

4

03086

2ej

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES  
UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y DE POSGRADO  
CENTRO DE NEUROBIOLOGÍA**

**EFFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN CRÓNICA DE TIROLIBERINA (TRH)  
SOBRE LA SÍNTESIS Y SECRECIÓN DE TIROTROPINA (TSH) Y EL  
NÚMERO DE TIROTROPOS HIPOFISIARIOS EN LA RATA**

**T E S I S**

Que para obtener el grado de

**DOCTOR EN CIENCIAS FISIOLÓGICAS**

presenta el

**M. en C. ANDRÉS QUINTANAR STEPHANO**

**DIRECTOR DE TESIS: DR. CARLOS VALVERDE RODRÍGUEZ**

**Centro de Neurobiología. Juriquilla, Qro. México.**

**Junio de 1998**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

260940



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.

## INDICE

Página

ACRÓNIMOS.....	7
RESUMEN.....	8
SUMMARY.....	9
I.- INTRODUCCIÓN.....	10
II.- ANTECEDENTES	
UNIDAD HIPOTÁLAMO-HIPOFISIARIA.....	11
Características Anatómicas de la Hipófisis.....	12
Embriogénesis.....	14
Interrelaciones Hipotálamo-Hipofisarias.....	14
Hormonas y Células de la Adenohipófisis.....	16
CONTROL DE LAS FUNCIONES DEL LÓBULO ADENOHIPOFISIARIO.....	19
Hormonas Producidas por los Órganos Blanco.....	20
Hormonas Hipotálamo-Hipofisiotrópicas (HHH).....	20
Neurotransmisores y Otros Péptidos.....	23
Posibles Mecanismos de Control Autocrino y Paracrino.....	23
EJE HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS-TIROIDES.....	24
MECANISMOS QUE CONTROLAN LA SÍNTESIS Y SECRECIÓN DE TSH.....	25
Estructura y Síntesis de la TSH.....	25
Control de la Síntesis y Secreción de la TSH por las Hormonas Tiroideas.....	26
Control de la Síntesis y Secreción de la TSH por la Somatostatina.....	27
Control de la síntesis y Secreción de la TSH por la TRH.....	29
REACTIVIDAD CELULAR ADENOHIPOFISIARIA E HIPOTIROIDISMO PRIMARIO	33
SECRECIÓN DE TSH y GH EN EL HIPOTIROIDISMO PRIMARIO.....	35
MORFOLOGÍA HIPOFISIARIA EN EL HIPOTIROIDISMO PRIMARIO Y EFECTOS DE LA T <sub>3</sub> .....	37
EFECTOS MITOGÉNICOS DE LA TRH SOBRE LA ADENOHIPOFISIS.....	40
III.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA EXPERIMENTAL.....	42
IV.- HIPÓTESIS.....	45
V.- OBJETIVOS.....	47
Experimento I.....	48
Objetivo 1.....	48
Justificación.....	48
VI.- MATERIAL Y MÉTODOS.....	48
Animales y Tiroidectomía.....	48
Manipulación Experimental.....	48
Sacrificio y Autopsia.....	49
Histología.....	49
Inmunohistoquímica.....	50
Cuento Mitótico.....	50
Análisis de los Resultados.....	50
VII.- RESULTADOS.....	51
Peso Corporal.....	51
Peso Hipofisiario.....	51
Cuentas Mitóticas.....	51
Número de Tirotrofos y Somatotrofos en Mitosis.....	53
Número de Células en Mitosis No Inmunoteñidas.....	53
Histología.....	53
VIII.- DISCUSIÓN.....	55
IX.- CONCLUSIONES.....	58

