estímulo del TRH, una vez obtenidos los valores numéricos se aplicó la operación matemática  $(F-F_0)$  es decir la sustracción del valor basal al resto de los valores de la escala de grises obtenidos, con el fin de eliminar el ruido de las películas, a este valor se le denomina  $\Delta F$ . obtenido mediante el software "Igor Pro" (las rutinas fueron escritas por el Dr. Pierre Fontanou), posteriormente fueron descartadas las respuestas espontáneas de aquellas respuestas inducidas por el estímulo de TRH, posteriormente a la selección de los datos para cada condición, fueron clasificados según su ubicación en la glándula.

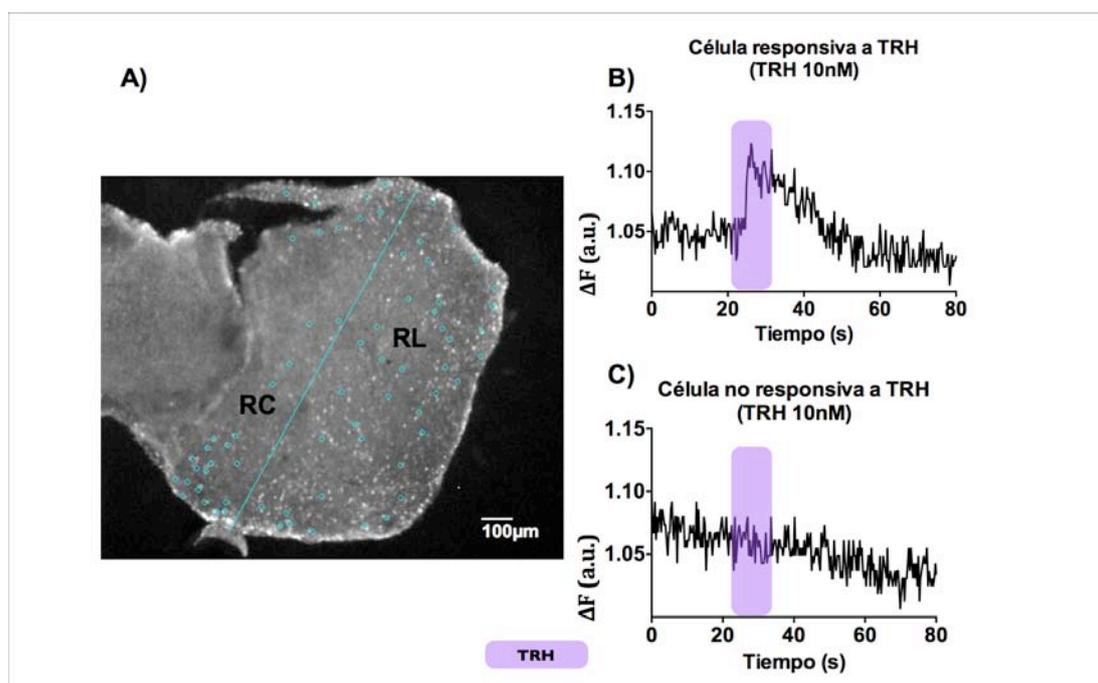
Una vez obtenida la selección y clasificación de tirotropos, fueron extraídos los datos numéricos de los cambios de fluorescencia de  $[Ca^{2+}]_i$  en cada condición experimental, fueron graficados y se obtuvo el valor de área bajo la curva,  $\Delta F_{Max}$  y número de tirotropos en cada experimento.

El área bajo la curva de los diferentes trazos de fluorescencia fue obtenida a través de una rutina escrita en MATLAB (The math-works, inc). Una vez obtenidos los datos, fueron comparados y se les aplicaron pruebas estadísticas paramétricas i.e ANOVA de dos vías con una prueba post hoc de Tukey (El límite de significancia se tomó con un valor  $p \leq 0.0001$ , con una  $R^2=0.05$ ), para comparar homogeneidad entre las réplicas del experimento y diferentes condiciones. La elaboración de las figuras y el análisis estadístico se llevó a cabo con el programa GraphPad Prism (GraphPad software, inc).

## Resultados

Para realizar el análisis de las células que responden a TRH en la rebanada viva de glándula hipofisaria, fueron seleccionadas aquellas células que mostraron cambios en las concentraciones de  $[Ca^{2+}]_i$  inducidas por la aplicación del agonista TRH y respondieron a la dosis final de KCl (**Fig. 8 A**)<sup>31</sup>.

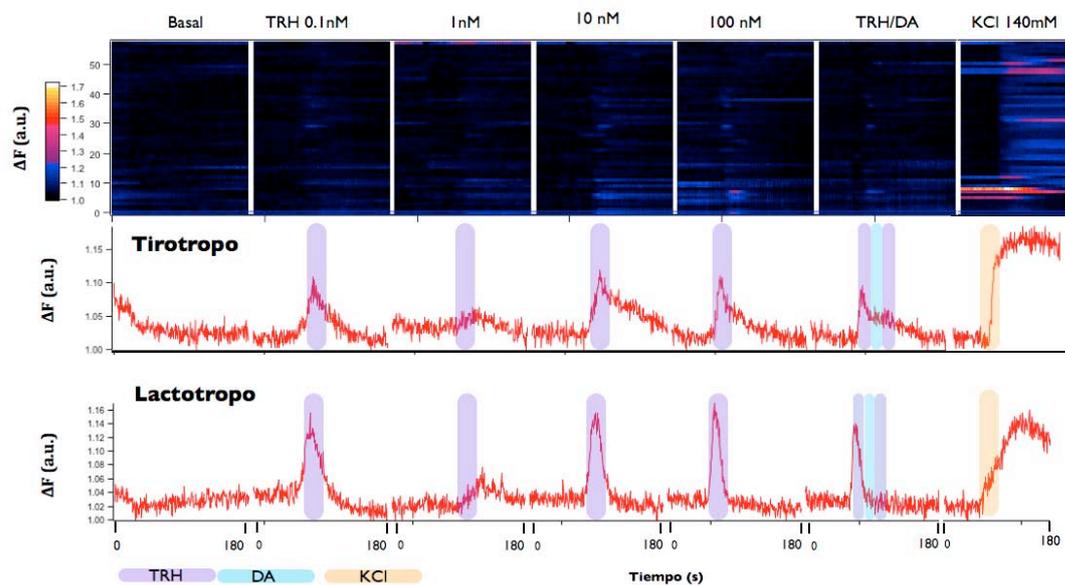
En la Figura 8 A) se muestra una imagen representativa de una rebanada de hipófisis, a la cual se le aplicó el protocolo de registro de actividad de  $[Ca^{2+}]_i$  descrito en los métodos. En la figura 8 A) se muestra cómo se realizó la selección individual (•) de las células que respondieron a los estímulos de TRH, así como la división de la glándula hipofisis en región central (**RC**) y región lateral (**RL**) que se empleó para realizar el análisis. En la glándula hay células que responden a TRH con un aumento de  $[Ca^{2+}]_i$  (**Fig. 8 B**) y células que no responden a TRH (**Fig. 8 C**), es por ello que se realizó una primera selección de células en función a los cambios en la intensidad de fluorescencia dados por los estímulos con TRH, la actividad de fluorescencia de las células seleccionadas fue graficada (**Fig. 8 B y C**).



