



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**CARACTERIZACIÓN DE LOS CAMBIOS DE LA
RESPUESTA DE CALCIO INTRACELULAR $[Ca^{2+}]_i$ DE
TIROTROPOS EN REBANADAS DE HIPÓFISIS DE
RATA WISTAR CON HIPOTIROIDISMO PRIMARIO**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

YORGUI SANTIAGO ANDRES



**DIRECTOR DE TESIS:
DRA. TATIANA FIORDELISIO COLL
2017**

CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

1. Datos del alumno

Santiago

Andres

Yorgui

5556228222

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

413078751

2. Datos del tutor

Dra.

Tatiana

Fiordelisio

Coll

3. Datos del sinodal 1

Dra.

María de Lourdes

Segura

Valdez

4. Datos del sinodal 2

Dra.

Gertrudis Hortensia

Gonzáles

Gómez

5. Datos del sinodal 3

M. en C.

José Alfredo

Jiménez

Medina

6. Datos del sinodal 4

Biól.

Miriam Beatriz

Rodríguez

Gonzáles

7. Datos del trabajo escrito

Caracterización de los cambios de la respuesta de calcio intracelular $[Ca^{2+}]_i$ de tirotrupos en rebanadas de hipófisis de rata Wistar con hipotiroidismo primario

48 p

2017

Como todos los hombres de la biblioteca, he viajado en mi juventud; he peregrinado en busca de un libro, acaso del catálogo de catálogos; ahora que mis ojos casi no pueden descifrar lo que escribo, me preparo a morir a unas pocas leguas del hexágono en que nació. Muerto, no faltarán manos piadosas que me tiren por la baranda; mi sepultura será el aire insondable; mi cuerpo se hundirá largamente y se corromperá y disolverá en el viento engendrado por la caída, que es infinita. [...] En aventuras como éstas, he prodigado y consumido mis años. No me parece inverosímil que en algún anaquel del universo haya un libro total; ruego a los dioses ignorados que un hombre— ¡uno solo, aunque sea, hace miles de años!— lo haya examinado y leído. Si el honor y la sabiduría y la felicidad no son para mí, que sean para otros. Que el cielo exista, aunque mi lugar sea el infierno. Que yo se ultrajado y aniquilado, pero que en un instante, en un ser, Tu enorme Biblioteca se justifique.

J. L. Borges

Agradecimientos

A los culpables en primer grado de todo esto: mis papás. Quienes me dieron consejos de vida, me compartieron su vida, sus experiencias buenas y malas, pero que nunca me retuvieron. Tuve la posibilidad de elegir, he cometido más errores que aciertos, he perdido más veces de las que he ganado, pero todo ha sido mi elección. Por eso les agradezco.

A la Dra. Tatiana Fiordelasio Coll, Dra. María de Lourdes Segura Valdez, Dra. Gertrudis Hortensia Gonzáles Gómez, M. en C. José Alfredo Jiménez Medina y la Biól. Miriam Beatriz Rodríguez Gonzáles por su tiempo para la revisión y comentarios a este trabajo.

Otra vez a la Dra. Tatiana Fiordelasio Coll, Dra. Gertrudis Hortensia Gonzáles Gómez, M. en C. José Alfredo Jiménez Medina, M. en C. Julio Prieto Sagredo y la Biól. Nuria Galindo Solano por su apoyo en mi formación como científico, por compartir su experiencia y pensamiento crítico.

A Alejandra Maruri Sánchez por su apoyo en los experimentos realizados para esta tesis, además de su amistad. Hizo este tiempo ameno. También a Ana Itzel Aquiles por enseñarme a usar Python y su programa para el análisis de los registros de calcio.

Al Dr. Juan José Morrone Lupi y a don Moisés Robles quienes me han dado su apoyo incondicional en muchos sentidos y se me han presentado con aprecio. Ellos me han mostrado que la amistad no se fundamenta en la constancia y la confianza, como dice Borges, pero hemos podido hablar de otras vidas, de literatura y de sus anécdotas.

A Roberto, Andrés y Daniel con quien he podido hablar de cualquier cosa.

Por último, citando a Michäel Löwy, *según la fórmula consagrada, soy el único responsable de las imperfecciones, errores y otras debilidades de este libro.*

Tabla de contenido

I. INTRODUCCIÓN	2
1. Unidad hipotálamo-hipófisis	2
2. Hipófisis	2
2.1 Localización y estructura	2
2.2 Tipos celulares	3
2.3 Sistema vascular	5
3. Regulación de la hipófisis	7
4. El eje hipotálamo-hipófisis-tiroides	9
5. Tiroides	10
5.1 Organización de la glándula tiroides	10
5.2 Metabolismo, síntesis y secreción de hormonas tiroideas	10
5.3 Transporte de las hormonas tiroideas	13
5.4 Modo de acción de los hormonas tiroideas	13
5.5 Acción biológica de las hormonas tiroideas	14
6. Hipotiroidismo primario	15
7. Tirotropos	16
7.1 Actividad eléctrica regulada y espontánea	16
7.2 TSH	17
7.3 TRH	17
7.4 Receptor de TRH	17
7.5 Calcio intracelular y secreción de TSH	18
7.6 Regulación del eje hipotálamo-hipófisis-tiroides por T3 y T4	20
8. Antecedentes	21
8.1 Cambio de la hipófisis en el hipotiroidismo primario	21
8.2 Acción no genómica de la T3	22
9. Planteamiento del problema	24
II. HIPÓTESIS	26
III. OBJETIVO	26
1. Objetivo general	26
2. Objetivos particulares	26
IV. MATERIALES Y MÉTODO	27

1. Animales de estudio	27
2. Condición experimental.....	27
2.1 Grupo control	27
2.2 Grupo sometido a tiroidectomía.....	27
3. Obtención de la glándula hipófisis y rebanadas.....	28
4. Registro de la actividad de calcio intracelular.....	29
5. Procesamiento de imágenes y análisis estadístico.....	30
V. RESULTADOS	32
VI. DISCUSIÓN.....	40
VII. CONCLUSIÓN	44
VIII. LITERATURA CITADA	45

RESUMEN

La hipófisis es una glándula, que junto con el hipotálamo, se encarga de regular diversas funciones del organismo formando parte del sistema neuroendocrino. La hipófisis tiene cinco tipos celulares que secretan hormonas con acción en órganos blanco y tejidos específicos. El eje hipotálamo-hipófisis-tiroides está regulado, en primera instancia, por la acción de TRH, secretado por el hipotálamo, que permite la síntesis y liberación de TSH en los tirotrópos de la hipófisis, un proceso dependiente de la movilización de calcio intracelular. En la tiroides la TSH permite a su vez, la captación de yodo, el crecimiento de los tirocitos, y la síntesis y secreción de hormonas tiroideas como T3 y T4. Además, las hormonas tiroideas tienen importante función en la regulación del eje formando asas de retroalimentación. Este eje es el encargado de regular el metabolismo basal del organismo, el metabolismo de lípidos, o el consumo de oxígeno, por ejemplo. Sin embargo, existen disrupciones en el eje que impiden su correcta función como el hipotiroidismo primario. El hipotiroidismo primario se reconoce por la baja o nula producción de hormonas tiroideas por alguna falla en la tiroides. En este trabajo se buscó caracterizar los patrones de movilización calcio intracelular en los tirotrópos de ratas con hipotiroidismo primario, ante los estímulos de T3 y TRH. Se encontró que la cantidad de calcio intracelular que es movilizado como respuesta a TRH es mayor en condiciones de hipotiroidismo primario; que podría ser un reflejo de una mayor secreción de TSH por los tirotrópos como un mecanismo de mantener los niveles de hormonas tiroideas en el organismo. No se encontró movilización de calcio significativa en los tirotrópos cuando se dio un estímulo con T3, que se esperaba que sucediera dado el rearrreglo del citoesqueleto que sucede cuando se da un estímulo con T3 de acuerdo a lo reportado en la literatura. También se observó aumento en la población de tirotrópos en la hipófisis y disminución de lactotópos, que concuerda con lo reportado en la literatura. Esto último también podría ser un mecanismo de compensación de los niveles de hormonas tiroideas en el organismo. Por último, el cambio en la población de lactotópos y otros grupos secretóres en la hipófisis podría estar afectando de manera paralela otras funciones del organismo como las inducidas por la prolactina.

I. INTRODUCCIÓN

1. La unidad hipotálamo-hipófisis

La homeostasis se ha definido como la capacidad de los organismos de mantener constante su medio interno mediante la regulación de sus procesos fisiológicos. Sin embargo, es común que estos parámetros fisiológicos que son regulados, varían de manera sistemática. En este sentido, se ha propuesto el término homeocinesis, que es la capacidad de un organismo de mantener un ambiente interno altamente organizado dentro de límites aceptables como respuesta a un ambiente externo que es variable (1).

El sistema neuroendocrino está formado por el sistema nervioso y el sistema endócrino que actúan de manera coordinada para mantener la homeostasis (homeocinesis) de los organismos y controlar diversos sistemas que son esenciales para la supervivencia y la reproducción (2,3).

A nivel del sistema nervioso las neuronas hipotalámicas son las principales encargadas de la regulación endocrina, particularmente la hipofisiaria. Estas neuronas, secretan factores inhibidores o activadores al sistema capilar y a través de este hacia la hipófisis y la circulación sistémica. A nivel endocrino es la hipófisis la principal mediadora de la comunicación entre el cerebro y el resto del cuerpo. Las hormonas liberadas por la hipófisis tienen efecto en diversos órganos blanco, regulando procesos como el desarrollo, el crecimiento, la reproducción o la lactancia. Este eje neuroendocrino, presenta retroalimentación hacia el hipotálamo y/o la hipófisis que constituye las asas de retroalimentación largas y cortas y que modulan la función de ambos órganos (2,4).

2. Hipófisis

2.1 Localización y estructura

La hipófisis se encuentra sobre la silla turca del hueso esfenoides, por debajo del hipotálamo al cual se encuentra conectada a través del tallo infundibular. La hipófisis está subdividida en dos regiones que son embriológica, anatómica y funcionalmente distintas: la adenohipófisis compuesta por el lóbulo anterior y el lóbulo intermedio y la neurohipófisis que está compuesta por el lóbulo posterior (véase figura 1) (5).

La neurohipófisis se puede dividir en dos subregiones, la eminencia media y la *pars nervosa*. La eminencia media es el puente en el que las terminales axónicas (aminérgicas y peptidérgicas principalmente) provenientes de los núcleos supraóptico y paraventricular del hipotálamo, liberan sus productos al plexo capilar y además el paso por el cual los axones de dichas neuronas llegan a la *pars nervosa*. Las terminales axónicas que llegan a la neurohipófisis, secretan directamente a la circulación oxitocina y vasopresina (6).

La adenohipófisis está subdividida en tres subregiones, *pars intermedia* (lóbulo intermedio), *pars tuberalis* y *pars distalis* (ambas conformando el lóbulo anterior) (figura 1).

La *pars tuberalis* consiste en una delgada capa de células proyectadas en un sentido anterior y dorsal desde la adenohipófisis hacia la eminencia media. Las células de la *pars tuberalis* están conectadas al fluido cerebroespinal del tercer ventrículo del cerebro a través de los tanicitos y se cree que estas últimas remueven moléculas del fluido cerebroespinal incluyendo varios tipos de reguladores y lo transporta a la *pars tuberalis* haciendo que esta libere sus productos almacenados (7).

La *pars intermedia* sólo posee un tipo celular secretor el cual es responsable de la síntesis y liberación de melatropina (α -MSH). En mamíferos la α -MSH estimula a los melanocitos de la piel para que sinteticen melanina la cual causa un incremento en la disposición de pigmento en la piel y el cabello. En algunas especies la *pars intermedia* está separada del resto de la adenohipófisis y en algunos mamíferos como las ballenas, manatíes y humanos, por ejemplo, está ausente (6).

En la *pars distalis* (también llamada sólo adenohipófisis y que en el resto del texto así manejaremos) existen al menos cinco tipos celulares secretores de seis tipos de hormonas tróficas y constituye alrededor del 80% de la glándula (5).

2.2 Tipos celulares de la adenohipófisis

La adenohipófisis (*pars distalis*) tiene cinco tipos celulares que sintetizan y secretan hormonas: lactotropos que secretan prolactina (PRL), corticotropos que secretan adrenocorticotropina (ACTH), somatotropos que secretan hormona del crecimiento (GH), gonadotropos que secretan hormona

fóliculo estimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH) y los tirotrópos que secretan la hormona liberadora de tirotrófica (TSH) (9).

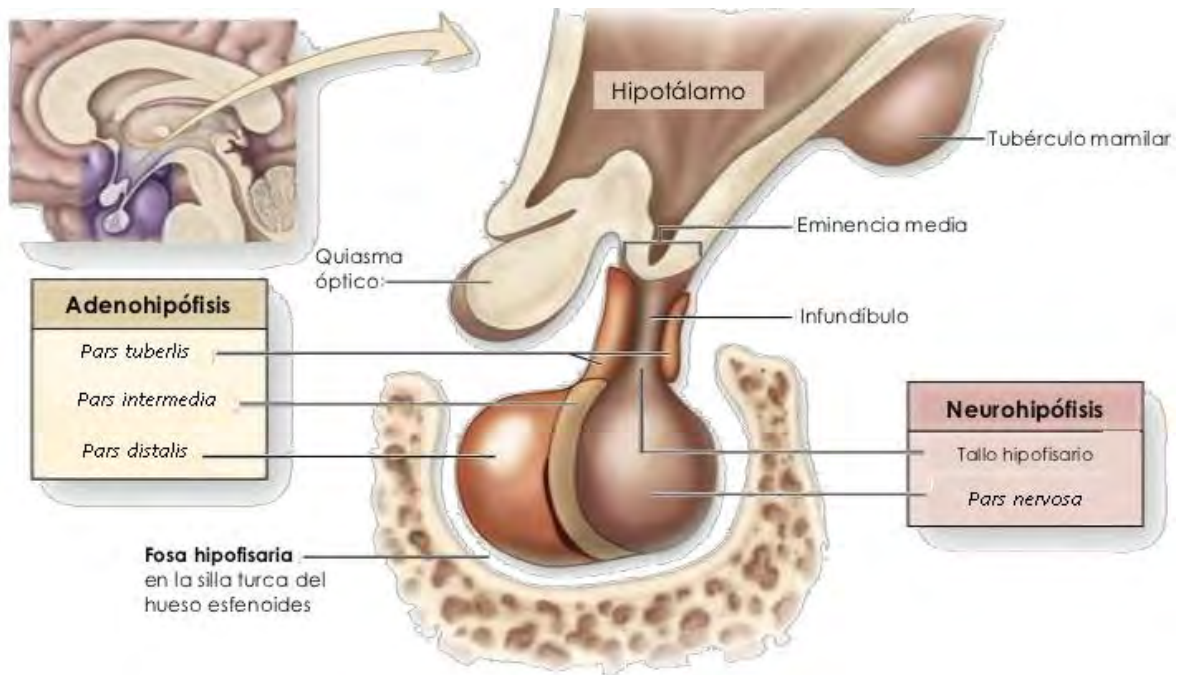


Figura 1. Estructura y localización de la hipófisis. Se muestra la silla turca sobre la que se encuentra la hipófisis, su conexión con el hipotálamo a través del infundíbulo. También se muestran las dos principales estructuras que conforman la hipófisis: la neurohipófisis y la adenohipófisis. Tomado de *Pinterest*, página en línea (8).

Estos grupos celulares secretores están distribuidos en toda la adenohipófisis. Los somatotropos son el grupo celular más abundante del lóbulo anterior ocupando aproximadamente el 50% de la población total, los lactotropos representan alrededor del 15% y están distribuidos en todo el lóbulo, los corticotropos representan otro 15%, los gonadotropos el 10% y los tirotrópos, los menos abundantes, ocupan alrededor del 5% de la población. Además existen otros tipos celulares que no son endocrinos como las células foliculo estrelladas y los pericitos (4,5). Los tipos celulares secretores, las hormonas tróficas y su función en el órgano blanco se resumen en la tabla 1.