Experimento II .....	60
Objetivo 2 .....	60
Justificación .....	60
<b>VI.- MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>60</b>
Animales y Cirugía .....	60
Manipulación Experimental.....	60
Sacrificio y Autopsia .....	61
Radioinmunoensayos de TSH, T <sub>4</sub> y T <sub>3</sub> .....	62
Histología.....	62
Inmunohistoquímica.....	62
Conteo Mitótico.....	63
Análisis de los Resultados.....	63
<b>VII.- RESULTADOS .....</b>	<b>63</b>
Peso Corporal.....	63
Peso Hipofisario.....	64
Cuentas Mitóticas.....	64
Número de Células en Mitosis no Inmunotefidas .....	67
Histología.....	68
Concentraciones Séricas de Tironinas y TSH.....	72
<b>VIII.- DISCUSIÓN.....</b>	<b>72</b>
<b>IX.- CONCLUSIONES.....</b>	<b>79</b>
CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS .....	81
<b>X.- REFERENCIAS.....</b>	<b>84</b>
<b>XII.- ANEXOS:</b>	

1.- Quintanar-Stephano A. and Valverde-R C. (1997): Mitogenic Effects of Thyroxine and Thyrotropin-releasing Hormone on Thyrotrophs and Somatotrophs of Anterior Pituitary Gland in Thyroidectomized Rats. *Journal of Endocrinology*, 154: 149-153.

2.- Quintanar-Stephano A. Valverde-Rodríguez C. and Kovacs Kalman. (1997): Mitotic Counts in Rat Adenohypophysial Thyrotrophs and Somatotrophs. Effects of Short Term Thyroidectomy, Thyroxine and Thyrotropin-releasing Hormone. En preparación.

EL TRABAJO EXPERIMENTAL DE ESTA TESIS SE REALIZÓ EN EL DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA Y FARMACOLOGÍA DEL CENTRO BÁSICO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE AGUASCALIENTES.

ECONÓMICAMENTE, FUE APOYADA POR:

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE AGUASCALIENTES; PROGRAMA PIBB UAA-90-2.

CONACYT; CONVENIO M92017DO806.

BECA DE DOCTORADO DEL CONACYT (18 MESES).

BECA DE DOCTORADO DEL PROGRAMA SUPERA (1 AÑO).

BECA ANUIES DE INTERCAMBIO ACADÉMICO UAA-UNAM (6 MESES).

APOYO COMPLEMENTARIO PARA ESTANCIA DE INVESTIGACIÓN EN EL DEPTO. DE PATOLOGÍA DEL ST. MICHAEL'S HOSPITAL. TORONTO, ONTARIO. CANADA; FIDEICOMISO "PROF. ENRIQUE OLIVARES SANTANA" AGUASCALIENTES, AGS. Y UACPYP DEL CCH. UNAM.

## AGRADECIMIENTOS

AL DR. CARLOS VALVERDE RODRÍGUEZ POR EL APOYO INCONDICIONAL, SU AMISTAD Y LA ACERTADA TUTORÍA DE ESTE TRABAJO. SIN TODO LO ANTERIOR ESTE TRABAJO NO SE HUBIERA REALIZADO.

AL COMITE TUTORIAL:  
DR. FERNANDO ANTÓN TAY  
DR. ROBERTO DOMÍNGUEZ CASALA

QUIENES ADEMÁS DE SU AMISTAD, CON GRAN PACIENCIA Y VISIÓN LOGRARON HACERME COMPRENDER LA IMPORTANCIA DE LOS CONCEPTOS TEÓRICOS Y DE LA DISCUSIÓN EXHAUSTIVA DEL TRABAJO EXPERIMENTAL.

A LOS SINODALES:  
DR. MANUEL SALAS ALVARADO  
DR. ROBERTO DOMÍNGUEZ CASALA  
DR. FERNANDO ANTÓN TAY  
DR. JEAN-LOUIS CHARLI  
DR. CARLOS VALVERDE RODRIGUEZ  
DR. VICTOR TSUTSUMI FUJIYOSHI  
DR. GONZÁLO MARTÍNEZ DE LA ESCALERA  
POR LOS ACERTADOS COMENTARIOS Y SUGERENCIAS A LA TESIS. MUCHAS GRACIAS.