**Fig. 8)** Micrografía de una glándula hipofisaria de 130μm de grosor, en la cual se observa la división en Región Central (RC) y Región Lateral (RL), también se muestra la selección de células (•) de 3x3 pixeles. **B)** Perfil de la actividad de  $[Ca^{2+}]_i$  de una célula responsiva a TRH. **C)** Actividad de  $[Ca^{2+}]_i$  de una célula que no responde a TRH.

## Caracterización de la respuesta de $Ca^{2+}$ de los tirotropos a TRH

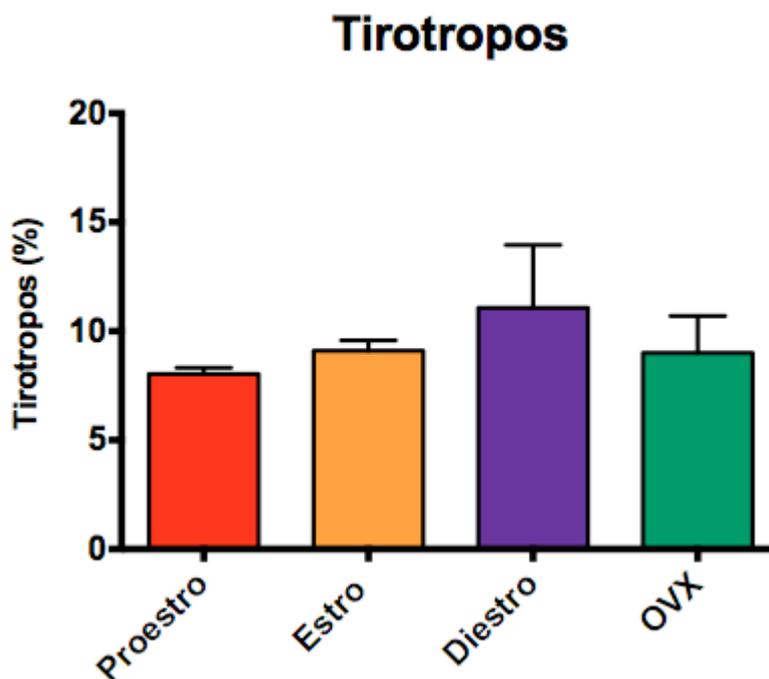
Para que una célula fuera clasificada como tirotropo, se tomaron en cuenta los siguientes criterios: 1) Responder al menos a una dosis de TRH, 2) no mostrar inhibición a la dosis de DA 2 $\mu$ M, y 3) presentar un perfil de movilización de  $[Ca^{2+}]_i$  más prolongado después de haber sido estimulado con TRH (**Fig.9B**). Es importante señalar que el perfil de movilización de  $Ca^{2+}$  en tirotrops ya ha sido caracterizado previamente con rata macho<sup>40-42</sup>. Sin embargo, existen dos tipos de celulares en la AH que responden a TRH que a diferencia de lo que ocurre en tirotropos, donde la respuesta a un estímulo de TRH es de tipo meseta, el perfil de movilización de  $[Ca^{2+}]_i$  por respuesta al estímulo de TRH es en forma de espiga (**Fig.9 B y C**) y sin embargo estos son inhibidos por dopamina. a partir de este momento nos referiremos como tirotropos a las células que responden a TRH y que cumplen los criterios para ser considerados como tirotropos, de acuerdo a lo descrito previamente.



**Fig. 9 A)** Gráfica de rastreo de la actividad de fluorescencia, de todas las células de una rebanada que presentaron respuesta al estímulo con TRH, en el eje X se grafica el tiempo (s), mientras que en el eje Y se grafica cada célula, del lado izquierdo se presenta una barra que indica la  $\Delta F$  en u.a. que va de negro (sin actividad) hasta el blanco (máxima actividad) y en la parte superior se indica la dosis de TRH aplicada. **B)** Gráfica de la actividad de fluorescencia de un tirotropo, durante un registro, en el eje X se grafica el tiempo, mientras que en el eje Y se grafica la  $\Delta F$  en u.a., esta célula respondió a diferentes dosis de TRH y durante la dosis de TRH/DA no mostró cambio en su dinámica de  $[Ca^{2+}]_i$  y finalmente se observa la respuesta a una dosis con KCl 140mM para asegurarnos de que la célula vivió durante el tiempo de registro. **C)** Gráfica la actividad de  $[Ca^{2+}]_i$  de un lactotropo que respondió a las diferentes dosis de TRH, y que durante la dosis de TRH/DA fue inhibida la actividad de  $[Ca^{2+}]_i$  por efecto de la DA y al final del registro la célula se encontraba viva.

### Variación poblacional de los tirotropos

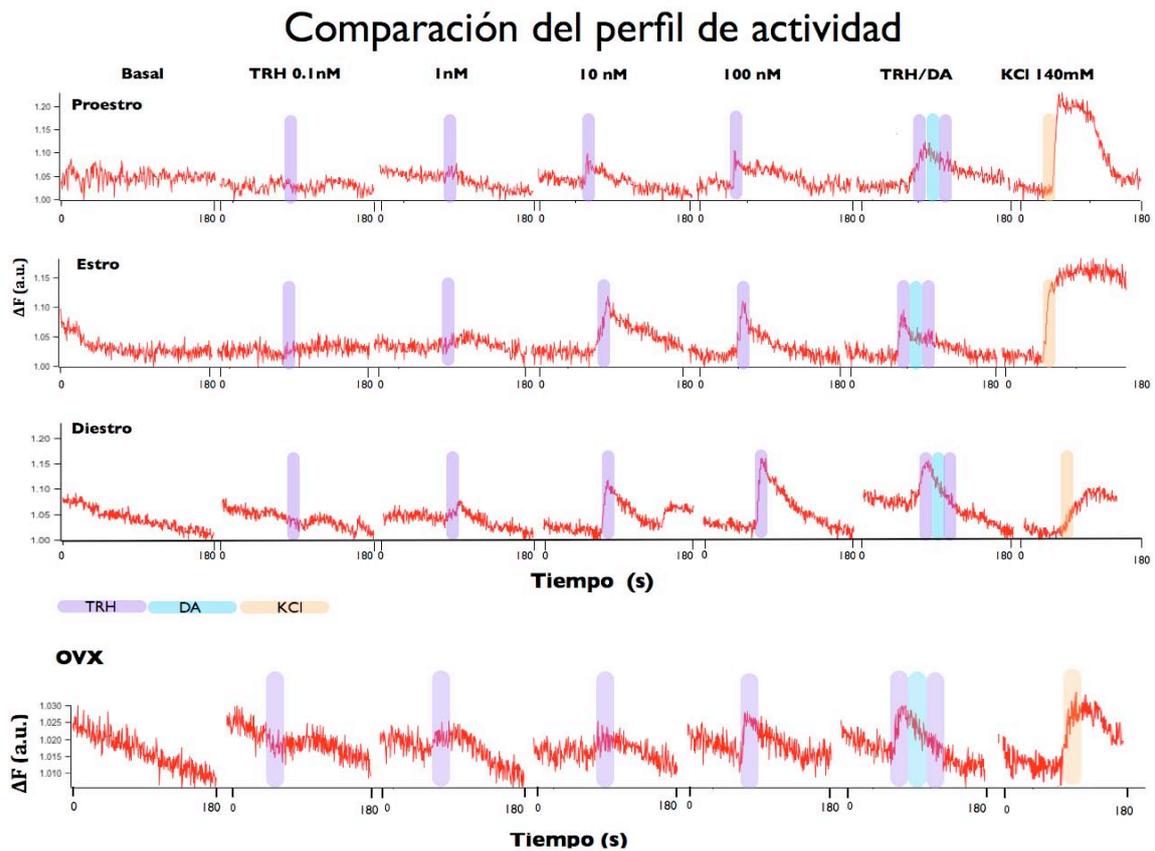
Con la finalidad de caracterizar en la AH la cantidad de tirotropos presentes en cada condición fisiológica (estro, proestro, diestro y OVX), se realizó un conteo del total de los tirotropos y de las células que respondieron a la dosis de KCl. Durante todas las fases del ciclo estral el porcentaje de células vivas que son tirotropos no mostró cambios, es decir se mantuvo constante el número de tirotropos en las diferentes condiciones fisiológicas: diestro ( $11.74 \pm 2.8$  EE), estro ( $10.12 \pm 0.89$ EE) y proestro ( $8.03 \pm 0.2$  EE) y OVX ( $9 \pm 2.9$  EE), a pesar de ello se puede observar una tendencia al aumento del porcentaje de tirotropos a lo durante el diestro, a estos resultados se les aplicó una ANOVA ( $P \leq 0.05$ ) de dos vías la cual indicó que no existen diferencias significativas entre las diferentes condiciones fisiológicas, es decir el que el porcentaje de tirotropos no se modifica significativamente en las distintas condiciones.