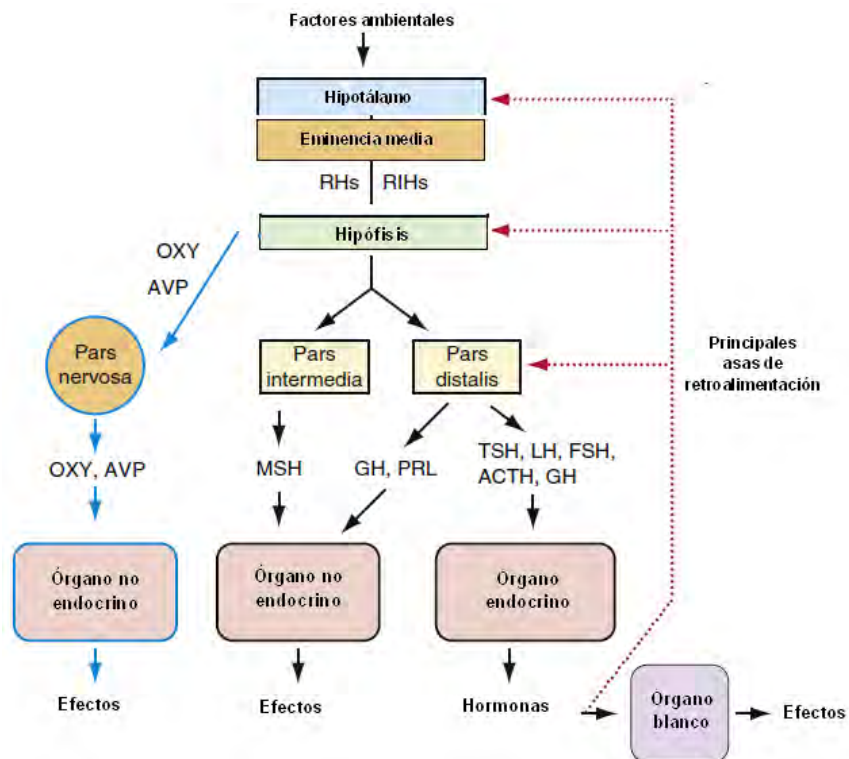


Figura 2. El sistema neuroendócrino. El hipotálamo secreta factores hipotalámicos en la neurohipófisis o en la eminencia media (y después se mueven a la adenohipófisis) como respuesta a cambios externos o internos del organismo. Los factores hipotalámicos estimulan la secreción de hormonas en la hipófisis que luego van a desencadenar una serie de procesos en otros órganos blanco. Además los metabolitos y hormonas secretados por estos órganos blanco desempeñan una función de regulación tanto en el hipotálamo como la hipófisis manteniendo así ciertos niveles de secreción de los mismos. Tomado y modificado de Norris y Carr, 2013.

2.3 Sistema vascular

La eminencia media es el principal vínculo que tiene la hipófisis con el hipotálamo y es de gran importancia, por una parte y como ya se mencionó, es a través de esta estructura que los axones de las neuronas hipotalámicas llegan a la neurohipófisis. Por otra parte, existen otras neuronas que secretan sus factores a este nivel y son transportados hasta la adenohipófisis a través del torrente sanguíneo (la adenohipófisis, no está inervada por el hipotálamo). La irrigación sanguínea fluye de manera descendente del hipotálamo a la hipófisis a través del sistema portal hipotálamo-hipofisario (5) (véase figura 3 y 4).

La circulación del sistema portal hipotálamo-hipofisario comienza por las arterias superior e inferior hipofisaria, ambas, ramificaciones de la arteria carótida interna. La arteria hipofisaria inferior irriga principalmente a la neurohipófisis mientras que la superior lo hace en la adenohipófisis (5, 10) (figura 4).

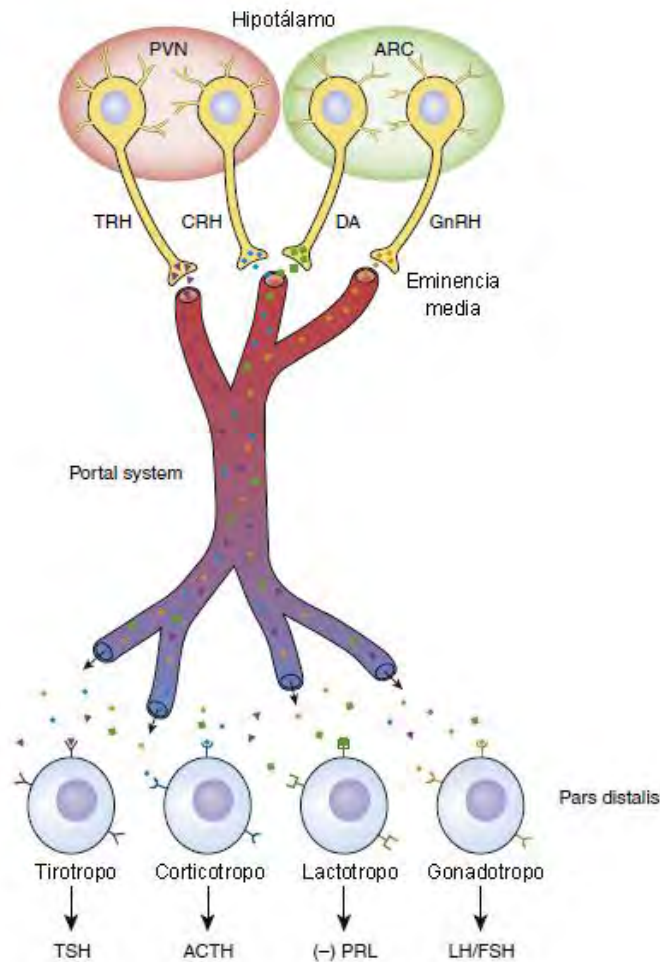


Figura 3. Sitios de síntesis y acción de varios factores hipotalámicos. Las hormonas hipotalámicas se secretan en la eminencia media y se unen específicamente en un tipo celular secretor en la adenohipófisis donde estimulan la liberación de hormonas. Nótese la acción inhibitoria de DA en los lactotrofos. PVN, núcleo paraventricular; ARC, núcleo arcuato; TRH, hormona liberadora de tirotrópica; CRH, hormona liberadora de corticotropina; DA, Dopamina; GnRH, hormona liberadora de gonadotropinas; TSH, tirotrópica; ACTH, adenocorticotropina; PRL, prolactina; LH, hormona luteinizante; FSH, hormona foliculo estimulante. Tomado y modificado de Norris y Carr, 2013.

Las arterias hipofisarias forman por anastomosis una red de capilares fenestrados a la altura de la eminencia media y el infundíbulo conocido como plexo primario, en esta región las hormonas hipofisiotrópicas son colectadas por el sistema porta y conducidas a la adenohipófisis. Esta red de capilares converge y forman vasos portales largos que llegan a la adenohipófisis donde forman una segunda red de capilares, el plexo secundario. El plexo secundario irriga a toda la adenohipófisis y colecta las hormonas que en ella se secretan y luego son llevadas al resto del cuerpo a través de la circulación sanguínea (figura 4). Además de la importancia del sistema porta en la recolección

hormonal, también es fundamental debido a que suministra oxígeno y nutrientes a las células para que realicen sus procesos metabólicos (3, 5, 10).

Tabla 1. Grupos celulares secretores de la adenohipófisis y su función.

Tipo celular	Factor hipotalámico por el que es estimulado	Hormona que secreta	Órgano blanco	Acción en el órgano blanco
Lactotopos	TRH	PRL	Glándulas mamarias, gónadas, sistema inmunológico.	Estimula la lactación, tiene un papel importante en la reproducción, regulación del sistema inmunológico.
Somatotopos	GHRH	GH	Musculo	Estimula la incorporación de aminoácidos en las proteínas.
Corticotopos	CRH	ACTH	Corteza adrenal	Estimula la síntesis y secreción de corticoesteroides.
Melanotopos	MRIH	MSH	Melanocitos	Estimula la síntesis de melanina
Tirotopos	TRH	TSH	Glándula tiroides	Estimula la síntesis de hormonas tiroides
Gonadotopos	GnRH	FSH	Gónadas	Estimula el desarrollo de los folículos en hembras y la espermatogénesis en machos; secreción de estrógenos en hembras
		LH		Estimula la síntesis de andrógenos y progesterona en hembras y la secreción de andrógenos en machos

Se enlistan los tipos celulares que conforman la adenohipófisis, así como los factores hipotalámicos que las estimulan, las hormonas que secretan ante dicho estímulo, un ejemplo de los órganos blanco en los que actúa y su acción en el mismo. Modificado de Norris y Carr, 2013.

3. Regulación de la hipófisis

La regulación de la secreción de hormonas tróficas en la hipófisis se da desde diferentes partes del cuerpo incluyendo los órganos blanco que estimulan a través de asas de retroalimentación ya sean negativas o positivas (figura 2).

Podemos clasificar esta regulación en tres niveles. El primero de ellos es a través de los factores hipotalámicos que estimulan o inhiben a los grupos celulares secretores de la adenohipófisis. Dentro de los factores que estimulan la liberación hormonal tenemos a la hormona liberadora de

gonadotropinas (GnRH) que estimula a los gonadotropos, la hormona liberadora de corticotropina (CRH) que estimula a los corticotropos, la hormona liberadora de la hormona de crecimiento (GHRH) que estimula a los somatotropos y la hormona liberadora de tirotropina (TRH) que estimula tanto a los tirotropos como a los lactotropos, Dentro de los factores inhibidores de la secreción hormonal tenemos a la dopamina (DA) que inhibe constitutivamente la secreción hormonal de los lactotropos, y la somatostatina que inhibe a los somatotropos y tirotropos (11, 12).

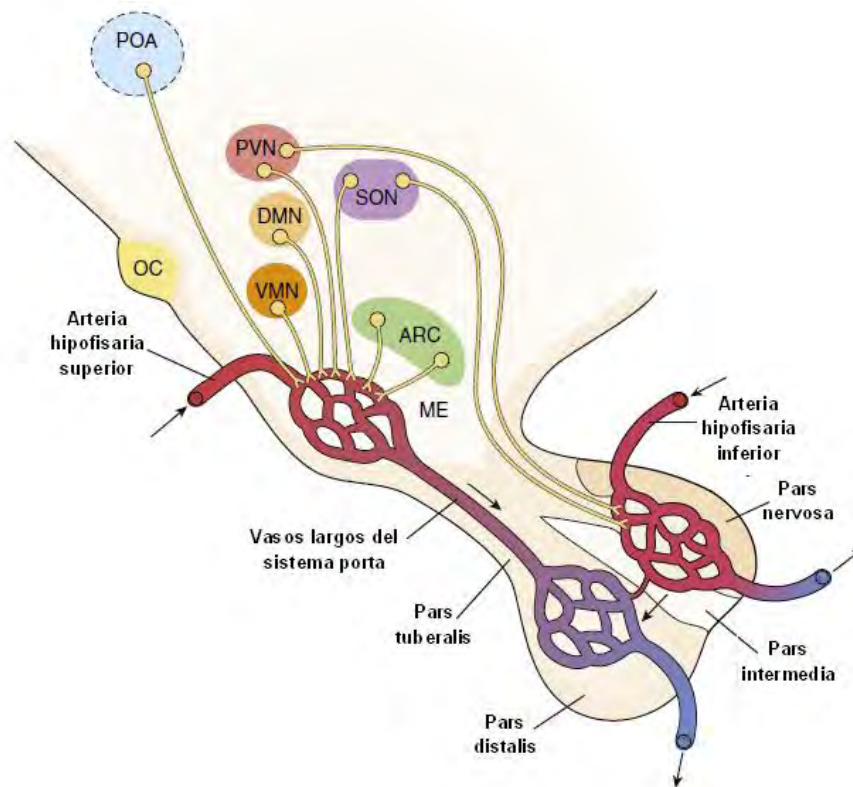


Figura 4. Sistema portal hipotálamo hipofisario. Se muestran las dos arterias hipofisarias que componen el sistema portal que irriga tanto al hipotálamo a la altura de la eminencia media y la hipófisis. Se muestran las redes de capilares o plexos que forma el sistema portal en la eminencia media (plexo primario) y en la hipófisis (plexo secundario). Algunos núcleos hipotalámicos liberan sus hormonas directamente en la neurohipófisis, mientras que otros los secretan en la eminencia media y llegan a la adenohipófisis por medio del sistema portal. ARC, núcleo arcuado; DMN, núcleo dorsomedial; PVN, núcleo paraventricular; POA, área preóptica; SON, núcleo supraóptico, VMN, núcleo ventromedial; ME, eminencia media. Tomado y modificado de Norris y Carr, 2013.

El segundo nivel de regulación está dado en la misma hipófisis a través de factores paracrinós y autocrinos, estos incluyen hormonas, factores de crecimiento y citosinas. Se ha propuesto que las células folículo estrelladas podrían estar formando una compleja red de regulación en la adenohipófisis (5, 13, 14).

El tercer nivel es a través de las hormonas y metabolitos que producen el órgano blanco, la mayoría de las veces mediante asas de retroalimentación negativa aunque también puede ser positiva. La regulación se da tanto en la hipófisis como en el hipotálamo y da como resultado un complejo balance hormonal formando diferentes ejes hipotálamo-hipófisis-órgano blanco (5).

4. El eje hipotálamo-hipófisis-tiroides

La función de la tiroides es regulada por el eje hipotálamo-hipófisis-tiroides (HHT). La secreción hormonal de la tiroides está regulada por la tirotrópina (TSH) secretada por los tirotrópos, que a su vez son estimulados por TRH del hipotálamo (figura 5). Las hormonas tiroideas (THs) son principalmente dos: la tiroxina o tetraiotironina (T4) y triyodonina (T3). Las THs forman un asa de retroalimentación negativa a nivel del hipotálamo y la hipófisis y por otro lado desempeñan funciones de reproducción, metabolismo del cuerpo y desarrollo (15). En las secciones que siguen describiremos con más detalle este eje, la interacción entre sus partes, su desempeño fisiológico así como problemas en la disrupción del eje, específicamente, del hipotiroidismo primario.

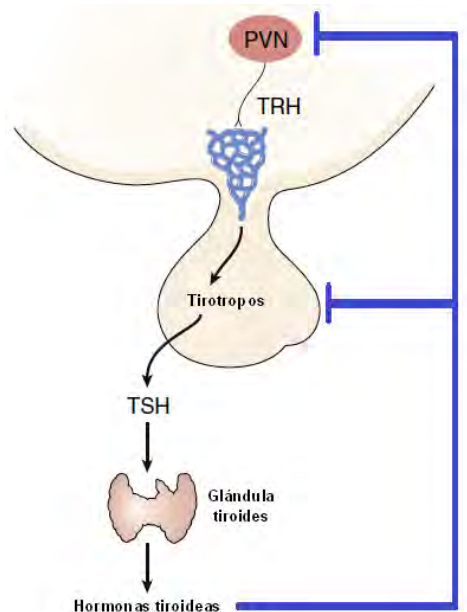


Figura 5. Control de la liberación de TSH. Las flechas negras indican regulación positiva mientras que las líneas azules indican regulación inhibitoria. Tomado y modificado de Norris y Carr, 2013.

5. Tiroides

5.1 Organización de la glándula tiroides

La glándula tiroides está compuesta por dos lóbulos conectados entre sí por un puente hístico llamado istmo de la tiroides. Esta glándula se ubica en la cara anterior del cuello, sobre la tráquea y por debajo de la laringe (figura 6). La tiroides está compuesta de folículos y se encuentra altamente vascularizada con una red densa de capilares rodeando a cada folículo (16).

Además de los folículos y capilares, la tiroides también contiene células parafoliculares o células C que secretan hormona hipocalcémica o calcitonina, que regula el metabolismo del calcio. En algunos mamíferos, como en los roedores, la tiroides embebe a las glándulas paratiroides las cuales secretan hormona paratiroidea (6).

Los folículos tiroideos están formados por grupos de células, epiteliales y polarizadas, llamados tirocitos (figura 6). Los tirocitos secretan un líquido, denominado coloide, rico en proteínas y en la que destaca una glucoproteína llamada tiroglobulina (Tgb) que contiene residuos de tirosina. El coloide es sintetizado en los tirocitos y luego transportado al espacio extracelular, al centro de cada grupo de células formando así el lumen del folículo. La región de los tirocitos que está más cercana al lumen es la porción apical y en esta región los tirocitos están unidos entre sí a través de ocludinas y uniones estrechas. La región más lejana al lumen es la porción basal, es ahí donde se encuentra el núcleo y la más cercana a los capilares que rodean al folículo (véase figura 6) (6, 16).

5.2 Metabolismo, síntesis y secreción de hormonas tiroideas

La TSH es sintetizada en los tirotrópos de la hipófisis y luego secretada al torrente sanguíneo, donde tiene una vida media de 60 minutos. Una vez que llega a la tiroides se une a su receptor de membrana, un receptor acoplado a proteína G (GPCR), y desencadena una vía de segundos mensajeros dependiente de cAMP. Esta señalización incrementa la captación de yodo por los tirocitos, la liberación y síntesis de THs, y el crecimiento de la tiroides como describiremos en seguida (15).