AL DR. KALMAN KOVACS POR SU AMISTAD Y GENEROSA INVITACIÓN A SU LABORATORIO PARA REALIZAR EL ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO, ASÍ COMO SU APOYO, CRÍTICAS Y SUGERENCIAS A TODO EL TRABAJO Y SU COLABORACIÓN EN EL ARTÍCULO: Mitotic Counts in Rat Adenohypophysial Thyrotrophs and Somatotrophs. Effects of Short Term Thyroidectomy, Thyroxine and Thyrotropin-releasing Hormone. En preparación.

A LA SRA. TLQ. MA. GUADALUPE ESPINO LÓPEZ; MI BRAZO DERECHO EN LA REALIZACIÓN DE TODO EL TRABAJO EXPERIMENTAL. MI ETERNO RECONOCIMIENTO.

A MI HERMANO JOSÉ LUIS, POR SU PARTICIPACIÓN EN LA REALIZACIÓN DE LOS RADIOINMUNOENSAYOS.

A LA QUÍMICA AÍDA RUIZ JUVERA POR SU APOYO, ASESORÍA Y REALIZACIÓN DE ALGUNOS DE LOS RADIOINMUNOENSAYOS DE T<sub>3</sub> Y T<sub>4</sub>.

AL LICENCIADO EN AQB MARCO ANTONIO ZAMARRIPA TORRES. MI RECIENTE SEGUNDO BRAZO DERECHO EN EL LABORATORIO.

A LA DRA. AUREA OROZCO POR LA REVISIÓN Y SUGERENCIAS A LA TRADUCCIÓN DEL ARTÍCULO: Mitogenic Effects of Thyroxine and Thyrotropin-releasing Hormone on Thyrotrophs and Somatotrophs of Anterior Pituitary Gland in Thyroidectomized Rats. Journal of Endocrinology 154: 149-153. 1997.

AL LIC. EN MAT. HERNÁN AGUIRRE CAMPOS POR LA REVISIÓN Y SUGERENCIAS A LA TRADUCCIÓN DEL ARTÍCULO: Mitogenic Effects of Thyroxine and Thyrotropin-releasing Hormone on Thyrotrophs and Somatotrophs of Anterior Pituitary Gland in Thyroidectomized Rats. Journal of Endocrinology 154: 149-153. 1997.

AL M. EN C. NETZAHUALCÓYOTL CASTAÑEDA LEYVA POR SU VALIOSA AYUDA EN EL ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

A LA DRA. ZI CHENG DEL DEPTO. DE PATOLOGÍA DEL ST. MICHAEL'S HOSPITAL. TORONTO, ONTARIO. CANADA. POR LA ASESORÍA EN LOS ESTUDIOS INMUNOHISTOQUÍMICOS.

AL NIH DE LOS EUA, POR LA GENEROSA DONACIÓN DE LOS REACTIVOS PARA LA REALIZACIÓN DE LOS RADIOINMUNOENSAYOS DE TSH Y ESTUDIOS INMUNOHISTOQUÍMICOS,

A MIS QUERIDOS COMPAÑEROS, MAESTROS Y AMIGOS DEL CENTRO DE NEUROBIOLOGÍA: MARICELA, TANA, LUZ, AUREA, BRENDA, BERTHA, ADELITA, CLAUDIA, LOLITA, TERE, EDNA, MÓNICA, DR. FLAVIO MENA, DRA. SOFÍA DIAZ, DRA. ANGÉLICA SALAS.

A MI COMPAÑERO LUIS CASTILLO HERNANDEZ POR SU APOYO Y ALIENTO EN EL TRABAJO.

A MIS ESTIMADOS COMPAÑEROS DEL BIOTERIO, PLANTA FÍSICA Y MANTENIMIENTO DE EQUIPO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE AGUASCALIENTES.