**Fig.10** Gráfica de barras del porcentaje y desviación estándar (DE) de tirotropos, normalizado al número total de células vivas (i.e. que responden a KCl)  $n=5$  (ciclo estral) y  $n=3$  (OVX). No se encontraron diferencias significativas entre las condiciones fisiológicas al aplicar una ANOVA de dos vías ( $P < 0.05$ ).

### Actividad de $[Ca^{2+}]_i$ de tirotropos en las diferentes condiciones fisiológicas

Una vez seleccionados los tirotropos, fueron comparados los perfiles de actividad de  $[Ca^{2+}]_i$  ante las distintas dosis de TRH y en las diferentes condiciones fisiológicas. El comportamiento de los tirotropos a lo largo del ciclo estral muestra diferencias en el perfil de movilización de  $[Ca^{2+}]_i$ , es decir que el tipo de respuesta no es similar en las diferentes fase del ciclo estral (**Fig.11**).

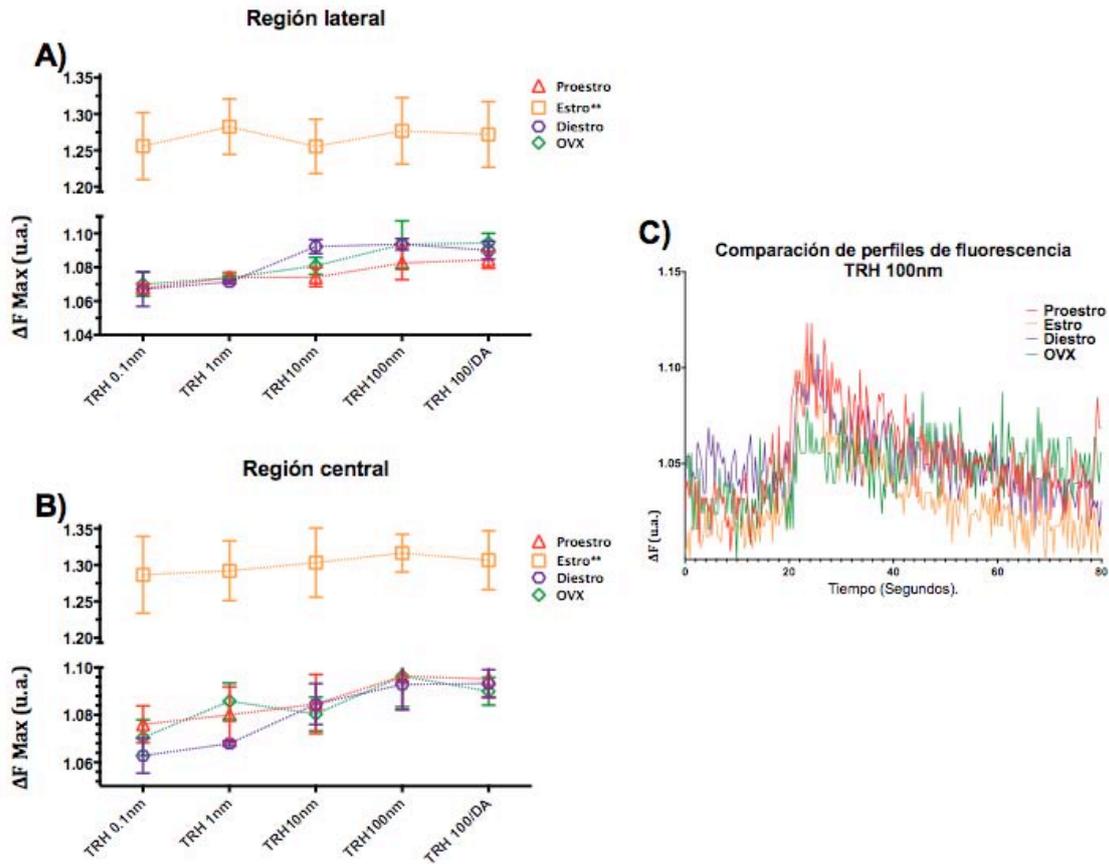


**Fig. 11** Comparación de la actividad de  $[Ca^{2+}]_i$  de tirotropos, en cada una de las fases del ciclo estral, OVX.. En cada gráfica se muestra el trazo de una célula representativa de una rebanada en las diferentes condiciones fisiológicas, sometida a un protocolo completo. Se puede apreciar que existen cambios tanto en el perfil de fluorescencia como en la sensibilidad en su respuesta al estímulo, en “X” se grafica tiempo, mientras que en “Y” se grafica la  $\Delta F$  (a.u).

Para comprobar que existen diferencias en la respuesta a TRH, en las diferentes condiciones fisiológicas, fue medida y comparada la movilización de  $[Ca^{2+}]_i$  y los cambios que hay en las diferentes condiciones fisiológicas y entre la región central y lateral de la glándula (**Fig. 12**). Los resultados muestran que durante el estro en ambas regiones se presentan las intensidades de fluorescencia ( $1.25 \pm 0.03$  u.a.), las cuales son mayores y presentaron diferencias significativas con respecto al resto

de las condiciones fisiológicas, de acuerdo a nuestro análisis estadístico (ANOVA de dos vías ( $P \leq 0.05$ )). Durante el proestro y diestro las intensidades de fluorescencia son muy similares ( $1.05 \pm 0.2$  y  $1.07 \pm 0.2$  u.a. respectivamente) tanto en la región central como en la lateral de la glándula hipofisaria.

Los tirotrópos mostraron tendencias a incrementar la intensidad máxima de fluorescencia en las diferentes condiciones fisiológicas, en función al aumento de la concentración de la dosis de TRH con el que fueron estimulados (**Fig. 12 A y B**). Las intensidades mayores de fluorescencia en la región central y lateral no presentan diferencias estadísticas. Para el caso del grupo de OVX se observa una respuesta similar en función al aumento de la dosis de TRH el cual es comparable respecto al diestro y proestro (**Fig. 12 A y B**), en el grupo de OVX no se presentaron cambios significativos en la intensidad de fluorescencia máxima entre las regiones central y lateral de la AH, de acuerdo a nuestro análisis estadístico (ANOVA de dos vías ( $P \leq 0.05$ )) (**Fig. 12 A y B**).