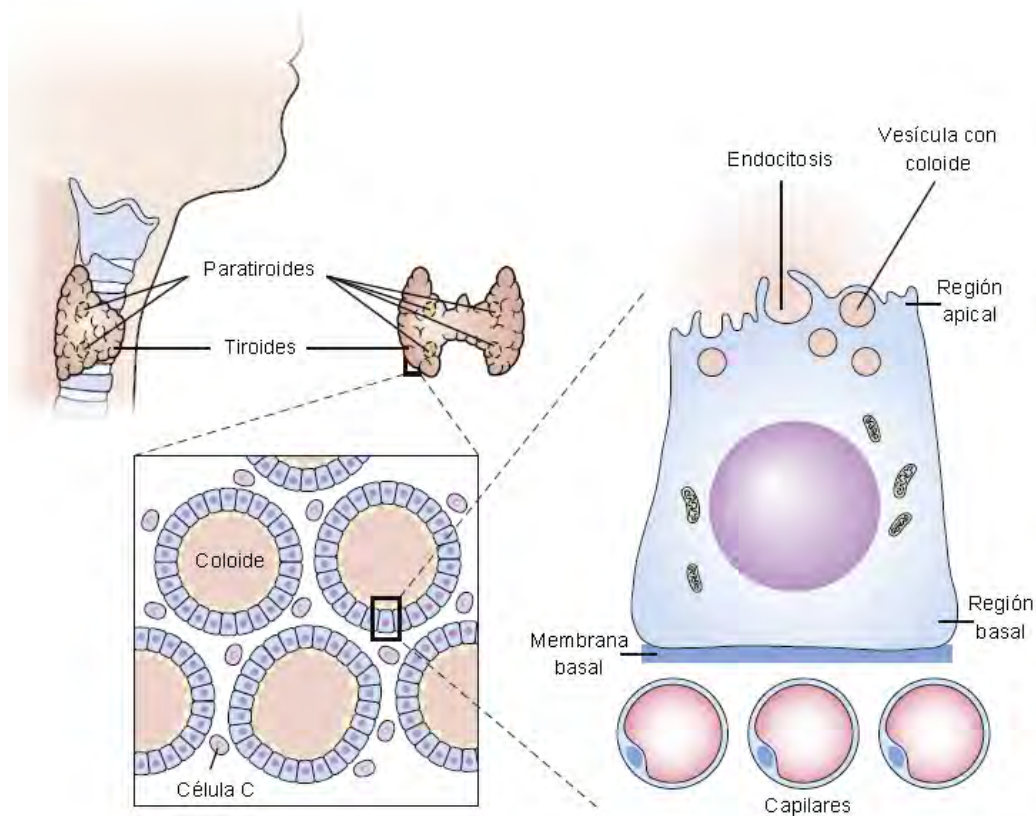


Figura 6. Glándula tiroidea en mamíferos. Se observa la ubicación de la glándula tiroidea sobre la tráquea y su relación con la paratiroides. También se muestra un acercamiento de la glándula y los folículos por los que está formada así como las células que conforman los folículos conocidas como tirocitos. Tomado y modificado de Norris y Carr, 2013.

El yodo es esencial para el correcto funcionamiento de la tiroidea y la síntesis y secreción de HTs. El yodo se obtiene de los alimentos consumidos, es absorbido por los intestinos y llevado a la circulación. El yodo es tomado de la circulación por los tirocitos a través del cotransportador unidireccional de Na^+/I^- (NIS) que lo lleva al citoplasma. Este proceso incluye un transporte activo secundario mediado por una ATPasa de sodio y potasio que mantiene el gradiente de difusión de sodio requerido para la operación de NIS (17) (ver figura 7).

Luego el yodo se transporta al lumen por la región apical por medio de un transportador llamado pendrina. En esta zona, el límite entre el tirocito y el lumen, el yodo pasa por un proceso conocido como organificación. Primero es oxidado de yoduro a yodo, luego es incorporado al carbono tres de los residuos tirosínicos de la Tgb, ambos procesos son mediados por la peroxidasa tiroidea (TPO). El primer producto es la monoiodotirosina (MIT), después MIT es yodada en el carbono cinco formando diiodotirosina (DIT). La formación de T4 se forma por condensación oxidativa de dos

moléculas de DIT regulada también por TPO. La formación de T3 se da por la condensación de una molécula de MIT con una de DIT. Además se forma una fracción menor de triyodotironina reversa (rT3) (16, 18).

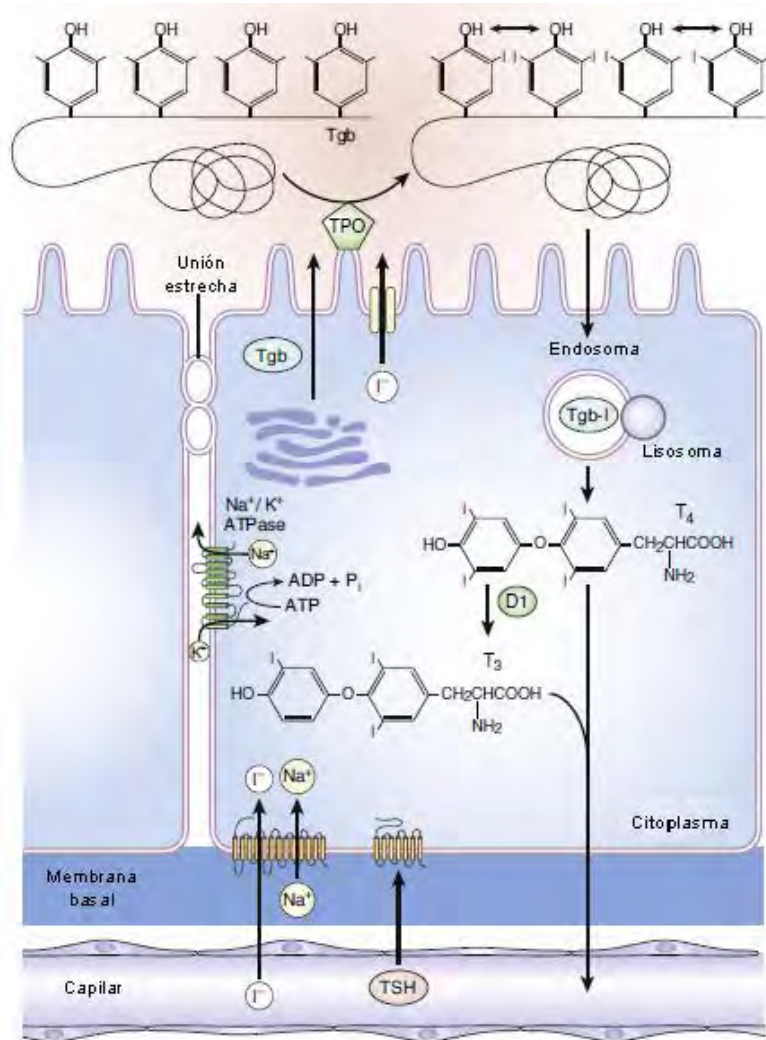


Figura 7. Síntesis de hormonas tiroideas. La captación de yodo por los tirocitos se hace por los transportadores de Na⁺ y I⁻. La ATPasa Na⁺/K⁺ mantiene el gradiente de Na⁺ que NIS requiere. La peroxidasa tiroidea (TPO) desempeña diversas funciones en la síntesis de hormonas tiroideas, como la activación de I⁻, su unión a la tiroglobulina (Tgb), y la formación de T4 a través de la hidrólisis de residuos tiroxinicos. La tiroglobulina se internaliza por endocitosis y las hormonas tiroideas son separadas de la Tgb por procesos enzimáticos. La desiodasa tipo I (D1) convierte tiroxina (T4) en triyodonina (T3) y son liberados a la circulación. Tomado y modificado de Norris y Carr, 2013.

La secreción de HTs es de T4 y T3 mientras que DIT y MIT no lo son, estas dos últimas son desiodadas y el yodo se recicla. La secreción de HTs comienza primero por la endocitosis del

coloide y de esta forma se internaliza Tbg por endosomas a los tirocitos. Los endosomas migran de la región apical a la basal y se fusionan con lisosomas que contienen enzimas hidrolíticas. La hidrólisis de Tbg libera DIT, T4, dehidroalanina y otros aminoácidos. La mayoría de T4 liberado de Tgb sale de los tirocitos y se incorpora a la circulación. Pero otra porción se mantiene en el citoplasma donde es desyodado por la desyodasa tipo 1 (D1) que la convierte en T3 y rT3 (6).

5.3 Transporte de las hormonas tiroideas

Tanto la T3 y T4 son hormonas lipófilas y esto conlleva a que una parte de ellas se encuentre en el plasma sanguíneo en forma libre, y es en este estado que son fisiológicamente activas. Sin embargo, otra parte de estas hormonas se encuentra unido a proteínas en el plasma y en los tejidos. Las proteínas plasmáticas fijadoras de THs son la albúmina, la transtiretina y la globulina fijadora de tiroxina (TGB). La fijación a proteínas por parte de las THs permite mantener una reserva grande de las hormonas, además esta unión permite que la distribución sea uniforme y evita la captación excesiva por los tejidos más cercanos (16).

5.4 Modo de acción de las hormonas tiroideas

Una vez que T3 y T4 entran a la célula blanco, la T4 es convertida en T3 por una desiodasa citoplasmática tipo I y II (D1 y D2). T3 difunde al núcleo y se une al receptor de hormona tiroidea (TR). Estos receptores se unen al DNA en forma de monómeros, homodímeros y heterodímeros con otros receptores nucleares. Por ejemplo, el TR se puede unir al receptor X retinoide (RXR) y formar un heterodímero que interactúa con un elemento de respuesta a hormona tiroidea (TRE) y que permite la síntesis de nuevas proteínas regulando la transcripción génica (17, 18) (ver figura 8).

También se han descrito que existen receptores de THs en la mitocondria y tienen efecto en la síntesis proteica y metabolismo oxidativo. Además, se está acumulando evidencia de que puede existir un receptor de membrana para THs y se trata de una integrina; esta podría estar mediando la interacción celular con la matriz extracelular (ECM) (6).

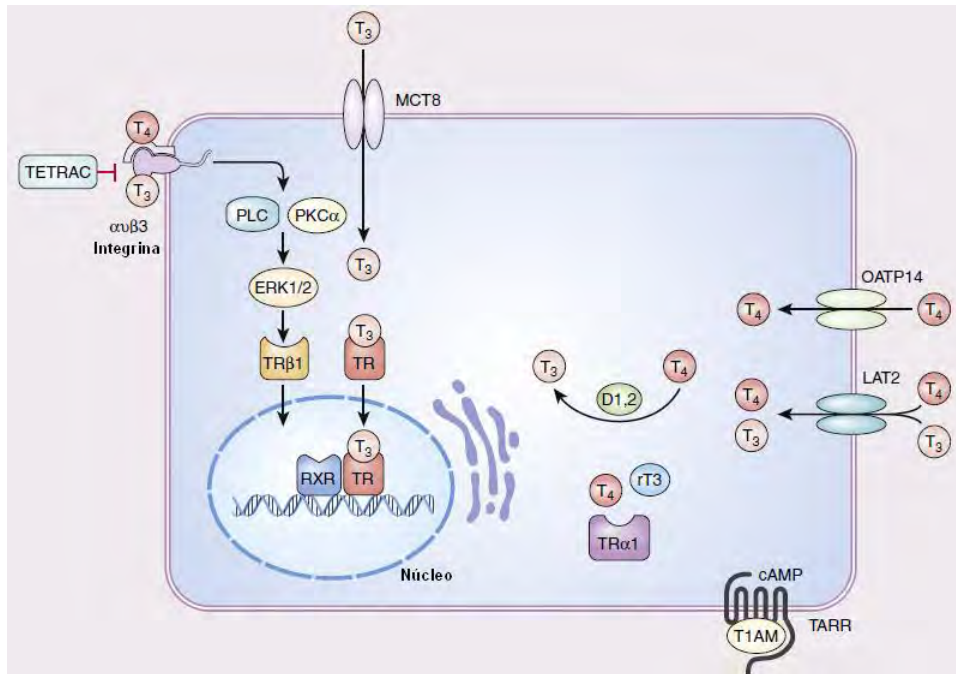


Figura 8. Acción de hormonas tiroideas en las células de sus órganos blanco. T4 y T3 son transportadas por varias proteínas (LAT2, OATP14, MCT8) y se unen a un receptor de hormona tiroidea (TR) que modifican la transcripción y síntesis de proteínas. Otros ligandos, como las tironaminas (TAMs), pueden modular la actividad celular a través de la unión a su receptor acoplado a proteína G (TARR) incrementando la concentración intracelular de cAMP. T3 y T4 también pueden interactuar con la región extracelular de una integrina y desencadenar una cascada de señalización a través de PCL y PKC. D1 y D2, desyodasas tipo I y II, respectivamente; TETRAC, antagonista de T3 en el receptor de membrana.

5.5 Acción biológica de las hormonas tiroideas

Las hormonas tiroideas tienen efecto en diversos tejidos y estimulan una variedad de procesos como el metabolismo, crecimiento, reproducción y desarrollo, especialmente del desarrollo del CNS. Muchos de los efectos de estas hormonas son consecuencia de la estimulación del consumo de oxígeno (acción termógena), también intensifican el metabolismo de lípidos, la absorción de carbohidratos en los intestinos, así como la intensificación de la disociación de oxígeno de la hemoglobina. En el corazón aumenta la frecuencia del latido cardíaco, la presión diferencial del pulso y acorta el tiempo de circulación (16, 19).

Sin embargo, existen disrupciones en el eje HHT que traen como consecuencia un desequilibrio en la regulación del mismo y pueden causar diversas enfermedades, como es el caso del hipotiroidismo primario.

6. Hipotiroidismo primario

El hipotiroidismo es una enfermedad que se caracteriza por la disminución de la función hormonal tiroidea. Esta enfermedad se puede clasificar en hipotiroidismo primario y secundario o central. El hipotiroidismo primario representa el 99% y es causado por falla en la glándula tiroides. El hipotiroidismo secundario representa el otro 1% en la que hay deficiencia de TSH debido a alteraciones en el hipotálamo o la hipófisis (20, 21).

El hipotiroidismo primario es causado por una alteración en el desarrollo de la tiroides y es identificado por el aumento en la concentración de T3 y T4 en el plasma sanguíneo seguido por disminución de las mismas en los días posteriores. A la par, existe aumento de la concentración de TSH en el plasma sanguíneo (21).

El hipotiroidismo primario es la segunda enfermedad endócrina más frecuente, sólo superada por la diabetes mellitus. A nivel mundial su prevalencia es de 0.1 a 2% y en México es de 1%, es 10 veces más frecuente en mujeres que en hombres, y aumenta en un 7-10% en personas mayores a 60 años. En el hipotiroidismo subclínico se ha reportado una incidencia de 3-9% a nivel mundial y hasta 20% en mayores de 65 años. Se reconoce que un factor de riesgo, para el caso de las mujeres, es la menopausia. La menopausia y el hipotiroidismo comparten muchos de sus síntomas por lo que es difícil diferenciarlas o reconocer si una es causa de la otra. Se ha observado que en mujeres con síntomas de menopausia muestran concentraciones de TSH, T3 y T4 que son irregulares (21, 23, 24)

Los síntomas más comunes del hipotiroidismo primario incluyen: intolerancia al frío, voz ronca, piel seca, constipación, alteración de la memoria, fatiga, ansiedad y depresión, además, en mujeres embarazadas incrementa el riesgo de aborto, parto prematuro y problemas en el desarrollo del niño (22).

Las principales causas del hipotiroidismo primario son: las enfermedades autoinmunes (como la de Hashimoto), la extracción de la tiroides total o parcial por medio de cirugía, hereditario, por falta de iodo en el organismo y por daño en la misma glándula (21).

7. Tirotropos

7.1 Actividad eléctrica regulada y espontánea

Las células endócrinas son células excitables, es decir, son células con permeabilidad iónica dependiente de voltaje, mostrando actividad eléctrica espontánea o en respuesta a un estímulo que se puede regenerar y propagar (25).

El potencial de membrana de las células endocrinas excitables oscila alrededor del potencial de reposo de -60mV . Estas fluctuaciones se han relacionado con la generación de potenciales de acción (APs) cuando estas oscilaciones alcanzan un valor umbral de -40mV ; estos APs llevan el potencial de membrana a alrededor de $+30\text{ mV}$ y lo que sigue es una hiperpolarización que alcanza los valores de -80mV (25).

La capacidad de las células endócrinas de modificar transitoriamente el voltaje de membrana y generar APs está dada por los canales iónicos presentes en la membrana plasmática: potasio, cloro, calcio, sodio. La activación de los canales de calcio dependientes de voltaje (VGCC) permite la entrada de calcio a la célula. Los VGCC se dividen en dos grupos, los de bajo voltaje de activación (LVA) y los de alto voltaje de activación (HVA). Los LVA necesitan un bajo umbral de despolarización de la membrana para activarse y su inactivación es rápida. Los HVA requieren un umbral de despolarización mayor y se inactivan de manera lenta; dentro de los HVA tenemos a los canales tipo N, P, Q, R y L (25).

De este modo, la elevación citoplasmática de calcio intracelular es dependiente de la actividad eléctrica. Esta elevación de calcio comúnmente se observa como oscilaciones en la concentración del mismo, y depende de la entrada de calcio a través de canales iónicos y/o de su liberación de los reservorios internos (25).

En tanto que la elevación de calcio, en el caso de los tirotropos, es dependiente de TRH y está relacionada con la secreción de TSH; la actividad espontánea no desencadena secreción hormonal y por lo tanto se ha sugerido que esta actividad más bien mantiene a los tirotropos en un estado responsivo cerca del nivel umbral (25).

7.2 TSH

La TSH es una hormona glucoproteica compuesta por dos subunidades. La subunidad α está compuesta por 92 aminoácidos y es compartida con las gonadotropinas (FSH y LH) que sintetizan los gonadotropos. La subunidad β es diferente en gonadotropos y tirotropos y les da la especificidad biológica. En los tirotropos la subunidad β está compuesta de 110 aminoácidos, y se empaqueta en pequeñas vesículas secretoras (5).