A MIS PADRES POR SER LO QUE HAN SIDO Y POR SER LO QUE SOY.

A MIS HERMANOS: ANTONIO, ELENA, MA. EUGENIA, PATRICIA, SUSANA, FLORA, SOCORRO, JOSÉ LUIS, GUILLERMO, DAVID, ALBERTO Y DANIEL.

A MI AMADA ESPOSA NORMA VIRGINIA, MI COMPLEMENTO, POR DARME SU APOYO Y SU AMOR.

A MIS HIJOS: ANDREA, BERNARDO Y ELENA , QUE LLENAN PLENAMENTE MI VIDA.

A MI QUERIDA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE AGUASCALIENTES EN DONDE ME HE REALIZADO PROFESIONALMENTE.

## ACRÓNIMOS

5'D-I	ENZIMA 5' DESYODASA I
5'D-II	ENZIMA 5'DESYODASA II
ABC-P	COMPLEJO AVIDINA-BIOTINA-PEROXIDASA
ACTH	HORMONA ADRENOCORTICOTROPA, CORTICOTROPINA
AMPc	ADENOSÍN MONOFOSFATO CÍCLICO
Ca <sup>++</sup>	CALCIO
CE	CONTROL EUTIROIDEO
CG	GONADOTROPINA CORIÓNICA
CRH	HORMONA LIBERADORA DE CORTICOTROPINA
DA	DOPAMINA
DAG	1,2-DIACILGLICEROL
DNA	ACIDO DESOXIRIBONUCLÉICO
ENDOR	ENDORFINAS
FSH	HORMONA ESTIMULANTE DEL FOLÍCULO
GABA	ÁCIDO GAMMA AMINO BUTÍRICO
GH	HORMONA DE CRECIMIENTO
GHIH	SOMATOSTATINA (SS), HORMONA INHIBIDORA DE LA LIBERACIÓN DE GH
GHRF	FACTOR LIBERADOR DE GH, HORMONA LIBERADORA DE GH
GRH	HORMONA LIBERADORA DE GH
GnRH	HORMONA LIBERADORA DE GONADOTROPINAS,
H-E	HEMATOXILINA-EOSINA
HHH	HORMONAS HIPOFISIOTRÓPICAS HIPOTALÁMICAS
IM	INTRAMUSCULAR
IP	INTRAPERITONEAL
IP <sub>3</sub>	1,4,5-TRIFOSFATO DE INOSITOL
LH	HORMONA LUTEINIZANTE
LHRH	HORMONA LIBERADORA DE LH
LPH	HORMONA βLIPOTROPINA
MRH	HORMONA LIBERADORA DE MSH
MSH	HORMONA ESTIMULANTE DE LOS MELANOCITOS, MELANOTROPINA
PAS-H	ACIDO-PERYODICO-REACTIVO DE SCHIFF-HEMATOXILINA
POMC	PROOPIOMELANOCORTINA
PRL	PROLACTINA
PRLIH (PIH)	HORMONA INHIBIDORA DE LA PRL, DOPAMINA
PTU	PROPILTIOURACILO
RIA	RADIOINMUNOENSAYO
RNA <sub>m</sub>	ÁCIDO RIBONUCLÉICO MENSAJERO
SC	SUBCUTÁNEA
St	SOMATOTROPO
T <sub>3</sub>	TRIYODOTIRONINA
T <sub>4</sub>	TIROXINA, TETRAYODOTIRONINA
TRH	HORMONA LIBERADORA DE TIROTROPINA, PIROGLUTAMIL-HISTIDIL-PROLINAMIDA
TSH	TIROTROPINA, HORMONA ESTIMULANTE DE LA TIROIDES
Tt	TIROTROPO
Tx	TIROIDECTOMÍA, HIPOTIROIDISMO PRIMARIO