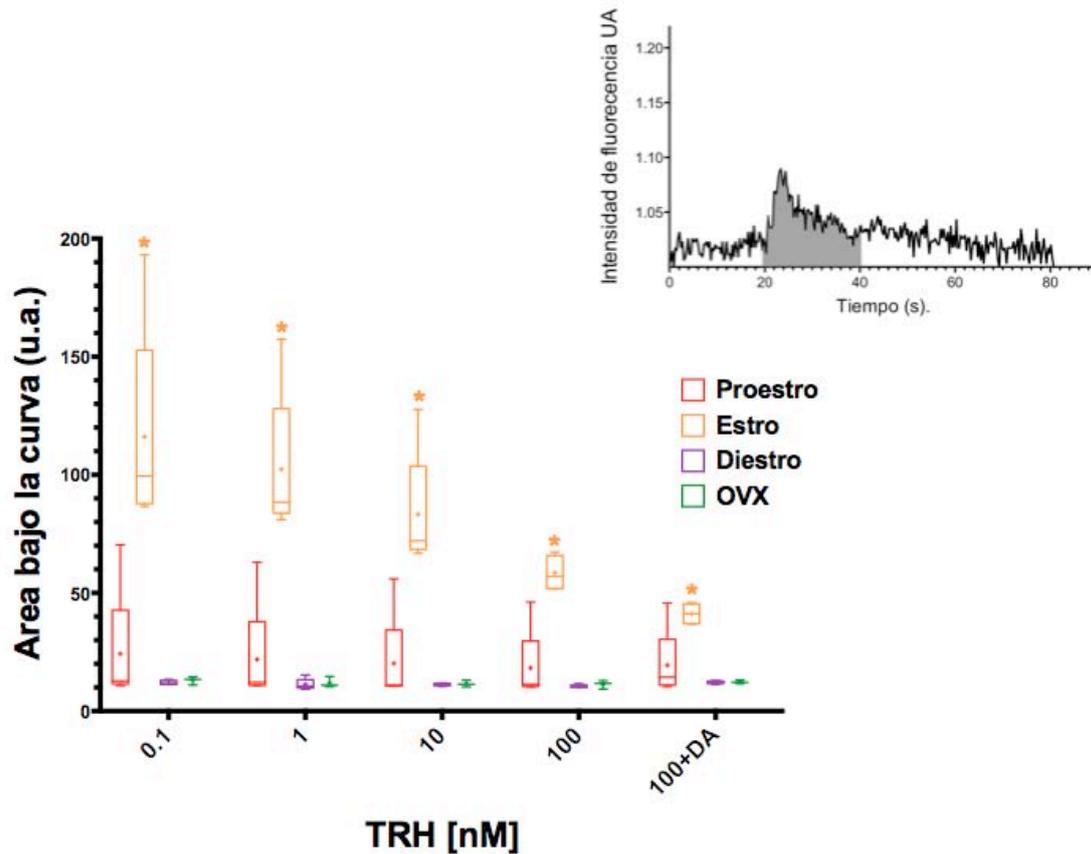


**Fig. 12** Comparación de la intensidad de fluorescencia máxima (pico máximo de fluorescencia) por la movilización de  $[Ca^{2+}]_i$ , entre las diferentes fases del ciclo estral y OVX. **A)** y **B)** Gráficas del parámetro de intensidad máxima de fluorescencia ( $n=5$  ciclo estral y  $n=3$  en OVX) en las diferentes condiciones ante los diferentes estímulos de TRH de la región central y región lateral, al cual se le aplicó una ANOVA de dos vías ( $P \leq 0.05$ ) donde se demostró que durante el estro existe un aumento significativo en la intensidad de fluorescencia tanto en región central como en lateral. **C)** Trazos representativos de cada condición, en "X" se grafica el tiempo y en "Y" la intensidad de fluorescencia (u.a.).

### Área bajo la curva

Una vez graficados los perfiles de fluorescencia de los tirotrópos producidos por los estímulos de TRH en las diferentes condiciones fisiológicas, se midió el área bajo la curva de cada una de las respuestas de  $Ca^{2+}$ , esta medida nos muestra indirectamente la cantidad de  $[Ca^{2+}]_i$  movilizado por los tirotrópos (**Fig 13B**), el área bajo la curva fue comparada entre condiciones fisiológicas y por concentración de TRH (**Fig 13A**). Los resultados nos muestran que durante el estro en los registro de fluorescencia asociados a  $Ca^{2+}$ , existe un incremento significativo de acuerdo al análisis estadístico (ANOVA de dos vías ( $P \leq 0.05$ )).

A lo largo de las diferentes dosis también se observó un incremento del área bajo la curva en el proestro, el cual no fue significativo pero mostró una tendencia al aumento del área bajo la curva, dicho aumento fue consistente a lo largo de las diferentes dosis de TRH aplicadas. En el caso de los tirotropos del grupo de “OVX” se observó una disminución del área bajo la curva respecto al estro y proestro, este resultado es consistente en las diferentes dosis de TRH.

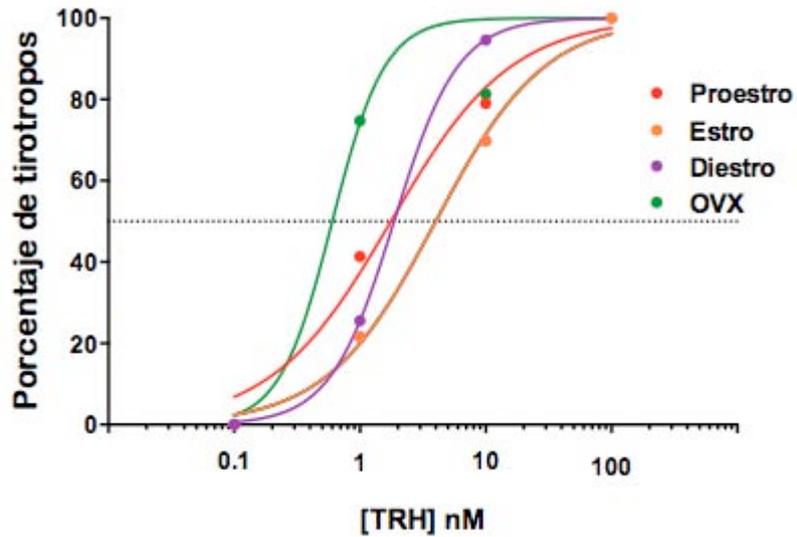


**Fig. 13** Medición del área bajo la curva de las respuestas de  $[Ca^{2+}]_i$  en tirotropos con diferentes estímulos de TRH bajo diferentes condiciones fisiológicas (ciclo estral y OVX), en el panel se muestra la comparación del área bajo la curva, de las diferentes condiciones fisiológicas, al cual se le aplicó una ANOVA de dos vías ( $P \leq 0.05$ ), la figura de la esquina superior ejemplifica de la forma en la que se midió el área bajo la curva en todos los trazos.