7.3 TRH

La regulación de la síntesis y secreción de TSH en los tirotropos está dada principalmente por TRH, un tripéptido (pGlu-His-Pro-NH₂) del hipotálamo que se produce en el núcleo paraventricular (15).

La liberación de TRH puede ser estimulada por la leptina, la hormona de la saciedad, y una vez en la sangre, el TRH tiene una vida media de 2 minutos. Las neuronas de TRH proyectan sus axones a la eminencia media, donde liberan el TRH que es captado por el sistema porta hipotálamo-hipofisario y de esta forma llevada a los tirotropos en la hipófisis (15).

7.4 Receptor de TRH

El efecto estimulador de TRH en los tirotropos se da a través del receptor de TRH tipo 1 (TRHR) en la membrana plasmática de los tirotropos. Esta unión tiene como consecuencia la activación de la fosfolipasa C (PLC), movilización de calcio y activación de proteína quinasa C (PKC).

El TRHR es un receptor con siete dominios transmembranales altamente conservados, acoplado a proteína G (GPCR). Una vez que las células que expresan TRHR son estimuladas, permanecen en estado refractario a estímulos adicionales (desensibilización) hasta que se elimina al agonista, esto permite que la vía de señalización se recupere (resensibilización). Esta sensibilización y resensibilización de las células está regulada principalmente a nivel del receptor aunque la regulación interna también es importante (26).

El TRHR es rápidamente fosforilado después de su enlace al agonista. Una vez fosforilado, se recluta la proteína arrestina a la membrana plasmática y luego ambos son internalizados en un proceso dependiente de clatrina y dinamina. Después de su internalización TRHR puede ser desfosforilado y reciclado, en un proceso en el que intervienen proteínas Rab GTPasas, o degradado en los lisosomas (véase figura 9) (26).

La membrana plasmática es nuevamente repoblada por TRHR en un tiempo medio de 30 minutos, por receptores que se desfosforilan y retornan a la membrana y mayormente por receptores que se reclutan de un reservorio perinuclear (26).

Existen trabajos en los que se reporta el posible papel inhibitorio de la TSH en la secreción de TRH, mediante un asa de regulación corta, pero también se ha descrito un asa de regulación ultracorta al inhibir la secreción de TSH en la hipófisis. Esta inhibición en la hipófisis puede ser que esté mediada por las células folículo estrelladas pues se han encontrado receptores de TSH en ellas. El papel de estas asas se desconoce pero podría dar mayor robustez a la regulación del eje y la generación de pulsos de secreción de TSH (27).

7.5 Calcio intracelular y secreción de TSH

Después de la unión de TRH con el receptor, la proteína $G_{q/11}$ al que está acoplado, se disocia y la subunidad α activa a la PCL. La PCL hidroliza al fosfatidilinositol 2,4-bisfosfato (PIP_2) y forma inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3) y diacilglicerol (DAG). Por una parte IP_3 y DAG activan la vía de la proteína quinasa C (PKC), que fosforila factores de transcripción, como Pit-1, que puede activar la transcripción de la subunidad beta de TSH (*Tsh*- β); mientras que la síntesis de la subunidad α depende del factor de transcripción CREB (cAMP response element-binding, por sus siglas en inglés). Además, DAG incrementa la afinidad del Ca^{2+} durante la exocitosis (15, 25, 28). Véase figura 10.

El IP_3 producido se une a su receptor de membrana (IP_3R) en el retículo endoplásmico (ER) y permite la liberación de Ca^{2+} al citoplasma, aumentando rápidamente su concentración y permitiendo la secreción de TSH (25).

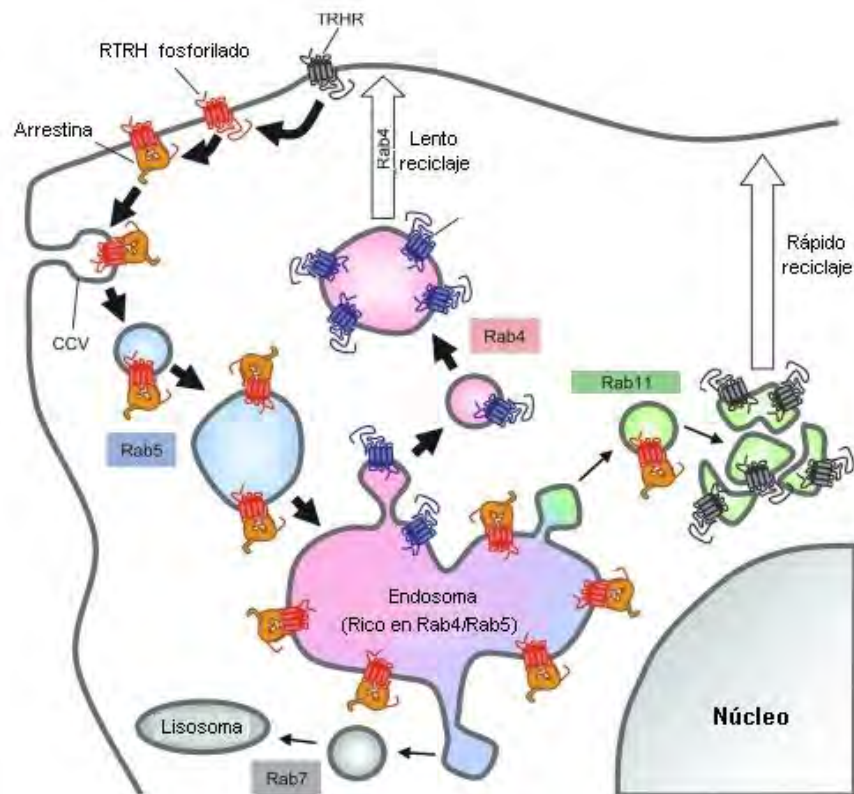


Figura 9. Regulación de la actividad de RTRH en los tirotopos. Después de su respuesta a TRH las RTRH son rápidamente fosforiladas y unidas a arrestina en la membrana plasmática. Estos receptores pueden ser desfosforilados en la membrana plasmática después de la remoción del agonista o llevados al citoplasma en vesículas cubiertas por clatrina (CCV) positivas a Rab5. El complejo arrestina-receptor es llevado a endosomas ricos en Rab5 y Rab4, una parte de este complejo es llevada a endosomas positivos a Rab11; otra parte es desfosforilada y llevada a vesículas positivas solo a Rab4, estas vesículas se reciclan lentamente a la membrana plasmática. Tomado y modificado de Jones, 2009.

El aumento de la concentración de calcio intracelular ($[Ca^{2+}]_i$) en los tirotopos es un proceso bifásico, primero ocurre un pulso o espiga de gran amplitud, luego un decaimiento lento de la concentración hasta llegar a una meseta. La primera fase está dada por el aporte rápido de Ca^{2+} desde ER y por la apertura de los VGCC tipo L que aportan calcio desde fuera de la célula y que producen una elevación sostenida del mismo. La segunda fase de decaimiento lento, es resultado de la disminución de la concentración de IP_3 , del bombeo de Ca^{2+} fuera de la célula y el agotamiento en el ER; la meseta que sigue es la reincorporación de Ca^{2+} desde fuera de la célula y su reincorporación al ER (29, 30, 31) (ver figura 10).

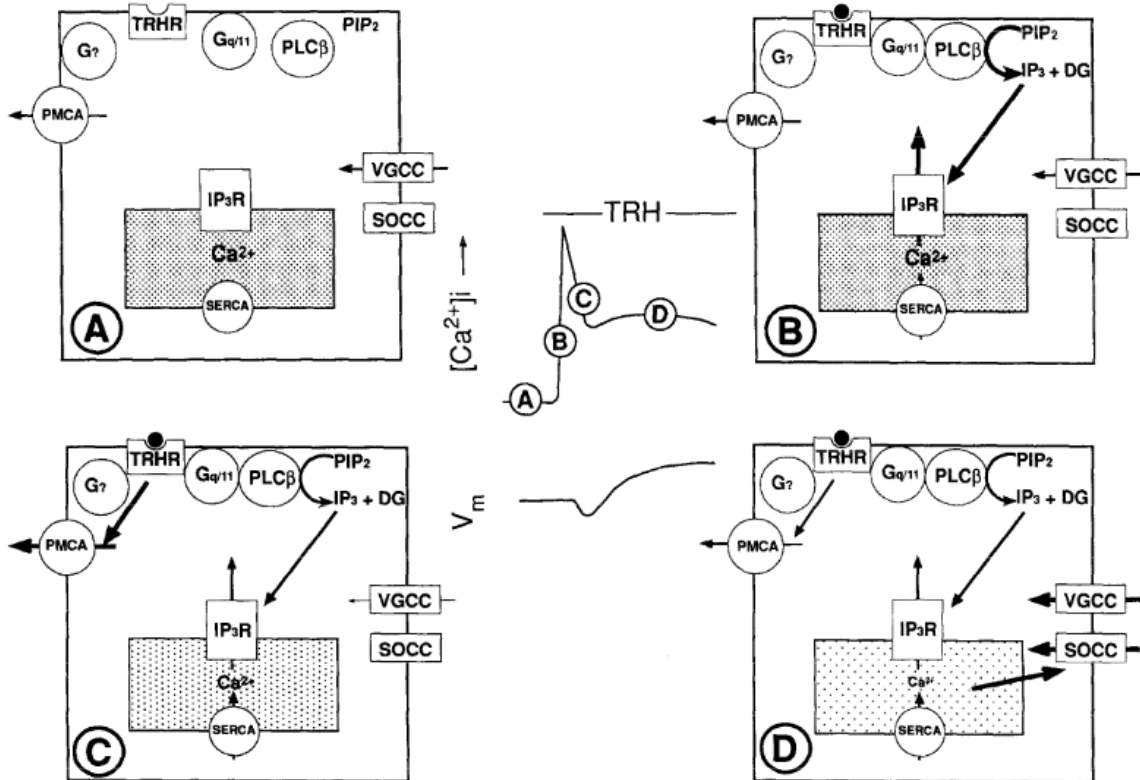


Figura 10. Principales cambios en la movilización de calcio durante el estímulo con TRH en los tirotopos y lactotopos. A. Célula en reposo. B. Iniciación del pico de la [Ca²⁺]_i por el estímulo de TRH. El IP₃ permite la liberación de Ca²⁺ de los reservorios intracelulares. C. Termina el pico de la [Ca²⁺]_i. Declive de la producción de IP₃ y liberación de Ca²⁺ de los reservorios. El Ca²⁺ del citoplasma es bombeado fuera de las células por una Ca²⁺-ATPasa de membrana plasmática (PMCA). Disminuye el influjo de Ca²⁺ hacia el citoplasma (dado por los canales de calcio dependiente de voltaje (VGCCs)) por la hiperpolarización de la célula debida a la activación de canales de K⁺. D. Meseta de la [Ca²⁺]_i. La despolarización de la membrana inhibe la acción de los canales de K⁺ y los VGCCs permiten la entrada extracelular de Ca²⁺. Los SOCCs (store-operated Ca²⁺ channels) incrementan el influjo de Ca²⁺ al citoplasma mientras que los reservorios se agotan. Tomado de Hinkle et al., 1996.

7.6 Regulación del eje hipotálamo-hipófisis-tiroides por T3 y T4

Existe un equilibrio de la cantidad de TSH que es secretado, de tal manera que se mantienen ciertos niveles de TSH en el organismo para su correcta función. Esta regulación está dada de manera positiva por el TRH, como ya se mencionó, y de forma negativa por las HTs (15).

La regulación por HTs se da tanto a nivel hipotalámico como a nivel hipofisis, disminuyendo los niveles de TRH y TSH respectivamente. En las neuronas de TRH hipofisiotrópicas se expresan receptores nucleares de THs, principalmente las isoformas TRα1, TRβ1 y TRβ2 que regulan la expresión génica de TRH. Para la correcta regulación génica es importante tanto T3 como T4 y

dado que T4 es más bien una prehormona, esta tiene que ser convertida a T3 para desempeñar su función, este proceso se realiza en el citoplasma de las neuronas por la desiodasa 2 (D2) (27, 32).

El efecto de las hormonas tiroideas en los tirotropos disminuye la transcripción tanto de la subunidad α como la subunidad β de TSH, pero esta última es la que es inhibida más rápidamente y de forma completa. La transcripción de Tsh- β es controlada de manera compleja por las THs e involucra la regulación de la transcripción de los sitios de inicio del gen. Se ha demostrado que el gen de TSH posee sitios similares a los TREs encontrados en genes que son positivamente regulados por las hormonas tiroideas (como ya se explicó arriba), por lo que esta secuencia parecida a TRE se ha considerado como el sitio en la que las THs regulan, de manera negativa, la expresión génica de Tsh- β . Al igual que a nivel hipotálamo, en la hipófisis existen isoformas del receptor de hormona tiroidea, pero es TR β la que permite una mayor supresión de Tsh. También, en la hipófisis existen D2 que convierten T4 en T3 pues esta última es la que tiene mayor actividad (33, 34, 35).

8. Antecedentes

8.1 Cambios de la hipófisis en el hipotiroidismo primario

Se ha observado que en ratas con hipotiroidismo primario, la producción de TSH es 15 a 20 veces mayor que en condiciones normales y puede deberse al efecto estimulador de TRH que no está regulado negativamente por la acción de THs (27).

Se sabe que durante el hipotiroidismo primario el peso de la hipófisis aumenta y en los tirotropos se observa tanto hiperplasia como hipertrofia. También se ha observado que la población de tirotropos en la adenohipófisis incrementa de un 5 por ciento hasta un 30 por ciento de la población total, mientras que los lactotropos ocupan tan sólo el 3 por ciento y los somatotropos el 15 por ciento. Contrario a esto último, en experimentos con ratas tiroidectomizadas a las que se les suministró T3 y/o TRH antes de la observación, mostraron que la mitosis de las células tirotropas, pero también somatotropos, aumenta y con esto, la población de las mismas (36, 37, 38, 39).

Por otra parte, se ha reportado que los gránulos secretorios de los tirotropos, en condiciones de hipotiroidismo primario, disminuyen hasta casi estar ausentes y que este cambio es reversible cuando se administran HTs (40, 41).

Quintanar-Stephano y colaboradores demostraron que estos cambios en la adenohipófisis de ratas con hipotiroidismo primario comienzan a observarse en un tiempo relativamente corto. En su estudio muestran que la hipertrofia e hiperplasia se dan en un periodo de 15 días después de la remoción de la tiroides y que el efecto conjunto de T3 y TRH incrementa la actividad mitogénica de los tirotrópos pero no por separado (39).

8.2 Acción no genómica de la T3

Como ya se describió, las THs regulan la actividad de los tirotrópos mediante un efecto genómico inhibiendo así la síntesis y liberación de TSH. Además, recientemente se han descrito mecanismos no genómicos por los que las THs regulan la actividad celular. Esta acción no depende de la transcripción y traducción génica y sucede de manera más rápida, en minutos o pocas horas (42).

Se sabe que la administración de T3 a ratas hipotiroideas causa un rápido decremento en los niveles de TSH en el suero. Este decremento sucede previo al decremento de las subunidades α y β de TSH en la adenohipófisis. Sumado a esto, durante el periodo en que la TSH disminuye en la circulación, la cantidad de TSH en la hipófisis no presenta cambios.

Por otra parte, la estimulación de la respiración mitocondrial, medida como la tasa de consumo de oxígeno y la tasa de síntesis de ATP, requiere T3. Además, T3 induce cambios en la composición de ácidos grasos y fosfolípidos en la membrana mitocondrial, afectando la fluidez de la misma. En condiciones de hipotiroidismo en ratas, se ha observado que la permeabilidad de la membrana cambia, de tal forma, que existe un exceso en la acumulación de calcio en las mitocondrias (43).

La T4 permite la conversión de actina soluble en una forma fibrosa, teniendo así importante repercusión en el citoesqueleto. En condiciones de hipotiroidismo primario en ratones, en neuronas y astrocitos existe poco desarrollo del citoesqueleto de actina y cuando se administra T3 a estas células, la actina comienza a polimerizarse en un tiempo promedio de 20 minutos (44, 45). Existen trabajos en los que se ha reportado la actividad directa que T3 tiene en las células endócrinas de la hipófisis en ratas con hipotiroidismo primario. De este modo, la T3 induce la polimerización de la actina tanto en somatotropos como en tirotrópos. Además, estos trabajos mostraron que existe una diferencia en cuanto a la distribución de las vesículas secretoras de hormona después de la administración de T3, primero observadas en la periferia, pero después de 30 minutos, disminuyen en la periferia pero incrementan en la región perinuclear de las células. Lo que llevó a los autores a sugerir que, en el caso de los somatotropos, T3 induce secreción y síntesis hormonal, mientras que

en tirotropos T3 detiene la secreción de TSH; pero en ambos casos conlleva una reconfiguración del citoesqueleto (46, 47, 48).

Por otra parte, pero muy ligado al citoesqueleto, se encuentra el efecto de T3 en la poliadenilación del mRNA de TSH β y GH. La poliadenilación es un proceso en el que se adhiere una cola de poli(A), formado solo de adenina, al extremo 3' del mRNA y que le da estabilidad a este. En el caso de mRNA de GH, el T3 tiene un efecto positivo, pues se ha visto que al suministrar T3 a ratas hipotiroidectomizadas, se da un incremento en el largo de la cola poli(A) del transcrito, así como su asociación al citoesqueleto, con lo que aumenta la estabilidad del mRNA al protegerlo de ribonucleasas (49). Por otro lado, en condiciones de hipotiroidismo en ratas, la cola poli(A) del mRNA del TSH β es más larga con respecto a condiciones fisiológicas normales, pero cuando se administra T3 ésta disminuye y por ende su estabilidad. Tampoco se observa una mayor asociación del mRNA con el citoesqueleto cuando se administra T3, con lo que se piensa que el T3 disminuye la estabilidad del transcrito, contrario a los somatotropos (47).

Con respecto a la acción del THs en la actividad del calcio se conocen estudios hechos en eritrocitos o membrana celular de musculo estriado y cardiomiocitos, los cuales han mostrado que T3 y T4 incrementan la actividad de la Ca^{2+} -ATPasa de la membrana plasmática, mismo que se refleja en el incremento del transporte iónico de la enzima. Mientras que en condiciones de hipotiroidismo la acción de esta bomba disminuye y como consecuencia existe mayor concentración de calcio en el citoplasma de la células (50, 51).

De particular interés es la relación de T3 con la movilización de calcio intracelular. Existen trabajos de esta relación como el desarrollado por D'Arezzo y colaboradores, en los que registran los cambios de calcio intracelular al estimular mioblastos con L-T3. Encontraron que T3 es importante en la regulación del pH celular pues estimula la acción del transportador Na^+/H^+ de la membrana plasmática; esta regulación se da a través de un mecanismo molecular en el que interviene PKC, MAPK y PCL para la liberación de calcio intracelular. También cabe destacar que el tiempo reportado para la acción del T3 después del estímulo es de 100 segundos (véase figura 11) y por lo tanto es una acción rápida de la hormona (52).

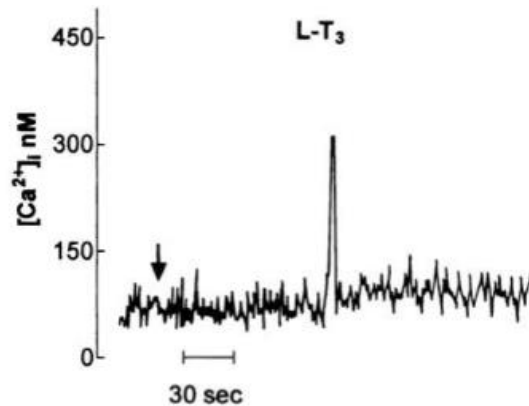


Figura 11. Efecto de T3 en la actividad de calcio intracelular de mioblastos. Nótese el tiempo que transcurre después del estímulo con T3 para la elevación de calcio. Tomado de D'Arezzo et al. 2004.

Otro trabajo, refuerza la evidencia de que las TH tienen una acción no genómica que se da en periodos de tiempo muy cortos, en segundos. El trabajo realizado por Zinman y colaboradores en cardiomiocitos de rata, muestra el efecto que tiene tanto T3 como T4 en la dinámica de calcio intracelular. Los experimentos muestran que estas THs remueven el calcio del citoplasma liberado por un estímulo previo. Descartan que la remoción del calcio sea hacia el medio extracelular y muestran, mediante el uso de bloqueadores de bomba SERCA, que el calcio se reincorpora al retículo endoplasmático. Del mismo modo demuestran que las THs no estimulan la acción de las bombas SERCA directamente sino que su acción está mediada por CAMKII y PKA, las que fosforilan SERCA y aumentan su actividad, mismos que ocurren cuando los niveles de cAMP incrementan. Por último debemos señalar que en este mismo estudio se demuestra que las THs tienen la capacidad de modificar el citoesqueleto de las células, los autores describen que los cardiomiocitos están sujetos a un proceso degenerativo del citoesqueleto durante condiciones de hipoxia, sin embargo, cuando se administran THs el efecto de la hipoxia se revierte (53).

9. Planteamiento del problema

De los ejemplos presentados en los últimos párrafos debemos señalar que el efecto que tiene el hipotiroidismo primario en los tirotrópos se conoce de estudios hechos *in vitro*, con estudios de inmunohistoquímica y células en cultivo. Se sabe que la T3 tiene efectos rápidos en la fisiología de las células y que no es genómico. Estos efectos involucran, directa o indirectamente, la participación del calcio intracelular. En este sentido, la T3 podría estar estimulando el incremento

de calcio intracelular, en los primeros minutos de acción, para producir el rearrreglo del citoesqueleto y la configuración espacial de las vesículas secretoras en el caso de las células endócrinas (incluyendo la maquinaria involucrada, por ejemplo, la miosina), a pesar del efecto inhibitorio en la secreción hormonal que tiene a largo plazo y que como consecuencia no habría liberación de calcio.

A la fecha, se desconoce el patrón de respuesta de calcio intracelular de los tirotrpos cuando se da un estímulo de T3 y TRH bajo el efecto del hipotiroidismo y los procesos en torno a esta respuesta, como son la expresión de canales de calcio y receptores y de la condición hormonal de los tirotrpos bajo condiciones organotípicas como son las rebanadas de tejido. Por lo tanto, este trabajo busca caracterizar los patrones de movilización de calcio en tirotrpos ante un estímulo de TRH y T3 en condiciones de hipotiroidismo primario, así como el cambio en el número de células que representan los tirotrpos en esta condición.

II. HIPÓTESIS

En ratas con hipotiroidismo primario, los tirotrópos presentarán una dinámica del calcio intracelular aumentada, mayor movilización de calcio intracelular, en la respuesta a los estímulos de T3 y TRH.

III.OBJETIVO

1. Objetivo general

Caracterizar los posibles cambios en los patrones de calcio intracelular de tirotrópos de rata Wistar con hipotiroidismo primario, ante un estímulo de TRH y T3.

2. Objetivos particulares

Determinar el cambio en el porcentaje de células que representan los tirotrópos en la hipófisis bajo condiciones de hipotiroidismo primario.

Determinar los patrones de calcio intracelular en rebanadas de hipófisis de rata Wistar con hipotiroidismo, en condiciones basales y bajo el estímulo de TRH y T3.

Comparar los posibles cambios en la actividad de calcio intracelular, con el estímulo de TRH y T3, en tres etapas de hipotiroidismo primario (7, 14 y 21 días después).

IV. MATERIALES Y MÉTODO

1. Animales de estudio

Para responder este planteamiento, se realizaron experimentos en los que se usaron ratas Wistar de dos meses de edad, pues en esta etapa ya han alcanzado la madurez sexual y se pueden considerar adultos. Estos animales fueron mantenidos en el bioterio de la Facultad de Ciencias con alimento y agua *ad libitum* en periodos 12/12 horas de luz-obscuridad. Todos los procedimientos fueron realizados siguiendo la Norma oficial mexicana 062-zoo-1999 de especificaciones técnicas para la reproducción, cuidado y uso de animales de laboratorio.

Estos experimentos se realizarán con el número mínimo de animales pero de tal manera que los resultados pudieran tener validez estadística. Los procedimientos se realizaron evitando o reduciendo al mínimo la incomodidad, el sufrimiento o el dolor de los animales y para el caso de las cirugías y el sacrificio, se realizaron bajo anestesia y/o analgésicos. El número de animales requeridos por condición se realizó con el cálculo del tamaño de la muestra para estimar la diferencia de medias.

Se registró la actividad de $[Ca^{2+}]_i$ en hipófisis de rata macho con hipotiroidismo primario (TX) de 7, 14 y 21 días de edad con los respectivos grupos control; cuatro ratas para cada condición en ambos casos (n=4) como se describe enseguida.

2. Condición experimental

2.1 Grupo control

A las ratas de este grupo (n=12) se mantuvieron en las condiciones anteriormente descritas y no se realizó ninguna intervención hasta el momento del registro de calcio de la glándula hipófisis.

2.2 Grupo sometido a tiroidectomía

Una vez cumplidos los dos meses de edad, a 12 ratas se les realizó una tiroidectomía total. Esta cirugía se llevó a cabo en condiciones asépticas y bajo anestesia, en la que se usó una combinación de ketamina y xilacina (60 y 40%, respectivamente). La inyección del anestésico se hizo vía

intraperitoneal. Se inyectaron 0.25mL del anestésico por cada 250g del peso. La intervención se realizó colocando a la rata en una cama quirúrgica y haciendo una incisión a lo largo del cuello, moviendo grasa y músculo lateralmente de tal modo que la tráquea quedara al descubierto para después extirpar la tiroides. Durante y después de la cirugía se mantuvieron a los animales en una cama térmica para evitar hipotermia hasta que recobraron la capacidad de movimiento. Se administró como analgésico Flunixin de meglumine 2.5mg/Kg SC al término de la cirugía.

Durante los días siguientes a la cirugía y hasta que se realizaron los experimentos a estas ratas se les administró vía oral lactato de calcio (2 g/1L) en el agua para evitar convulsiones tetánicas por la falta de calcio.

3. Obtención de la glándula hipófisis y rebanadas

Para la obtención de la glándula hipófisis, tanto de los grupos control como TX, el sacrificio de las ratas se hizo por decapitación con una guillotina, previa anestesia intraperitoneal de pentobarbital sódico, de 0.4 a 0.45mL para cada rata. Después se removió el cerebro para dejar expuesta la hipófisis y poder extraerla cuidadosamente. Una vez obtenida, la hipófisis fue embebida en agar de alto punto de fusión al 3% (Invitrogen, Eugene Or, USA) preparado con solución fisiológica ACSF (Con pH 7.4 y concentración mM: NaCl 118, KCl 3, HEPES 0.9, NaHCO₃ 2.5, glucosa 11, CaCl₂ 2.5, MgCl₂ 2.4).

Cuando el agar estuvo solidificado se realizaron cortes de la glándula en ACSF fría, en sentido antero-posterior usando un vibratomo (Leica VT1000S). Se realizaron cortes de 130µm de grosor las cuales se mantuvieron en ACSF para obtener una rebanada de la región ventral de la hipófisis para el posterior registro del calcio intracelular.

4. Registros de la actividad de calcio intracelular

Las rebanadas de hipófisis obtenidas se incubaron en oscuridad con 22µM del sensor intensiométrico de calcio acetoximetil de Fluo-4 (Fluo-4AM) (Invotrogen, Eugene, Or, USA) en 0.1% de dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma, St Louis MO, USA) con 0.5% de ácido plurónico F-

127 (Sigma, St Louis MO, USA) en 1mL de ACSF durante 30 minutos en una incubadora a 37°C, 95% O₂ y 5% CO₂.

Terminada ésta incubación, se retiró la solución con Fluo-4 y se hicieron tres lavados rápidos, luego se reemplazó con nueva ACSF para después hacer una segunda incubación con lectina (Rhodamine ricinus communis agglutinin I) durante 5 minutos para marcar la vasculatura (10µL de lectina en 200µL de ACSF). La lectina usada marca específicamente la β-galactosa que se encuentra en el endotelio de la vasculatura.

El montaje de la hipófisis se hizo sobre una cámara de registro de plexiglás, previamente tratada con poly-L-lisina al 30% (Sigma, St Louis MO, USA), donde se mantuvo en perfusión constante de 1mL/min de ACSF a temperatura ambiente. La cámara ya con el tejido se colocó en la platina de un microscopio estereoscópico de fluorescencia (Leica M205FA) con objetivo Plan APO 2.0X. La excitación del fluoróforo se realizó con una lámpara de mercurio, se filtró la luz emitida a 488nm de longitud de onda con la que se excitó al fluoróforo, y se registró el haz de luz emitido por el tejido a una longitud de 510nm. La adquisición de las imágenes se realizó con una cámara CCD acoplada al microscopio y se registraron secuencias de 800 imágenes, cada imagen fue tomada a 200ms de exposición en intervalos de 100ms con ayuda del programa Micromanager versión 1.4.20.

Para cada rebanada de hipófisis se realizó, primero un registro de la actividad basal de las células, siempre bajo la perfusión de ACSF. El segundo registro fue hecho con el estímulo de TRH para identificar a las células que respondieron a TRH que sabemos que son lactotrofos y tirotrofos. En este paso, el registro comenzó con la actividad basal de la célula en ACSF durante los primeros 10 segundos y luego la ACSF fue cambiada por la hormona TRH (10nM preparada en ACSF) durante 30 segundos, después de este estímulo se regresó a la solución ACSF durante el resto del registro. Terminado el registro se contaron 15 minutos de lavado del tejido bajo la perfusión de ACSF. El tercer registro se realizó con el estímulo de T3 (10nM), también preparado en ACSF, siguiendo el procedimiento del segundo registro: 10s basal, 30s hormona, el resto con ACSF. Y esta vez y para los siguientes registros, el tiempo del lavado fue de tres minutos

El cuarto, quinto y sexto registro se hizo con los estímulos de TRH 10nM + DA 1µM, T3 20nM y alto potasio (En mM y pH 7.4: 50 KCl, 120 NaCl, 10 HEPES y 2 CaCl₂) (véase la figura 12). TRH+DA para diferenciar a lactotrofos de tirotrofos y alto potasio para determinar la viabilidad

celular. Terminado el registro se tomaron imágenes de la vasculatura utilizando un filtro de excitación de 510nm de longitud de onda y 575nm de emisión.

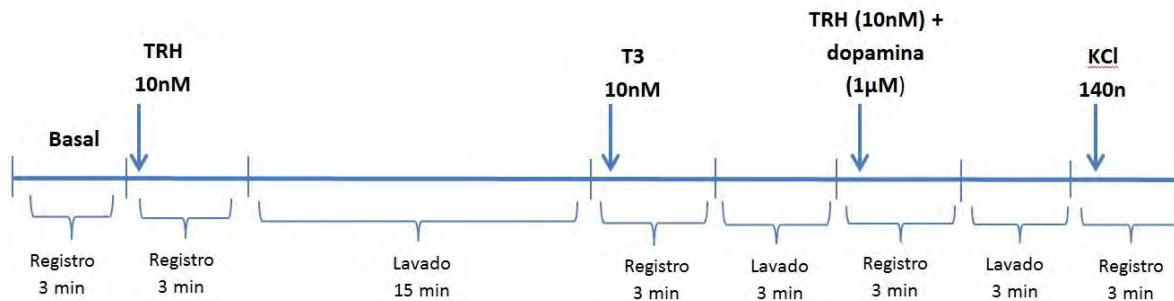


Figura 12. Protocolo de registro de la actividad de calcio intracelular. Se muestra el orden y el tiempo en el que se tomaron las películas de los registros de calcio tanto de la actividad basal como del estímulo hormonal y alto potasio.

5. Procesamiento de imágenes y análisis estadístico

Se usaron tres programas para el procesamiento de la secuencia de imágenes obtenidas: Image J, Igor Pro y Python. Con Image J se realizó una selección manual de las células que respondieron a alto potasio, tomando a estas células como el 100 por cien, para después obtener un porcentaje de tirotopos. Con este programa se transformaron los datos digitales de cambios de calcio intracelular vistos como intensidad de fluorescencia a datos numéricos.

Estos datos numéricos fueron graficados en el programa Igor Pro donde, por medio de una rutina semiautomática descrita por el Dr. Pierre Fontaneaud (Institute of functional Genomics, Montpellier, Francia), se aplicó una función $dF = F - F_0$ para restar la fluorescencia de fondo a la secuencia de imágenes y corregir los datos. Los datos luego se sometieron a otra rutina, descrita por el Dr. León Islas (Facultad de Medicina, UNAM), para poder visualizar a través de una gráfica la respuesta de cada célula (cambio en $[Ca^{2+}]_i$ visto como intensidad de fluorescencia), discernir la actividad basal de la producida por la hormona así como observar la amplitud de respuesta de cada células en el tiempo.

Para el análisis del cambio en la actividad de calcio intracelular, bajo el estímulo de TRH y T3, en el hipotiroidismo primario, se midió el área bajo la curva del cambio en la intensidad de fluorescencia. El área bajo la curva fue calculada con el programa Python 3.5.2 con un algoritmo desarrollado por Ana Aquiles, estudiante del laboratorio de Neuroendocrinología, Facultad de

Ciencias, UNAM. Los datos de área bajo la curva así como el resto del análisis estadístico se hicieron realizando una prueba ANOVA de una vía y t de student en el programa GraphPad Pris V5.

V. RESULTADOS

Con la finalidad de establecer las posibles diferencias en algunos procesos celulares como la actividad de calcio intracelular, ligada a la secreción hormonal, que ocurren bajo condiciones de hipotiroidismo primario, se realizó el registro de la actividad de calcio intracelular, empleando microscopia de fluorescencia y el sensor intensiométrico Fluo-4AM. Esto nos permitió registrar la respuesta de células individuales en un contexto poblacional, en un sentido espacial y temporal, sin comprometer la organización del mismo y las posibles relaciones intercelulares, pues en esta preparación, se mantuvieron las condiciones tisulares al emplearse rebanadas de hipófisis.