### *Modificación de la sensibilidad de tirotrapos a los estímulos de TRH*

La curva dosis respuesta (**Fig. 14**) fue construida con base al número total (100%) de tirotrapos que responden a las diferentes concentraciones de TRH, en el rango de 0.1 a 100nM de las diferentes rebanada de glándula hipófisis que fueron registradas. los resultados fueron normalizados para cada dosis de TRH, y se ajustaron a una curva dosis respuesta para las diferentes condiciones fisiológicas, obteniéndose así una curva promedio y la dosis efectiva 50 (ED50) (**Fig. 14**).

Encontramos heterogeneidad entre la tendencia de las curvas dosis respuesta en las diferentes fases del ciclo estral, A pesar de ello existe un cambio en la sensibilidad de los tirotrapos ante el estímulo de TRH en función a la fase del ciclo estral en la que se encuentren, por otra parte encontramos que existe una similitud en la sensibilidad al TRH entre el estro y el proestro, mientras que el grupo de OVX presenta un corrimiento en su sensibilidad, los resultados graficados muestran tendencias de aumento o disminución la sensibilidad de los tirotrapos por efecto del ciclo estral o condición de OVX, esto efectos se puede apreciar claramente con la ED50 (**Fig. 14**) de cada condición. El ajuste de la curva muestra a las células que responden desde la dosis más baja de TRH hasta la más alta. los cambios indican que los tirotrapos son más sensibles al agonista en función a la fase en la que se encuentren y que esta remodelación en la respuesta se relaciona directamente con las hormonas ováricas en particular el E2 que como mencionamos tiene importantes variaciones a lo largo del ciclo estral.



	Diestro	Proestro	Estro	OVX
ED50	0.8472	0.3731	0.5623	0.5623

**Fig. 14** Curva dosis respuesta de tirotrópos que respondieron a diferentes concentraciones de TRH. De cada grupo de datos (n=5 y n=3) se obtuvo el promedio y el número total de tirotrópos que responden a TRH lo cual fue normalizado y ajustado en una función logarítmica. En la gráfica se puede apreciar que la respuesta tiene un cambio en la sensibilidad al TRH a lo largo del ciclo estral y OVX, lo que indica que los tirotrópos se volvieron mucho más sensibles a algunas dosis de TRH bajas en función a la fase del ciclo estral en la que se encontraban, en la parte inferior se observa la dosis efectiva (ED50), donde se evidencian los cambios.

## Discusión

Actualmente los trabajos enfocados en describir la dinámica de  $[Ca^{2+}]_i$  en tirotropos, son pocos y los que existen se han realizado en cultivo primario<sup>42</sup>. Para este estudio nos apegamos a los trabajos de investigación de la Dra. P. Hinkle para identificar a los tirotropos, ya que este grupo ha logrado caracterizar su tipo de respuesta de  $[Ca^{2+}]_i$  ante el estímulo de TRH. El tipo de respuesta de  $[Ca^{2+}]_i$  obtenida en este trabajo no fue totalmente similar a la reportada previamente<sup>42</sup>, sospechamos que esto se deba al modelo experimental empleado en ambos estudios, para este trabajo utilizamos como modelo de estudio rebanadas de glándula hipofisaria, con las cuales se pretende mantener mayor integridad en el tejido y a su vez preservar las interacciones intercelulares y las condiciones de regulación paracrina y autocrina<sup>38</sup>. También fue importante tomar en cuenta la localización de los tirotropos dentro de la glándula ya que además de existir diferentes poblaciones de células endocrinas, se ha reportado que los tirotropos únicamente se localizan en una región cercana a la neurohipófisis y de acuerdo a la nomenclatura utilizada por el Dr. Andrés Quintanar<sup>43</sup>, se localizan en la región central, es por ello que dividimos la glándula hipofisaria en región central y región lateral. Es importante mencionar que ambas regiones fueron analizadas y encontramos que los tirotropos se distribuyen en ambas regiones, por lo que no solo se encuentran confinados en una región, resultado contrario a lo reportado previamente por la literatura<sup>9,43</sup>.

Las respuestas de  $[Ca^{2+}]_i$  en tirotropos obtenidas en este trabajo no son similares a las reportadas anteriormente (i.e. subida rápida acompañado de una meseta). Una explicación probable a este hecho, es que las condiciones experimentales son distintas, mientras que en las reportadas se emplearon cultivos de células de rata macho, en este trabajo se utilizamos rebanadas de ratones hembra, las cuales además están sujetas a cambios hormonales constantes a lo largo del ciclo estral y por tanto el eje HHT presentando remodelaciones constantes, que puede ocasionar alteraciones en los distintos niveles del eje y que en este caso nosotros los observamos a nivel de glándula hipofisaria<sup>35</sup>.

En este estudio nos planteamos como objetivo encontrar los cambios en la dinámica de  $[Ca^{2+}]_i$  ante el estímulo de TRH en el ciclo estral y en condiciones de OVX. Estudios previos realizados en preparaciones fijas de glándula hipofisaria en diferentes fases del ciclo estral y bajo condiciones experimentales como es la ovariectomía (OVX), muestran que la población de tirotrópos presenta cambios importantes en su tamaño, sin embargo poco se sabe acerca de su fisiología y en particular sobre la dinámica del  $[Ca^{2+}]_i$  ya que solo existen reportes realizados en modelos experimentales fijos<sup>18,27,44</sup>, lo que sí se sabe es que en otros tipos celulares de la glándula hipofisaria como los gonadotropos, los patrones de movilización de  $[Ca^{2+}]_i$  se ven seriamente alterados por efecto del ciclo estral, información que da pie a pensar que puede haber una remodelación similar en la población de los tirotrópos<sup>8</sup>. La importancia de este trabajo, es aportar una caracterización fisiológica y poblacional de los tirotrópos a lo largo del ciclo estral ante diferentes estímulos de TRH, y si esto tiene relación con el porcentaje poblacional de tirotrópos que responden durante las diferentes fases del ciclo estral, siendo el diestro donde se observa el mayor porcentaje de células que responden a TRH (11.074%) y el proestro el menor (8.03%), mientras que en la OVX (12.32%) (ver figura 11), cambios que posiblemente son causados por las hormonas ováricas y en particular por el E2, el cual se sabe que puede alterar seriamente la morfología de los tirotrópos<sup>18,27</sup>.

Partiendo de nuestros antecedentes pensamos que es sumamente importante evaluar los cambios a nivel fisiológico, relacionados por ejemplo con la sensibilidad de las células al agonista, los cuales evaluamos mediante el registro de  $[Ca^{2+}]_i$ <sup>42,38,27,18</sup>. Observamos que en las poblaciones de tirotrópos hay un cambio en el número de células que responden a los estímulos de TRH, y que en función a la fase del ciclo estral en que se encuentra el animal pueden ser más o menos sensibles. Estos cambios en el número de células pueden deberse no sólo a la presencia o ausencia de los tirotrópos, sino más bien a una remodelación fenotípica que altere la sensibilidad al TRH, ya que consideramos poco probable la posibilidad de que exista un proceso como la mitosis por el cual haya un mayor o menor número de células, esto debido a la rapidez en la que transcurre el ciclo estral, otra opción para explicar estos cambios en la sensibilidad es que

simplemente son células que no podemos ver dado que no responden al estímulo con TRH y sospechamos que este fenómeno más bien nos hablaría del cambio en la sensibilidad de las células, cuando se encuentran en un ambiente fisiológico cambiante como ocurren durante el ciclo estral. Estos cambios en la sensibilidad, podrían verse reflejados en el cambio de la dinámica de  $[Ca^{2+}]_i$  que obtuvimos (intensidad de fluorescencia o el área bajo la curva)<sup>38,27</sup>.

Una vez obtenidas las mediciones del porcentaje de tirotrapos y los picos máximos de fluorescencia, nos preguntamos, si existe una correlación con la área bajo la curva, ya que ambas son una medida indirecta de la cantidad de  $[Ca^{2+}]_i$  movilizado por los tirotrapos. Si observamos la gráficas del área bajo la curva y la intensidad de fluorescencia máxima en las diferentes condiciones, observamos que las condiciones que presentan mayor área bajo la curva son las mismas que presentan los picos máximos de fluorescencia mayores, esto nos habla acerca de la manera en que se moviliza el  $[Ca^{2+}]_i$  ante las diferentes condiciones fisiológicas<sup>8,42</sup>.

El  $[Ca^{2+}]_i$  movilizado en los tirotrapos en condiciones cambiantes y ante el estímulo con el TRH a diferentes concentraciones, muestran un mecanismo de modulación no sólo a lo largo del ciclo estral si no ante diferentes concentraciones de TRH<sup>8,38,27</sup>. Para el grupo de ratones OVX, las condiciones fisiológicas cambian totalmente ya que al retirar los ovarios se elimina la influencia hormonal dada por el ovario (lugar donde se produce el estradiol), en este grupo esperábamos encontrar cambios significativos en la respuesta a los estímulos de TRH, con respecto a los del ciclo estral y esto no fue así ya que las diferencias no fueron significativas, estos resultados no concuerdan totalmente con las investigaciones previas<sup>46</sup>, los cuales de la misma manera que nosotros comparan diferentes condiciones de ovariectomía y su efecto sobre el tamaño y morfología los tirotrapos, demostrando que los ratones ovariectomizados presentan cambios morfológicos de tirotrapos<sup>46</sup>, sin embargo sabemos que este efecto en el cambio de morfología no necesariamente debe reflejar un cambio fisiológico, ya que el aumento en tamaño puede ser producto de otra situación que no necesariamente modifique la dinámica del  $[Ca^{2+}]_i$ , también observamos que en el grupo OVX a nivel poblacional los tirotrapos son similares los del estro, fase en la que coincidentemente los

niveles de estrógenos se encuentran mucho más bajos respecto al proestro y diestro.

En el análisis de la curva dosis respuesta (**Fig. 14**), llama la atención en el incremento y decremento de la sensibilidad de TRH de los tirotrópos a lo largo del ciclo estral y en condiciones de OVX, resultados que nos llevan a pensar que más bien hay un cambio a nivel de ultraestructura, el cual concuerda con estudios previos realizados en ratas OVX y ratas OVX con tratamiento de estradiol<sup>46</sup>, en donde muestran evidencia de cambios morfológicos a nivel de ultra estructura con respecto a la condiciones fisiológicas como son los ratones macho y ratones hembra en diferentes fase del ciclo estral. Más allá de los cambios a nivel de tejido, se ha reportado <sup>47-49</sup> que los receptores de TRH se incrementan cuando los ratones son sometidos a tratamientos de estradiol, resultados que nos ayudan a explicar porque los tirotrópos tienen un cambio en su respuesta a TRH a lo largo del ciclo estral (**ver Fig 14**), es decir que la dosis efectiva varía en función de la fase del ciclo estral que se encuentra el ratón, mientras que en algunas fases como el proestro responden a bajas concentraciones de TRH en algunas otras fases como el diestro responde a dosis más altas (ver Fig 14).

Reportes previos muestran que en el hipotálamo la producción de TRH disminuye por efecto del estradiol<sup>50</sup>, hecho importante ya que esto muestra que hay una alteración a nivel de eje HHT que actúa como mecanismo de homeostasis por lo que si tomamos en cuenta que el estradiol cambia radicalmente a lo largo del ciclo estral, esto no sólo afecta la glándula hipofisaria sino que también actúa a nivel del hipotálamo y tiroides<sup>51</sup>. También se ha descrito que en condiciones de OVX con tratamiento de estradiol los niveles de TSH, T3 y T4 aumentan en el plasma debido a que se generan alteraciones en la secreción de las diferentes hormonas<sup>51</sup>, es por ello que si todo esto ocurre de manera simultánea se genera un cambio en la dinámica, no solo de los tirotrópos sino también en el eje HHT y sus asas de retroalimentación por causa del estradiol, por lo que es importante hacer mención que actualmente el E2 utilizado en tratamientos de reemplazo hormonal, en condiciones como la menopausia y que más que llevar el sistema a una estado de homeostasis, se podría estaría afectando fuertemente a todo el sistema y a todos

los ejes que tengan relación con los estrógenos, hechos que se puede apreciar a nivel de movilización de  $[Ca^{2+}]_i$  en los tirotropos.

Los cambios en la cantidad de receptores por efecto de exposiciones cortas de E2, nos podría indicar que los tirotropos responden diferencialmente a lo largo del ciclo estral debido a los cambios de estrógeno que no solo afectan la cantidad de receptores expuestos, sino que también pueden modificar la secreción de T3 y T4 a nivel de tiroides, así como una reducción en la producción de TRH a nivel de hipotálamo<sup>48-51</sup>, cambios que nosotros observamos a nivel de glándula hipofisaria como la alteración a la sensibilidad de TRH medida mediante la dinámica de  $[Ca^{2+}]_i$  en los tirotropos, es por ello que si se logra demostrar la existencia de estos cambios (número de receptores disponibles a TRH en tirotropos en las diferentes fases del ciclo, cantidad de TSH secretada a lo largo del ciclo, etc) a lo largo del ciclo estral, muy probablemente esto nos daría una primera aproximación acerca de por qué las mujeres tienen una mayor susceptibilidad al presentar desórdenes y/o patologías relacionadas con los desórdenes tiroideos y disfunciones del eje HHT.

En este sentido, sería importante poder ver si estos cambios en la movilización de  $[Ca^{2+}]_i$  están relacionados con los cambios en la secreción de la TSH, a lo largo del ciclo estral ya que se sabe que cuando hay una movilización de  $[Ca^{2+}]_i$  esta puede estar relacionada con una liberación de TSH. En este trabajo no podemos saber si existe una secreción diferente respecto a las otras fases del ciclo estral ya que aún no existe información sobre las variaciones en la concentración de TSH a lo largo del ciclo estral, sin embargo de lo que sí se generó información preliminar, fue para demostrar que existen variaciones durante el ciclo estral tanto a nivel de sensibilidad poblacional como en cantidad de  $[Ca^{2+}]_i$  movilizado.

El cambio en la sensibilidad de los tirotropos a estímulos de TRH, también podría estar relacionado con la cantidad de los receptores de TRH disponibles en la membrana plasmática de los tirotropos a lo largo del ciclo estral. Cabe destacar que en este trabajo no medimos la cantidad de receptores a TRH en las diferentes condiciones fisiológicas o bien entre las regiones centrales y laterales de la glándula, pero consideramos que sería interesante realizar una medición de la

cantidad de receptores de TRH en las diferentes condiciones fisiológicas y de esta manera, saber si realmente existen cambios en la cantidad de receptores para relacionarlo con los cambios en la sensibilidad de las células.

Es por ello que nuestro estudio aporta información complementaria a lo reportado por las investigaciones existentes<sup>18,27,44</sup>, generando una primera aproximación a lo que se refiere a función y dinámica de  $[Ca^{2+}]_i$  de tirotropos ante los cambios suscitados por efecto de la exposición a diferentes ambientes fisiológicos del tejido en condiciones vivas y cercanas a las fisiológicas normales.