En la figura 13 se muestra una sección del tejido de hipófisis en la que se registró la actividad de $[Ca^{2+}]_i$. Se muestra la actividad celular basal de $[Ca^{2+}]_i$ así como de su actividad bajo el estímulo de alto potasio. El aumento en la intensidad de fluorescencia ($F-F_0$) es indicador de que el calcio intracelular aumenta (compárese la actividad celular basal con la actividad bajo el estímulo de potasio de la figura 13).

La viabilidad celular se evaluó con el estímulo de alto potasio, que produce una despolarización de la membrana plasmática y con ello la apertura de los canales de calcio dependientes de voltaje. Para el análisis, solamente se consideraron a aquellas células que respondieron a este estímulo. El marcaje (véase figura 13) se realizó tomando en cuenta a las células que respondieron a alto potasio y el porcentaje de tioropos se calculó tomando este valor como el 100%, como se detallará más adelante.

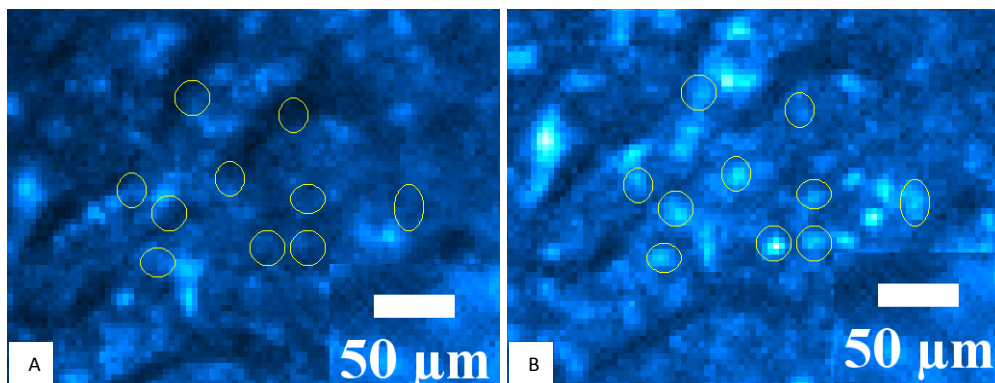


Figura 13. Actividad de $[Ca^{2+}]_i$ en estado basal y bajo el estímulo de alto potasio. A. Se muestra la fluorescencia observada en una imagen de las células con actividad basal de calcio. B. Imagen de intensidad de fluorescencia, en donde se muestra la actividad de calcio observada con el estímulo de alto potasio (140nM). A y B representan la misma sección del tejido. Los círculos amarillos muestran ejemplos del marcaje que se hizo de las células en el tratamiento con alto potasio. Nótese el cambio en la intensidad de fluorescencia registrado con alto potasio con respecto a la actividad basal.

El siguiente paso consistió en identificar y contar el número de células que respondieron a TRH 10nM y que fueron tirotropos o lactotropos. Pues como se indicó anteriormente, tanto tirotropos como lactotropos responden a TRH y tienen un patrón muy similar de respuesta de calcio intracelular (figura 14). Para realizar esta selección se identificó la respuesta a TRH 10nM con DA 5 μ M, dado que la respuesta de calcio intracelular de los lactotropos es inhibida o disminuida por la DA, con esta combinación sólo los tirotropos presentan elevación del $[Ca^{2+}]_i$ notable (ver figura 14 y 18A y B). En la figura 14B se muestra un ejemplo de un lactotrofo en la que la movilización de calcio intracelular está totalmente inhibida. En la figura 14C y 14D se muestran dos ejemplos de lactotropos en la que la movilización de calcio está disminuida pero no inhibida por completo. Esto último debido a que el papel inhibitorio de DA se da principalmente en los VGCC pero no necesariamente en la salida de calcio de los reservorios, que representa la primera fase de la movilización de calcio, como se explicó en la introducción. El conteo celular se hizo manualmente con tres repeticiones para cada uno.

De esta forma se calculó el porcentaje de tirotropos en la hipófisis y se pudo indentificar el cambio del mismo en diferentes estados del hipotiroidismo (tabla 2). Primero, se encontró que en condiciones fisiológicas normales, el porcentaje de tirotropos no cambia significativamente ($p > 0.05$) representando alrededor del 13 ± 2 por ciento de la población total (figura 15). Sin embargo, la proporción de tirotropos de las ratas sometidas a tiroidectomía total, sí aumenta significativamente ($p < 0.05$), de tal forma que en esta condición representan hasta el 38.51 ± 4.47 por ciento del total celular (figura 15). Esta proporción se observa a los siete días siguientes a la tiroidectomía y se mantiene durante los posteriores 14 y 21.

Estos mismos experimentos nos permitieron conocer el cambio en el número de lactotropos en la hipófisis. Del mismo modo que con los tirotropos, se encontró que entre los grupos control, el porcentaje de lactotropos no cambió significativamente ($p > 0.05$) representando alrededor del 19.73 ± 2.59 por ciento de la población celular total (Ver tabla 3 y figura 16). Sin embargo, en las ratas tiroidectomizadas el porcentaje de lactotropos se reduce significativamente ($p < 0.05$) con respecto al grupo control, llegando a representar el 3.44 ± 1.63 por ciento del total durante los días posteriores a la extirpación de la tiroides.

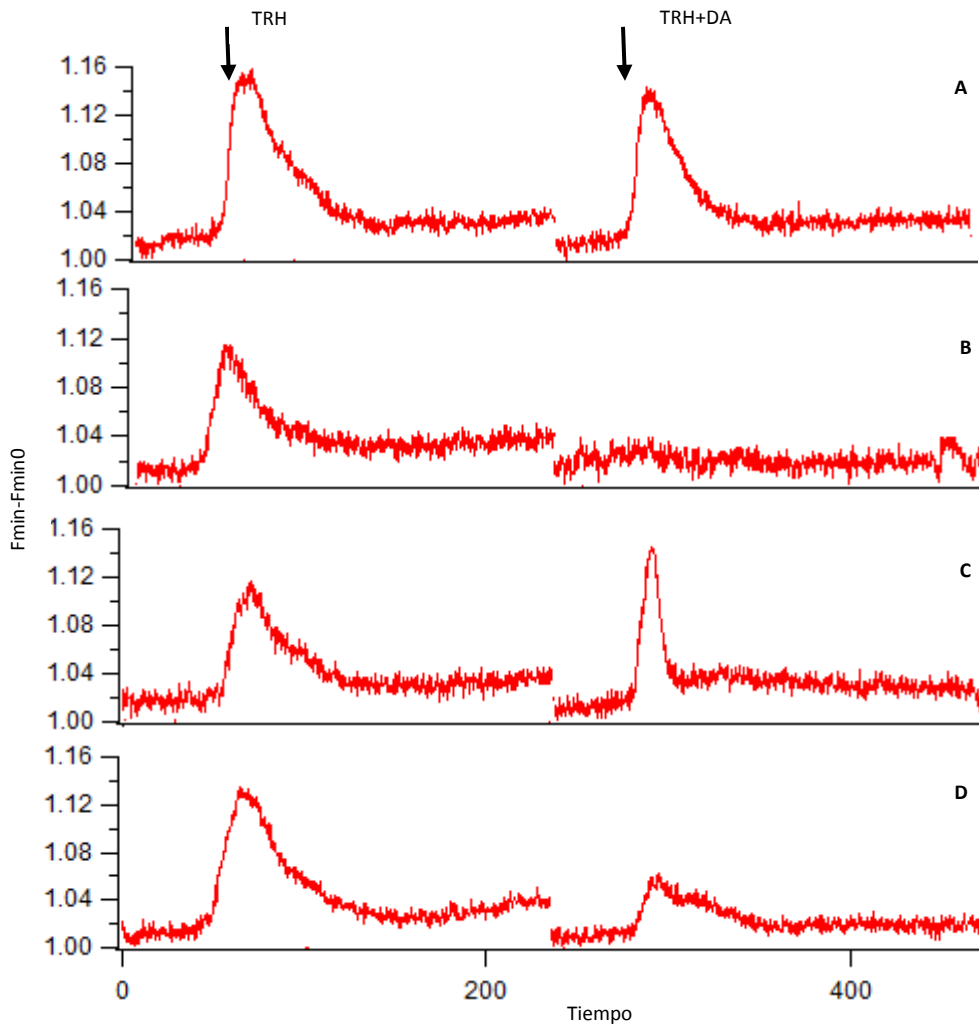


Figura 14. Identificación de tirotropos y lactotropos. Se muestran algunos ejemplos representativos de la respuesta de tirotropos y lactotropos a TRH 10 nM así como de los patrones observados de la respuesta a TRH 10nM + DA 5 μ M en las mismas células. A, tirotropo. B, C y D, lactotropos. Cabe señalar que la respuesta de los lactotropos a TRH + DA no es exactamente nula, sino que en algunas células se observa una pequeña elevación de $[Ca^{2+}]_i$. Las flechas indican el tiempo del registró en el que se dio el estímulo hormonal durante 30 segundos.

Tabla 2. Porcentaje de células que responden a TRH y son consideradas como tirotropos

Día	Control	Tx
7	15.52	43.53
14	10.69	34.97
21	13.14	37.02

Porcentaje de tirotropos que responden a TRH 10nM de ratas en condiciones fisiológicas normales y cuando se realizaron tiroidectomías. Los días indican el tiempo post operatorio (7, 14 o 21 días después de la tiroidectomización). Tx indica tiroidectomización.

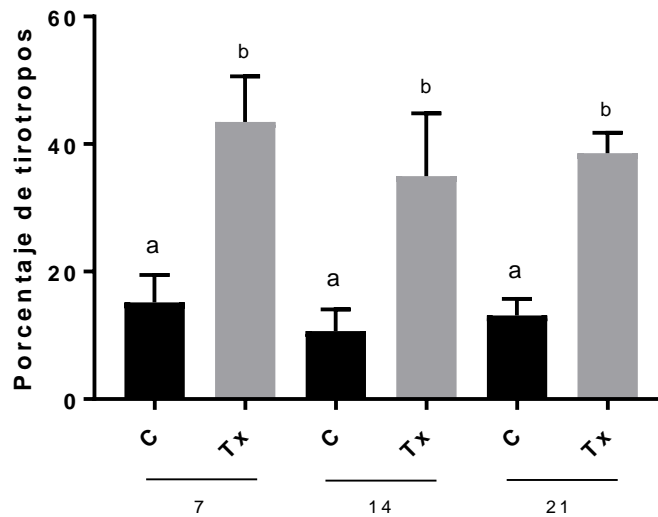


Figura 15. Cambios en el porcentaje celular que son tirotropos como consecuencia de las tiroidectomías. Se observa que el porcentaje de tirotropos en ratas tiroidectomizadas es mayor en los días posteriores a la cirugía (7, 14 y 21). C se refiere al grupo control y Tx indica tiroidectomización. Las letras sobre las barras indican diferencias significativas a un $\alpha=0.05$.

Por otro lado, durante la extracción de las hipófisis de las ratas se notaron cambios morfológicos y en la consistencia de la misma. El primero de ellos, es el color de la glándula, este se observó rojo en las glándulas de las ratas tiroidectomizadas con respecto a las glándulas del grupo control que más bien fue rosado. El segundo se observó al hacer los cortes de la glándula en el vibratomo, pues ésta pierde cierta consistencia que los grupo control sí poseen. Estas dos características apuntaban a que se dieron cambios en las características de la vasculatura de la glándula en las ratas sometidas a tiroidectomía. De esta forma se realizó un marcaje específico de la vasculatura de cada hipófisis con lectina (Rhodamine ricinus communis agglutinin I) para observar posibles cambios y que se muestra en la figura 17.

Tabla 3. Porcentaje de células que responden a TRH y son consideradas como lactotopos

Día	Control	TX
7	21.62	5.23
14	16.78	2.05
21	20.79	3.04

Porcentaje de lactotopos que responden a TRH 10nM de ratas en condiciones normales y cuando se realizaron tiroidectomías. Los días indican el tiempo post operatorio, 7, 14 o 21 días después de la tiroidectomización. Tx indica tiroidectomización.

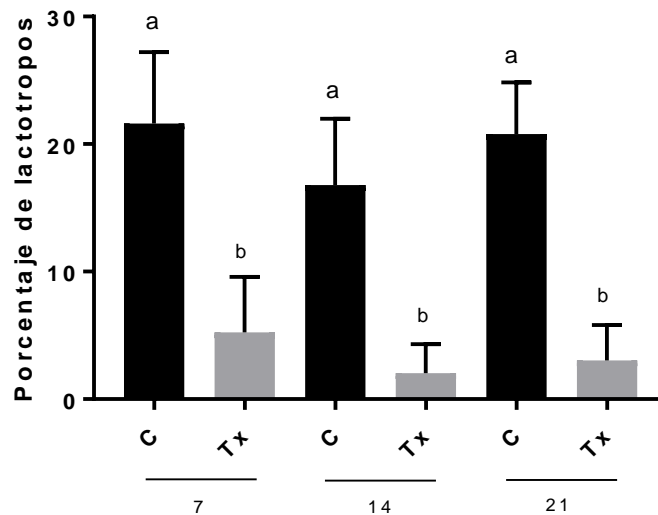


Figura 16. Cambios en el porcentaje celular que son lactotopos como consecuencia de las tiroidectomías. Se observa que el porcentaje de lactotopos en ratas tiroidectomizadas es mayor en los días posteriores a la cirugía (7, 14 y 21). Tx indica tiroidectomización. Las letras sobre las barras indican diferencias significativas a un $\alpha=0.05$.

Con respecto a la respuesta de los tirotopos a la hormona tiroidea T3 se realizaron dos registros de $[Ca^{2+}]_i$ para cada rebanada, con dos dosis diferentes de T3, el primero a 10nM de la hormona y el segundo a 20nM. Sin embargo no se observó ninguna elevación de $[Ca^{2+}]_i$ en las células durante los primeros 3 minutos y 30 segundos después del estímulo (véase figura 18). Esto se corroboró midiendo el área bajo la curva del cambio en la intensidad de fluorescencia de los tratamientos de T3 con el área bajo la curva de la actividad basal. El resultado de esta comparación muestra que el área bajo la curva de la actividad basal no es significativamente diferente ($p > 0.05$) y por la tanto no existe una elevación del $[Ca^{2+}]_i$ ante el estímulo de T3 durante ese lapso de tiempo.

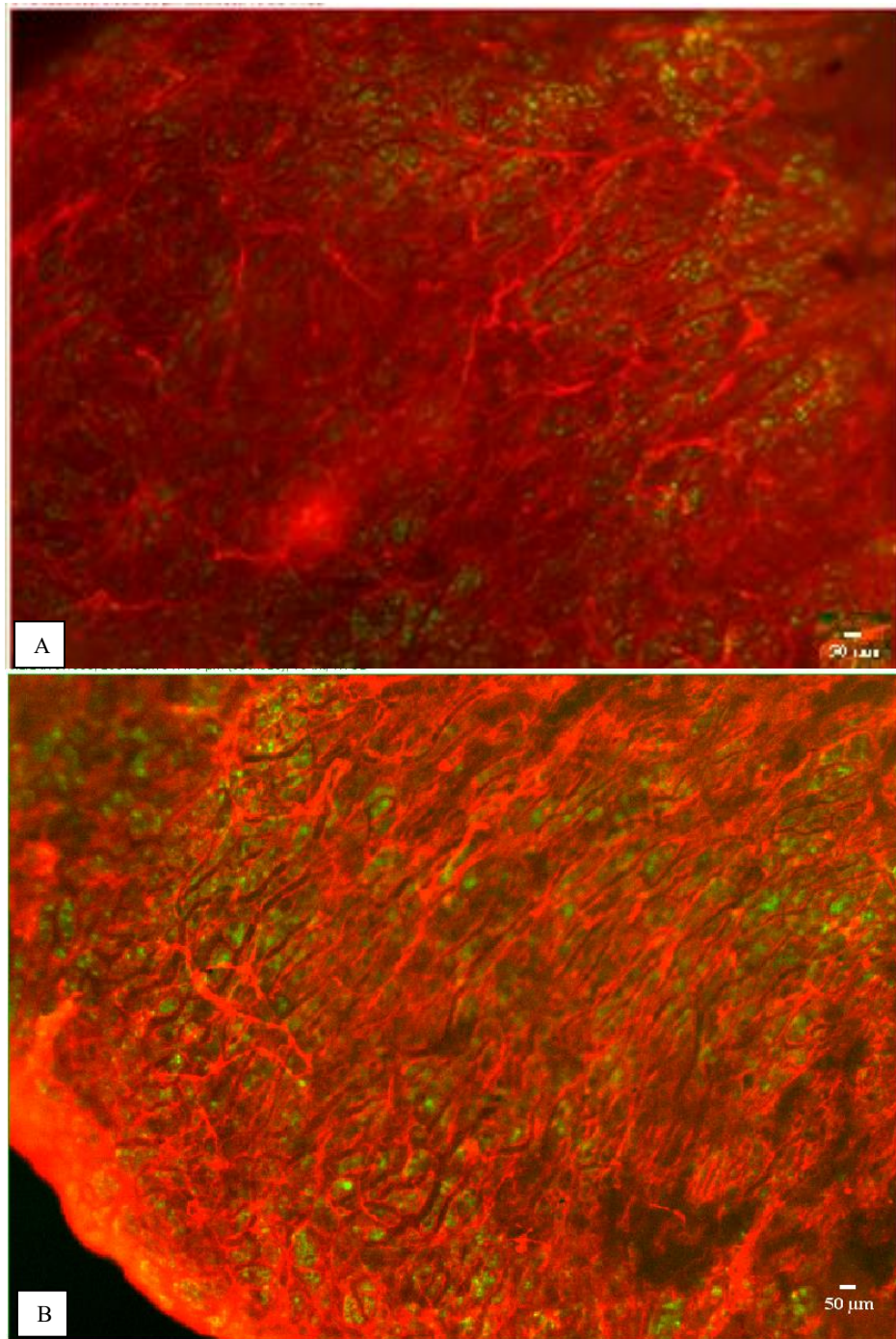


Figura 17. Vasculatura de la glándula hipófisis y su relación estructural con las células. A. Se observa la región del lóbulo anterior de la hipófisis de una rata en condiciones normales. B. Lóbulo anterior de una hipófisis de rata sometida a tiroidectomía (Tx21). En rojo se observa la vasculatura de la glándula y en verde todas las células que incorporaron Fluo-4AM.