También los resultados obtenidos muestran que la población de tirotropos se ve desequilibrada, de manera tal que modifican su sensibilidad. En nuestros resultados esto se ve reflejado como cambios en la intensidad de fluorescencia y movilización de  $[Ca^{2+}]_i$  ante los estímulos de TRH a diferentes concentraciones, debidos a los cambios fisiológicos suscitados durante el ciclo estral<sup>18,27</sup>, de acuerdo a lo descrito en diferentes investigaciones<sup>18,27,44</sup> se propone que el ciclo estral es un factor que modifica el entorno y condiciones fisiológicas que rodean a los tirotropos. Fenómeno que se observa claramente durante el estro que es cuando se presentan las mayores intensidades de fluorescencia y las mayores áreas bajo la curva, con respecto al resto del ciclo estral. Llama la atención este hecho, debido a que es en la fase del ciclo estral donde los niveles de estrógenos se encuentran más bajos<sup>35,36</sup>.

Con los grupos experimentales de ratones de OVX y estro, se determinó que el estradiol está directamente relacionado de alguna manera con las variaciones en la sensibilidad de los tirotropos ante los estímulos hormonales de TRH<sup>18</sup>, es decir que la manera en que los tirotropos responden al secretagogo se ve seriamente afectada, esta información complementa lo reportado y confirma que los estrógenos controlan diversos mecanismos como los que están relacionados con el incremento de tamaño y/o cambio de morfología de los tirotropos<sup>18,27,35,36</sup>, además de que estos resultado muestran que la ausencia de estradiol puede alterar los procesos fisiológicos en los tirotropos.

Es conveniente señalar que el patrón de señalización de  $[Ca^{2+}]_i$  reportado en tirotropos (subida rápida con meseta) no es un perfil canónico, por lo menos no en el caso de las ratonas hembra a lo largo del ciclo estral y bajo las condiciones fisiológicas de OVX. Los perfiles de movilización de  $[Ca^{2+}]_i$  obtenidos en este trabajo no son totalmente iguales a los descritos y que además este estudio demuestra que la dinámica de  $[Ca^{2+}]_i$ , por lo menos en el caso ratón hembra puede verse modificado por acción de los estrógenos, generando así un antecedente contundente para estudios posteriores relacionados con la sustitución hormonal, caracterización de la secreción de TRH y cambios poblacionales de los tirotropos y su importancia dentro del eje HHT.

## Conclusiones

- 1) Los tirotropos en ratón hembra se distribuyen a lo largo de toda la glándula, contrario a lo que se ha descrito en trabajos previos los cuales hablan sobre su exclusividad a una región.
- 2) Existen cambios en la movilización de  $[Ca^{2+}]_i$ , a lo largo del ciclo estral y en condiciones de OVX, que muestran que los niveles de estradiol a lo largo del ciclo estral tienen influencia sobre la dinámica de  $[Ca^{2+}]_i$  en los tirotropos.
- 3) Hay variaciones importantes en el número de tirotropos que responden a las diferentes dosis de TRH, en las condiciones de OVX y ciclo estral.
- 4) La cantidad de  $[Ca^{2+}]_i$ , que se moviliza en los tirotropos a lo largo del ciclo estral, se modifica en función a la fase que se encuentre.
- 5) La concentración de TRH, a la que son expuestos los tirotropos para llegar a ser dosis efectiva varia en función a la fase del ciclo estral en la que se encuentren los tirotropos, hecho que muestra la existencia de mecanismos de homeostasis relacionados con los cambios fisiológicos.
- 6) La sensibilidad de los tirotropos al TRH cambia por efecto del ciclo estral, lo cual indica que los estrógenos pueden regular e inducir cambios importantes en la dinámica de  $[Ca^{2+}]_i$  de los tirotropos.

## Referencias

1. Wondisford, F. E. & Radovick, S. *Clinical Management of Thyroid Disease*. Philadelphia: W.B. Saunders; **1950**; 9-405 (2009).
2. Fliers, E., Alkemade, A., Wiersinga, W. M. & Swaab, D. F. *Hypothalamic thyroid hormone feedback in health and disease*. Progress in Brain research **153**, 189–207 (2006).
3. Canaris, G., Manowitz, R., Mayor, G. & Ridgway, C. *The Colorado Thyroid Disease Prevalence Study*. Arch. Intern Med. **160**; 526–534 (2000).
4. Glinoe, D. *The importance of iodine nutrition during pregnancy*. Public Health Nutr. **10**; 1542–1546 (2007).
5. Fekete, C., Lechan, R. M., Introduction, I. & Axis, H. *Central Regulation of Hypothalamic-Pituitary-Thyroid Axis Under Physiological and Pathophysiological Conditions*. Endocr. Rev. **35**; 159–94 (2013).
6. Costa-e-sousa, R. H. & Hollenberg, A. N. *Minireview: The Neural Regulation of the Hypothalamic-Pituitary-Thyroid Axis*. Endocrinology. **153**; 4128–4135 (2012).
7. Fekete, C. & Lechan, R. M. *Negative feedback regulation of hypophysiotropic thyrotropin releasing hormone (TRH) synthesizing neurons; role of neuronal afferents and type 2 deiodinase*. Front. Neuroendocrinol. **28**; 97–114 (2007).
8. Tomic, M. Cesnajaja, K. Catt, C. J. & Stojilkovic, *Developmental and physiological aspects of Ca<sup>2+</sup> signaling in agonist-stimulated pituitary gonadotrophs*. Endocrinology. **135**; 4128–4135 (2013).
9. Melmed, S. *The Pituitary*. **718**; Elsevier, (2011).
10. E., A., Bronstein, M. & Guitelman, M. *Pituitary Today Molecular, Physiological and clinical aspects*. Front. Horm. Res. **35**; 74–87 KARGER, (2006).
11. Boron, W. & Boulpaep, E. *Medical Physiology Biophysics*. **3487**; Elsevier, (2012).

12. 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).
13. Sakai, K. & Inoue, K. *Light and Electron Microscopic Immunocytochemistry Pars tuberalis of TSH-like of the Adult Cells Occurring Male Rat in the Pituitary.* Arch. Histol. Cytol. **55**; 151–157 (1992).
14. Stojilkovic, S. S. *Molecular Mechanism of Pituitary Endocrine Cell Calcium Handling.* Cell Calcium **51**; 212–221 (2012).
15. De Gortari, P. *et al.* *La hormona liberadora de tirotropina (TRH) del núcleo paraventricular hipotalámico y sistema límbico como reguladora de la homeostasis energética y de la conducta alimentaria en animales con ayuno , restricción alimentaria y anorexia.* Salud Ment. **35**; 385–393 (2012).
16. Schaeffer, M., Hodson, D. J., Lafont, C. & Mollard, P. *Functional importance of blood flow dynamics and partial oxygen pressure in the anterior pituitary.* Eur. J. Neurosci. **32**; 2087–2095 (2010).
17. Tissier, P. R. Le *et al.* *Anterior Pituitary cell Networks.* Front. Neuroendocrinol. **33**; 252–266 (2012).
18. Filipović, B., Milošević, V., Nestorović, N., Negić, N. & Sekulić, M. *Effects of ovariectomy and chronic estradiol administration on pituitary–thyroid axis in adult rats.* Front. Neuroendocrinol. **79**; 890 – 897 (2006).
19. Taniguchi, Y., Yasutaka, S., Kominami, R. & Shinohara, H. *Proliferation and differentiation of thyrotrophs in the pars distalis of the rat pituitary gland during the fetal and postnatal period.* Anat. Embryol. **203**; 249–253 (2001).
20. Mairiotti, S. *Physiology of the Hypothalamic-Pituitary Thyroidal System.* Structure **61** (2011).
21. Jones, B. W. & Hinkle, P. M. *Subcellular Trafficking of the TRH Receptor : Effect of Phosphorylation Receptor.* Mol. Endocrinol. **23**; 1466 – 1478 (2009).
22. Szkudlinski, M. W. *et al.* *Thyroid-Stimulating Hormone and Thyroid-Stimulating Hormone Receptor Structure-Function Relationships.* Physiol. Rev. **82**; 473–502 (2002).