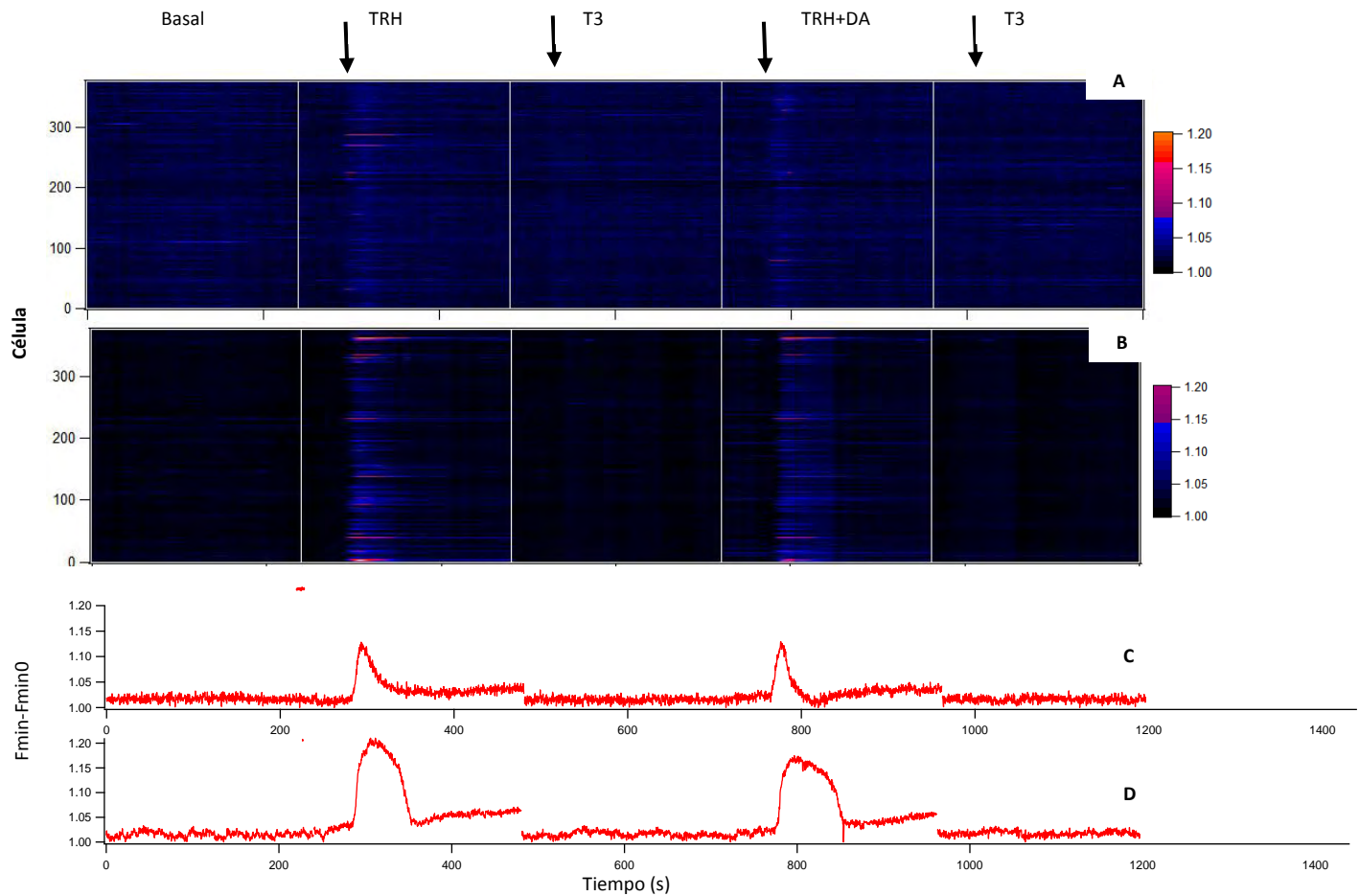


Figura 18. Cambio en la intensidad de fluorescencia de las células bajo diferentes estímulos. Las flechas indican el tiempo del registro en el que se dio el estímulo hormonal. A y B muestran los cambios en la intensidad de fluorescencia de alrededor de 400 tirotrópos para una rata control (A) y una rata tiroidectomizada de 14 días. Cada línea representa una célula en el tiempo. Nótese que cuando se estimula con TRH la intensidad de fluorescencia aumenta, no así durante el estímulo de T3. Se muestran dos dosis de T3 (10nM primero y el segundo de 20nM). También se observa que en Tx la cantidad de células que responden a TRH+DA es mayor que en la condición control, lo cual indica que el número de tirotrópos es mayor. C y D, muestran la respuesta característica de los tirotrópos a las hormonas (C, condición control; D, TX14). Nótese que la respuesta a TRH de los tirotrópos en TX14 muestra mayor intensidad de fluorescencia y que indica mayor movilización de la $[Ca^{2+}]_i$. Las flechas indican el tiempo del registro en el que se dio el estímulo hormonal durante 30 segundos.

Para responder si existe un cambio en el patrón de elevación de $[Ca^{2+}]_i$ de los tirotrópos ante el estímulo de TRH en condiciones de hipotiroidismo, se realizó una prueba en la que se midió el área bajo la curva del cambio en la intensidad de fluorescencia de los tirotrópos en el periodo que fueron estimulados con TRH 10nM. Para esto se tomaron al azar 30 tirotrópos de cada grupo postoperatorio, se obtuvo el área bajo la curva de su respuesta al estímulo con TRH 10nM y para analizar posibles diferencias los resultados se sometieron a una prueba ANOVA de una vía. De esta prueba se encontró que la cantidad de $[Ca^{2+}]_i$ presente durante el estímulo de TRH, es mayor en las

ratas tiroidectomizadas que en el grupo control (véase figura 18C y D). Se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) para 7 (4.420 ± 0.8665 para el grupo control y 8.556 ± 1.468 para Tx) y 21 (5.485 ± 0.9961 para el grupo control y 13.75 ± 1.707 para Tx) días después de la tiroidectomización, pero no para 14 días (7.898 ± 1.161 para el grupo control y 9.953 ± 1.332 para Tx).

Por otro lado se observó que en la mayoría de los casos, la movilización de $[Ca^{2+}]_i$ de los tirotropos por TRH es menor durante el segundo estímulo (el de TRH+DA) que en el primero. Este patrón se observa tanto en los grupos tiroidectomizados como en los grupos control (ver figura 18). Para saber si este cambio es estadísticamente significativo, se compararon las áreas bajo la curva de los dos estímulos de TRH para cada tirotrofo. Se tomó una muestra de treinta tirotropos al azar de los grupos control y tiroidectomizados, para obtener el área bajo la curva de los mismo cuando fueron estimulados con TRH y TRH + DA. Se realizó una prueba t de student de comparación pareada del área bajo la curva para cada célula. De esto se obtuvo que, el área bajo la curva de la respuesta a TRH del primer estímulo es significativamente mayor ($p < 0.05$) que el segundo y es cierto durante los 7, 14 y 21 días postoperatorios así como de sus grupos control.

Para probar si este proceso se debió a la desensibilización del receptor o a una acción de T3, se realizó un registro como el que se escribió en la metodología, pero sin la estimulación con T3. Se seleccionaron 30 tirotropos al azar y se obtuvo el área bajo la curva de la intensidad de fluorescencia del estímulo de TRH y TRH + DA. Se hizo una comparación t de student pareada para saber si existen diferencias en el área bajo la curva. Con esta prueba no se obtuvieron diferencias significativas en las dos respuestas de TRH, por lo que comprobamos que el tiempo transcurrido en el registro entre los dos estímulos de TRH es suficiente para la resensibilización del receptor de TRH ($p > 0.05$). De tal forma que el cambio en la elevación de $[Ca^{2+}]_i$ pudiera deberse al efecto de la T3.

Por último se realizó una prueba en la que se hizo un registro de la actividad de calcio durante 15 minutos con el estímulo de T3 10nM por 30 segundos para conocer si la movilización de calcio, que esperábamos sucediera en los primeros minutos, sucede en un tiempo posterior. Se encontró que durante los 15 minutos de registro, no se dio ningún aumento del $[Ca^{2+}]_i$.

VI. DISCUSIÓN

Este trabajo nos permitió caracterizar distintos procesos celulares de la hipófisis en una condición fisiológica que compromete el eje hipotálamo-hipófisis-tiroides. El más relevante, por ser el objetivo de este trabajo, es el cambio en el patrón de la actividad de $[Ca^{2+}]_i$ de los tirotropos ante el estímulo de TRH y T3.

El aumento en la población de tirotropos durante el hipotiroidismo primario encontrados en este trabajo concuerda con trabajos previos realizados en cultivo celular de hipófisis de rata. Sin embargo, los porcentajes cambian, pues se ha reportado hasta un 30% en esta condición fisiológica (37, 54). En este trabajo reportamos 38.51 por cien. Esta diferencia puede deberse a la pérdida de las condiciones organotípicas en el cultivo celular ya que se pierden las interacciones entre las células endócrinas así como con células de las que se ha destacado su papel regulatorio en la hipófisis (14, 54, 55). Los experimentos de este trabajo permitieron obtener resultados directamente de la hipófisis y de esta forma se mantuvieron las interacciones entre células endócrinas, con las células no endócrinas y con la vasculatura.

Otra razón de esta diferencia podemos adjudicarla a la característica multirresponsiva de las células endócrinas de la hipófisis. La multirresponsividad de una célula consiste en que puede responder a más de un secretagogo, por ejemplo un somatotropo puede responder a GHRH (como de por sí esperaríamos) y a TRH, de tal forma que también produce movilización de $[Ca^{2+}]_i$. Sin embargo, se ha reportado de la multirresponsividad de los tirotropos no es alta y es mucho menor en el hipotiroidismo (54, 56).

Confirmamos que en la condición de hipotiroidismo primario, se da un cambio en el patrón de movilización de $[Ca^{2+}]_i$ de los tirotropos, ante el estímulo de TRH 10nM. Este cambio no solo se da en la cantidad de calcio que se moviliza en el citoplasma de los tirotropos, sino además, en el patrón que sigue esta movilización. En condiciones normales, como se describió en la introducción, la respuesta a TRH se caracteriza por una subida rápida de calcio seguida por una bajada lenta hasta llegar a una meseta. Encontramos que en tirotropos de ratas tiroidectomizadas se observa la primera subida pero en este caso no es seguido inmediatamente por el decaimiento lento, sino que se mantiene por más tiempo y luego decae. Dado que las dos fases de la subida de calcio están asociadas a secreción, podemos pensar que durante el hipotiroidismo la secreción de TSH es mayor que en condiciones fisiológicas normales. La movilización de calcio sostenida observada depende

de todos los aspectos que componen la vía de señalización para la liberación del mismo: de la cantidad de receptores de TRH, de los receptores de IP_3 en el retículo endoplásmico, de las bombas que reincorporan el calcio al retículo o sacan al espacio extracelular, así como de los VGCC, por lo que podríamos especular que la expresión de alguno o todos estos elementos se modificada.

Con respecto a la acción de T3 en los tirotropos la hipótesis fue que el estímulo con esta hormona movilizaría $[Ca^{2+}]_i$ y además esta movilización sería diferente en condiciones de hipotiroidismo primario. Los experimentos realizados en este trabajo muestran que en los tirotropos no se da una movilización de calcio importante en los primeros tres minutos y medio después del estímulo con T3 (10 y 20nM), esto es cierto para condiciones fisiológicas normales y para hipotiroidismo primario. Tampoco se observó movilización de calcio, por acción de T3, durante los primeros 15 minutos después del estímulo.

La participación del calcio en la conformación del citoesqueleto, así como el efecto reportado en la literatura del T3 en la reconfiguración del mismo, nos llevó a pensar que el estímulo del T3 en los tirotropos aumentaría la $[Ca^{2+}]_i$ en los primeros minutos después del estímulo. El hecho de que no se observara ningún cambio en este trabajo podría deberse a que la cantidad de calcio intracelular necesaria para el cambio en el citoesqueleto es mínima y con esto, la $[Ca^{2+}]_i$ en la actividad basal de las células puede ser suficiente.

En el trabajo de D'Arezzo y colaboradores reportan que el estímulo de T3 en los mioblastos permite un pico de elevación de $[Ca^{2+}]_i$ durante los primeros 100 segundos después del estímulo. Este proceso en los mioblastos responde a un mecanismo para regular el pH celular de tal modo que se da una activación del transportador Na^+/H^+ a través de calcio (48). Sin embargo, este mecanismo podría no estar presente en los tirotropos, y en cambio existir otros. Llegados a este punto debemos resaltar la divergencia de los mecanismos de acción de las hormonas tiroideas dependiendo del tipo celular así como dentro de la célula. De este modo el mecanismo de acción es diferente en la mitocondria y en el núcleo de una célula (19, 43). Otro ejemplo, en los grupos celulares de la hipófisis lo representan la acción opuesta que se ha reportado de la acción de T3 en los somatotropos y en los tirotropos, en los primeros T3 estimula la secreción hormonal y en los segundos la inhibe (46, 47, 48).

La observación de que la movilización de calcio intracelular fue menor durante el segundo estímulo de TRH en los tirotropos llevó a pensar dos posibles procesos que lo describieran. El primero, fue el

de la desensibilización del receptor de TRH, que sucede por el estímulo con TRH y que requiere un periodo de tiempo para su resensibilización. El segundo, fue un mecanismo por el que T3 pudiera estar inhibiendo o disminuyendo la movilización de calcio, producida por TRH, de manera inmediata.

El posible papel de la desensibilización del receptor de TRH se descartó al hacer registros de calcio con estímulos de TRH, con el tiempo descrito en la metodología pero sin estímulos de T3 (ver figura 12). De este experimento se concluyó que los cambios de la movilización de calcio entre los dos estímulos de TRH no se deben a la desensibilización del receptor porque la cantidad de calcio movilizado se mantiene en el segundo estímulo. De este modo, es posible que T3 pueda estar mediando la cantidad de calcio que se puede movilizar al citoplasma en los tirocitos, regulando la cantidad de tirotrópina que estos puedan secretar a corto plazo (48). Esta aseveración concuerda con el experimento realizado por Zinman y colaboradores en cardiomiocitos de rata, en los que mostraron que T3 permite la remoción del calcio intracelular (como consecuencia de un estímulo previo) a través de la activación de las bombas SERCA (53).

Para conocer si T3 tiene un efecto directo en la vía de señalización que desencadena el TRH en las células se podría realizar un experimento siguiendo el protocolo de este trabajo, en el que se estimule al tejido primero con T3 y en seguida con TRH. De tal forma que si T3 tiene un efecto directo y rápido en la respuesta de los tirocitos a TRH, ésta no se observaría o estaría disminuida.

La disminución en la multiresponsividad de los tirocitos en condiciones de hipotiroidismo primario reportados en la literatura, sumado al cambio en la movilización de $[Ca^{2+}]_i$ por TRH en condiciones de hipotiroidismo reportados en este trabajo, nos abre una puerta al por qué de estos cambios observados en la hipófisis. Estas características parecen parte de un proceso sinérgico que realiza la hipófisis para mantener los niveles basales de hormonas tiroideas en el organismo durante el hipotiroidismo, del tal forma que incrementa la secreción hormonal de TSH. Este incremento se da por una parte por el aumento en la cantidad y tamaño de los tirocitos (38, 39). Pero además, por el aumento en la secreción de cada célula en sí. Esto último lo corrobora el presente trabajo, ya que como se demostró, la cantidad de $[Ca^{2+}]_i$ que se moviliza durante el estímulo con TRH en ratas con hipotiroidismo primario, incrementa significativamente. En este sentido, la elevación del TSH en el plasma sanguíneo no sólo se da porque se pierde el mecanismo que permite su degradación sino porque incrementa la secreción del mismo en esta condición fisiológica.

Este trabajo permitió comprender diversos cambios que existen en los tirotrópos. Pero también mostró que a la par, suceden cambios en todo el contexto de la hipófisis, desde la vasculatura hasta otros grupos celulares endócrinos. Se había demostrado que mientras el número de tirotrópos aumenta en el hipotiroidismo primario, otros tipos celulares disminuyen su número como en el caso de los somatotropos (37). Aquí se mostró que los lactotropos son otro grupo celular que se ve afectado en cuanto al número de células que lo componen. De esto surgen preguntas de cómo el hipotiroidismo primario está afectando otros ejes neuroendocrinos y procesos fisiológicos como la lactancia o la reproducción.

Pues la prolactina, que es sintetizada y liberada por los lactotropos, tiene diversas funciones en el organismo además de la lactancia. En las gónadas, por ejemplo, inhibe la esteroidogénesis y estimula la síntesis de receptores para gonadotropinas. En el páncreas, estimula la proliferación celular y aumenta la actividad de las células B para la secreción de insulina. En la próstata promueve el aumento de receptores de andrógenos. En el riñón, intestino y placenta, regula el equilibrio de agua y electrolitos. Además regula la función del sistema inmunológico, estimulando por ejemplo la proliferación de linfocitos o la diferenciación de monocitos. Dado que durante el hipotiroidismo primario se observó que el porcentaje de lactotropos en la hipófisis es menor, esto podría estar afectando la cantidad de prolactina que es secretada y por lo tanto tener efecto en los mecanismos de regulación en los que participa. Con esto, el hipotiroidismo primario puede estar afectando en paralelo otras funciones de organismo (57,58).

Por último se encontró que existen cambios morfológicos en la glándula dados por el hipotiroidismo primario relacionados al color y consistencia de la glándula. El color rojo de la glándula se debe a la vascularización, en la que en condiciones de hipotiroidismo es mayor. Se ha reportado el papel de las hormonas tiroideas en la angiogénesis y características de la vasculatura. La acción de hormonas tiroideas comprende la reducción en la resistencia de la vasculatura que tiene como consecuencia cambio en la presión sanguínea, incremento en la masa de los capilares, así como efecto en la formación de vasos. Se ha observado disminución en la complejidad y densidad de vasos sanguíneos en el cerebro de rata como consecuencia de hipotiroidismo primario. Estos procesos de las hormonas tiroideas se dan directamente en el núcleo regulando la actividad de diferentes factores de transcripción. Pero también mediante un receptor de membrana, se destaca la acción de la integrina $\alpha\beta3$ como mediador de la transcripción génica y su interacción, por otra parte, con la matriz extracelular (59).

VII. CONCLUSIÓN

En conclusión este trabajo mostró que, como consecuencia del hipotiroidismo primario, se presentan cambios en las propiedades celulares de la hipófisis. Se encontró que los tirotropos, presentan cambios en los patrones de movilización de calcio intracelular en respuesta a TRH y que éste está relacionado a una mayor secreción hormonal. No se encontró que la T3 aumente la $[Ca^{2+}]_i$ en los primeros tres minutos y medio después del estímulo. Contrario a esto, la T3 podría estar regulando la cantidad de calcio que puede movilizarse en el citoplasma, de tal forma que disminuye la movilización de calcio producida por TRH. Este efecto puede ser un mecanismo mediante el cual T3 disminuye la cantidad de TSH que las tirotropos pueden secretar a través de la cantidad de calcio intracelular que se moviliza. Sumado a esto, encontramos que la proporción de tirotropos aumenta en condiciones de hipotiroidismo y por el contrario en número de lactotropos disminuye. Este patrón concuerda con trabajos previos y responde a un cambio la fisiología del organismo para mantener la homeostasis.

VIII. LITERATURA CITADA

1. Que, C. L., Kenyon, C. M., Olivenstein, R., Macklem, P. T., & Maksym, G. N. (2001). Homeokinesis and short-term variability of human airway caliber. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 91(3), 1131–1141.
2. Clarke, I. J. (2015). Hypothalamus as an endocrine organ. *Comprehensive Physiology*, 5(1), 217–253.
3. Fink, G. (2015). MEMOIR: Harris' neuroendocrine revolution: Of portal vessels and self-priming. *Journal of Endocrinology*, 226(2), T13–T24.
4. Pocock, G., Richards, C. A., & Richards, D. A. (2013). *Human Physiology*. Oxford press.
5. Melmed, S. (2010). The Pituitary. Tercera edición, Academic Press.
6. Norris, D. O.; Carr, J. A. (2013). *Vertebrate Endocrinology, 5th edition*.
7. Thapar, K., Kovacs, K., Scheithauer, B. W., & Lloyd, R. V. (2001). *Diagnosis and Management of Pituitary Tumors*.
8. Pinterest, Explora sistema endocrino, Neurología, Fecha de consulta: 30 de Marzo 2017. Página en línea [<https://es.pinterest.com/pin/229050331027074867/>].
9. Sam, S., & Frohman, L. A. (2008). Normal Physiology of Hypothalamic Pituitary Regulation. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, 37(1), 1–22.
10. Strauss Iii, J. F. S. (2014). *Yen & Jaffe' s Reproductive Endocrinology and Clinical Management*. Seventh edition, Elsevier.
11. Wells, S., & Murphy, D. (2003). Transgenic studies on the regulation of the anterior pituitary gland function by the hypothalamus. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 24(1), 11–26.
12. Ben-Jonathan, N., & Hnasko, R. (2001). Dopamine as a prolactin (PRL) inhibitor. *Endocrine Reviews*, 22(6), 724–763.
13. Acosta, M., Verónica, F., & Mohamed, F. (2010). Folliculostellate cells in pituitary pars distalis of male viscacha: immunohistochemical, morphometric and ultrastructural study. *European Journal of Histochemistry*, 54(1), 1–9.
14. Clark, S., & Stojilkovic, S. S. (2001). A novel view of the function of pituitary folliculostellate cell network, *12(9)*, 378–380.
15. Fekete, C., & Lechan, R. M. (2014). Central regulation of hypothalamic-pituitary-thyroid axis under physiological and pathophysiological conditions. *Endocrine Reviews*, 35(2), 159–194.
16. Barrett, K. E. (2014). Fisiología Médica de Ganong. In *Fisiología Endócrina e Reprodutiva*. 339–340.
17. Nyström, E., Berg, G. E. B., Jansson, S. K. G., Topping, O. & Valdemarsson, S. (2011). *Thyroid Disease in Adults*. Springer.
18. Imam, S. K., & Ahmad, S. I. (2011). *Thyroid Disorders*. Springer.
19. Zoeller, T. R., Dowling, A. L. S., Herzig, C. T. a, Iannacone, E. a, Gauger, K. J., & Bansal, R. (2002). Thyroid hormone, brain development, and the environment. *Environmental Health Perspectives*, 110(3), 355–361.
20. Gürel, A., Doğanekin, A., Özkan, Y., & Aydın, S. (2015). Serum apelin levels in patients with thyroid dysfunction. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 8(9), 16394–16398.
21. Elena, M., Ortiz-De Zárate, M., Patricia De Santillana-Hernández, S., Del Pilar Torres-Arreola, L., Angélica Gómez-Díaz, R., Rivera-Moscoco, R., & Sosa-Caballero, A. (2012). Diagnóstico y tratamiento del hipotiroidismo primario en adultos. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*, 50(1), 71–80.

22. IMSS (2016). Diagnóstico y Tratamiento de Hipotiroidismo Primario y Subclínico en Adulto, (1).
23. Pearce, E. N. (2007). Thyroid dysfunction in perimenopausal and postmenopausal women. *Menopause International*, 13(1), 8–13.
24. Badawy, a, State, O., & Sherief, S. (2007). Can thyroid dysfunction explicate severe menopausal symptoms? *Journal of Obstetrics and Gynaecology: The Journal of the Institute of Obstetrics and Gynaecology*, 27(5), 503–505.
25. Stojilkovic, S. S., Tabak, J., & Bertram, R. (2010). Ion channels and signaling in the pituitary gland. *Endocrine Reviews*, 31(6), 845–915.
26. Jones, B. W., & Hinkle, P. M. (2009). Subcellular trafficking of the TRH receptor: effect of phosphorylation. *Molecular Endocrinology*, 23(9), 1466–78.
27. Mariotti, S. (2011) Physiology of the Hypothalamic-Pituitary Thyroidal System. En: Molecule, T. T. S. H., & Mariotti, S. The Regulation of Thyroid-Stimulating- Hormone synthesis and secretion : Molecular Biology and Biochemistry. *Thyroid Disease Manager*.
28. Barth, J. A., Jagla, A., & Schrezenmeir, J. (2001). *Endocrinology & Diabetes*, 109, 196–203.
29. Tomić, M., Bargi-Souza, P., Leiva-Salcedo, E., Nunes, M. T., & Stojilkovic, S. S. (2015). Calcium signaling properties of a thyrotroph cell line, mouse T α T1 cells. *Cell Calcium*, 58(6), 598–605.
30. Hinkle, P. M., Nelson, E. J., & Ashworth, R. (1996). Characterization of the calcium response to thyrotropin-releasing hormone in lactotrophs and GH cells. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 7(10), 370–374.
31. Ashworth, R., & Hinkle, P. M. (1996). Thyrotropin-releasing hormone-induced intracellular calcium responses in individual rat lactotrophs and thyrotrophs. *Endocrinology*, 137(12), 5205–5212.
32. Dupré, S. M., Guissouma, H., Flamant, F., Seugnet, I., Scanlan, T. S., Baxter, J. D., Becker, N. (2004). Both thyroid hormone receptor (TR) β 1 and TR β 2 isoforms contribute to the regulation of hypothalamic Thyrotropin-Releasing Hormone. *Endocrinology*, 145(5), 2337–2345.
33. Baquedano, M. S., Ciaccio, M., Dujovne, N., Herzovich, V., Longueira, Y., Warman, D. M., Belgorosky, A. (2010). Two novel mutations of the TSH- β subunit gene underlying congenital central hypothyroidism undetectable in neonatal TSH screening. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 95(9), 98–103.
34. Shupnik, M. A. (2000). Thyroid Hormone Suppression of Pituitary Hormone Gene Expression. *Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders*, 1(804), 35–42.
35. Yusta, B., Alarid, E. T., Gordon, D. F., Ridgway, E. C. & Mellon, P. L. (1998). The Thyrotropin β -Subunit Gene Is Repressed by Thyroid Hormone in a Novel Thyrotrope Cell Line, Mouse T α T1 cells. *Endocrinology*, 139(11), 4476–4482.
36. Koenig, R. J., & Watson, A. Y. (1984). Enrichment of rat anterior pituitary cell types by metrizamide density gradient centrifugation. *Endocrinology*, 115(1), 317–323.
37. Surks, M. I., & DeFesi, C. R. (1977). Determination of the cell number of each cell type in the anterior pituitary of euthyroid and hypothyroid rats. *Endocrinology*, 101(3), 946–958.
38. Quintanar-Stephano, A., & Valverde-R, C. (1997). Mitogenic effects of thyroxine and TRH on thyrotrophs and somatotrophs of the anterior pituitary gland in thyroidectomized rats. *Journal of Endocrinology*, 154(1), 149–153.
39. Quintanar-stephano, A., & Valverde, R. C. (1999). Mitotic Counts in Rat Adenohypophysial Thyrotrophs and Somatotrophs: Effects of Short-Term Thyroidectomy, Thyroxine, and Thyrotropin-Relasing Hormone. *Endocrine Pathology*. 10(4), 335-341.
40. Rinehart, J. F., & Farquhar, M. G. (1953). Electron Microscopic Studies of the A anterior Pituitary Gland. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 1(2), 93–113.

41. Farquhar, R. & Rinehart, J. (1954). Cytological alterations in the anterior pituitary gland following thyroidectomy. *Endocrinology*, 55, 857.
42. Davis, P. J.; Goglia, F. & Leonard, J. L. (2015). Nongenomic actions of thyroid hormone. *Endocrinology*, 12(2), 1-11.
43. Vacca, R. A., Moro, L., Caraccio, G., Guerrieri, F., Marra, E., & Greco, M. (2003). Thyroid hormone administration to hypothyroid rats restores the mitochondrial membrane permeability properties. *Endocrinology*, 144(9), 3783–3788.
44. Siegrist-Kaiser, C. A., Juge-Aubry, C., Ekenbargers, M., Leonard, J. L., & Tranter, P. (1990). Thyroxine-dependent in Cultured Astrocytes Modulation of Actin. *Biochemistry*, 265(9), 5296–5302.
45. Farwell, A. P., Dubord-Tomasetti, S. A., Pietrzykowski, A. Z., & Leonard, J. L. (2006). Dynamic nongenomic actions of thyroid hormone in the developing rat brain. *Endocrinology*, 147(5), 2567–2574.
46. Da Silva, F. G., Giannocco, G., Santos, M. F., & Nunes, M. T. (2006). Thyroid hormone induction of actin polymerization in somatotrophs of hypothyroid rats: Potential repercussions in growth hormone synthesis and secretion. *Endocrinology*, 147(12), 5777–5785.
47. Da Silva, F. G., Giannocco, G., Luchessi, A. D., Curi, R., & Nunes, M. T. (2010). T3 acutely increases GH mRNA translation rate and GH secretion in hypothyroid rats. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 317(1–2), 1–7.
48. Bargi-Souza, P., Romano, R. M., Salgado, R. D. M., Goulart-Silva, F., Brunetto, E. L., Zorn, T. M. T., & Nunes, M. T. (2013). Triiodothyronine rapidly alters the TSH content and the secretory granules distribution in male rat thyrotrophs by a cytoskeleton rearrangement-independent mechanism. *Endocrinology*, 154(12), 4908–4918.
49. Goulart-Silva, F., de Souza, P. B., & Nunes, M. T. (2011). T3 rapidly modulates TSH- β mRNA stability and translational rate in the pituitary of hypothyroid rats. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 332(1–2), 277–282.
50. Mylotte, K. M., Cody, V., Davis, P. J., Davis, F. B., Blas, S. D., & Schoenl, M. (1985). Milrinone and thyroid hormone stimulate myocardial membrane Ca²⁺-ATPase activity and share structural homologies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82(23), 7974–7978.
51. Lin, H.-Y., Tang, H. Y., Davis, F. B., Mousa, S. a, Incerpi, S., Luidens, M. K., Davis, P. J. (2012). Nongenomic regulation by thyroid hormone of plasma membrane ion and small molecule pumps. *Discovery Medicine*, 14, 199–206.
52. D’Arezzo, S., Incerpi, S., Davis, F. B., Acconcia, F., Marino, M., Farias, R. N., & Davis, P. J. (2004). Rapid nongenomic effects of 3, 5,3'-triiodo-L-thyronine on the intracellular pH of L-6 myoblasts are mediated by intracellular calcium mobilization and kinase pathways. *Endocrinology*, 145(12), 5694–5703.
53. Zinman, T; Shneyvays, V.; Tribulova, N.; Manoach, M. & Shainberg, A. (2006). Acute, Nongenomic Effect of Thyroid Hormones in Preventing Calcium Overload in Nerborn Rat Cardiocytes. *Journal of Cellular Physiology*, 207, 220-231.
54. Pedroza-Cummings, L. (2016). Caracterización de los Cambios de la Respuesta de [Ca²⁺]_i en Células Endocrinas Multirresponsivas a Secretagogos Hipotalámicos en la Adenohipófisis de Rata Wistar en diferentes condiciones fisiológicas. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM. 57 pag.
55. Tsukada, T., Azuma, M., Horiguchi, K., Fujiwara, K., Kouki, T., Kikuchi, M., & Yashiro, T. (2016). Folliculostellate cell interacts with pericyte via TGF β 2 in rat anterior pituitary. *Journal of Endocrinology*, 229(2), 159–170.
56. Nuñez, L., Villalobos, C., Senovilla, L., & García-Sancho, J. (2003). Multifunctional cells of mouse anterior pituitary reveal a striking sexual dimorphism. *The Journal of Physiology*, 549, 835–843.

57. Méndez-Hernández, I. C., Cariño, C., & Díaz, L. (2005). La prolactina en el sistema inmunológico: Aspectos de síntesis y efectos biológicos. *Revista de Investigacion Clinica*, 57(3), 447–456.
58. Grattan, D. R., Steyn, F. J., Kokay, I. C., Anderson, G. M., & Bunn, S. J. (2008). Pregnancy-induced adaptation in the neuroendocrine control of prolactin secretion. *Journal of Neuroendocrinology*, 20(4), 497–507.
59. Davis, P. J., Sudha, T., Lin, H.-Y., & Mousa, S. A. (2015). Thyroid Hormone, Hormone Analogs, and Angiogenesis. *Comprehensive Physiology*, 6(January), 353–362.