23. Kum, S., Eren, U., Sandikci, M. & Musal, B. A *Histochemical Investigation of Different Distribution of TSH Cells in Adenohypophysis of Female and Male Rats*. Arch. Androl. **411**; 408–411 (2006).
24. Gonzo, M., Reyes, R., Damas, C., Alonso, R. & Bello, A. R. *Oestrogen receptor a and b in female rat pituitary cells : An immunochemical study*. Gen. Comp. Endocrinol. **155**; 857–868 (2008).
25. Chiamolera, M. I. & Wondisford, F. E. *Thyrotropin-Releasing Hormone and the thyroid Hormone Feedback Mechanism*. Endocrinology. **150**; 1091–1096 (2009).
26. Böttner, M. & Wuttke, W. *Chronic treatment with low doses of estradiol affects pituitary and thyroid function in young and middle-aged ovariectomized rats*. Biogerontology **7**; 91–100 (2006).
27. Sekulic, M., Sosic-Jurjevic, B., Filipovic, B., Manojlovic-Stojanoski, M. & Milosevic, V. *Immunoreactive TSH cells in juvenile and peripubertal rats after estradiol and human chorionic gonadotropin treatment*. Acta Pathol. **108**; (2006).
28. Pekary, A. E. & Sattin, A. *Peptides Increased TRH and TRH-like peptide release in rat brain and peripheral tissues during proestrus/estrus*. Peptides **52**; 1–10 (2014).
29. Galas, L. *et al.* *TRH acts as a multifunctional hypophysiotropic factor in vertebrates*. Gen. Comp. Endocrinol. **164**; 40–50 (2009).
30. Sevarino, K. A. & Introduction, I. *The Biology of pro-Thyrotropin-Releasing Hormone- Derived Peptides*. Endocrinology **20**; 599–648 (2014).
31. Hinkle, P. M., Gehret, A. U. & Jones, B. W. *Desensitization, trafficking, and resensitization of the pituitary thyrotropin-releasing hormone receptor*. Front. Neurosci. **6**; 1–14 (2012).
32. Sun, Y., Lu, X. & Gershengorn, M. C. *G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR SIGNALLING IN NEUROENDOCRINE SYSTEMS: Thyrotropin-releasing hormone receptors – similarities and differences*. J. Mol. Endocrinol. **30**; 87–97 (2000).
33. Berridge, M. J., Bootman, M. D. & Roderick, H. L. *Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling*. Cell Biol. **4**; 517–29 (2003).
34. Alberts, B. *et al.* *Biología Molecular de la Célula*. **1463** (2004).

35. Goldman, J. M., Murr, A. S. & Cooper, R. L. *The Rodent Estrous Cycle: Characterization of Vaginal Cytology and Its Utility in Toxicological Studies*. Birth defects Res. **97**; 84–97 (2007).
36. Caligioni, C. S. *Assessing Reproductive Status / Stages in Mice*. Curr. Protoc. Neurosci. **48**; 1–8 (2009).
37. Hodson, D. J. *et al.* *Coordination of calcium signals by pituitary endocrine cells in situ*. Cell Calcium **51**; 222–230 (2012).
38. Duran Pasten, M. L., Fiordeliso-coll, T. & Hernández Cruz, A. *Castration-Induced Modifications of GnRH-Elicited [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> Signaling Patterns in Male Mouse Pituitary Gonadotrophs In Situ: Studies in the Acute Pituitary Slice*. Biol. Reprod. **88**; 1–11 (2013).
39. Friend, K. E., Resnick, E. M. & Ang, L. W. *Specific modulation of estrogen receptor mRNA isoforms in rat pituitary throughout the estrous cycle and in response to steroid hormones*. Mol. Cell. Endocrinol. **131**; 147 – 155 (1997).
40. Yu, R. & Hinkle, P. M. *Desensitization of Thyrotropin-releasing Hormone Receptor-mediated Responses Involves Multiple Steps*. J. Biol. Chem. **272**; 28301–28307 (1997).
41. Hinkle, P. M., Nelson, E. J. & Ashworth, R. *Characterization of the Calcium Response to Thyrotropin-Releasing Hormone in lactotrophs and GH Cell*. Trends in Endocrinology. and Metab. **7**; (1996).
42. Hinkle, M. & Ashworth, R. *Thyrotropin-Releasing Hormone-induced intracellular Calcium Responses in individual Rat Lactotrophs and Thyrotrophs*. Endocrinology **137**; (1996).
43. Quintanar-Stephano, a. & Valverde-R, C. *Mitogenic effects of thyroxine and TRH on thyrotrophs and somatotrophs of the anterior pituitary gland in thyroidectomized rats*. Endocrinology. **154**; 149–153 (1997).
44. Rotondo, F. *et al.* *Adenohypophysitis in rat pituitary allografts*. Int. J. Exp. Pathol. 445–450 (2010).
45. Sekulic, M., Lovren, M. & Milosevic, V. *Immunoreactive TSH cells in the pituitary of female middle-aged rats after treatment with estradiol or calcium*. Acta Histochem. **191**; 185–191 (1998).

46. Abdel-dayem, M. M. & Elgendy, M. S. *Effects of chronic estradiol treatment on the thyroid gland structure and function of ovariectomized rats.* BMC Res. Notes **7**; 1–7 (2009).
47. Mori, M., Naito, M. & Watanabe, H. *Effects of Sex Difference, Gonadectomy, and Estrogen of N-Methyl-N-nitrosourea Induced Rat Thyroid Tumors.* Cancer Res. **50**; 7662–7667 (1990).
48. Lean, a D., Ferland, L., Drouin, J., Kelly, P. a & Labrie, F. *Modulation of pituitary thyrotropin releasing hormone receptor levels by estrogens and thyroid hormones.* Endocrinology **100**; 1496–1504 (1977).
49. Miller, W. L., Knight, M. M. & Gorski, J. *Estrogen action in vitro: regulation of thyroid stimulating and other pituitary hormones in cell cultures.* Endocrinology **101**; 1455–1460 (1977).
50. D'Angelo, S. a. & Fisher, J. S. *Influence of estrogen on the pituitary-thyroid system of the female rat: mechanisms and loci of action.* Endocrinology **84**; 117–122 (1969).
51. Uribe, R. M. *et al.* *17 B-Oestradiol indirectly inhibits thyrotrophin-releasing hormone expression in the hypothalamic paraventricular nucleus of female rats and blunts thyroid axis response to cold exposure.* Neuroendocrinology. **21**; 439–448 (2009).