## RESUMEN

En este estudio, se investigó si la hormona liberadora de tirotrópina (TRH) y la tiroxina ( $T_4$ ) tienen efecto mitogénico sobre las células de la adenohipófisis, en particular sobre los tirotrópos (Tt) y somatotropos (St) en ratas Wistar macho tiroidectomizadas (Tx, hipotiroidismo) en forma aguda o crónica (5 meses). Ratas Tx 15 días antes, recibieron una dosis de TRH (25  $\mu\text{g}$  IP),  $T_4$  (10  $\mu\text{g}$  IM) o  $T_4$ +TRH (mismas dosis anteriores). Los animales se sacrificaron 12 horas después de las inyecciones. Ratas eutiroides quedaron como testigos. La histología y las cuentas mitóticas se hicieron en cortes de hipófisis teñidos con H-E, PAS-H o inmunoteñidos con anticuerpos anti TSH o GH de rata. Las mitosis (detenidas con colchicina), se cuantificaron en una área de  $1\text{mm}^2$  con una amplificación de 1000X. La tiroidectomía aumentó las cuentas mitóticas ( $p < 0.01$ ; Testigo vs tiroidectomizados). La administración de  $T_4$  disminuyó la replicación mitótica, aunque no de manera significativa. La TRH estimuló la replicación mitótica ( $11.8 \pm 1.4$  vs  $8.1 \pm 0.4$  de los Tx.  $p < 0.05$ ). Comparativamente, las cuentas mitóticas de los grupos Tx+TRH y Tx+ $T_4$ +TRH fueron semejantes. La inmunohistoquímica reveló que los tratamientos afectaron diferencialmente la replicación de los tirotrópos, somatotropos y posiblemente la de otros tipos celulares hipofisarios (células en mitosis no inmunoteñidas, CMNIT). Así, en los animales eutiroides, las mitosis ocurrieron en los somatotropos (55%), CMNIT (35%) y tirotrópos (9.5%). La Tx disminuyó la replicación de los St (NS) y estimuló la de los Tt ( $p < 0.05$  vs testigo) y CMNIT. La  $T_4$  sola, no afectó la replicación de los St y Tt y disminuyó la de las CMNIT. La administración de TRH no afectó la replicación de St y Tt, mientras que estimuló la de las CMNIT. La TRH+ $T_4$  no provocó más cambios en el número de St y Tt en mitosis y CMNIT que los encontrados con la administración de la TRH sola. Este grupo de experimentos demostró que la deficiencia aguda de hormonas tiroideas induce un incremento significativo de la replicación mitótica de los tirotrópos y CMNIT. Además, la administración de TRH, estimuló aún más la replicación de las CMNIT, mientras que los Tt y St no fueron afectados. En el hipotiroidismo crónico, 10 días antes del sacrificio, grupos de ratas Tx de 5 meses de evolución fueron tratadas con diferentes dosis de  $T_4$  (0.5, 3 o 10  $\mu\text{g}$  de  $T_4$  IM cada tercer día/10 días; TRH sola (100 ng SC 3 veces al día/10 días) o  $T_4$ +TRH (mismas dosis anteriores). Los animales se sacrificaron 24 horas después de la última inyección de  $T_4$  (4 h después de la última inyección de TRH). En los grupos Tx y Tx+TRH, las concentraciones séricas de  $T_3$  y  $T_4$  disminuyeron, mientras que las de TSH se incrementaron ( $p < 0.001$ ). En estos mismos grupos sin embargo, las cuentas mitóticas fueron semejantes a las del grupo eutiroides, como lo fueron también las cuentas mitóticas del grupo Tx+0.5  $\mu\text{g}$  de  $T_4$ . En contraste, la administración conjunta de 0.5  $\mu\text{g}$  de  $T_4$ +TRH tuvieron un efecto sinérgico estimulante de la secreción de TSH y las cuentas mitóticas. En los grupos que recibieron mayores dosis de  $T_4$  (3 y 10  $\mu\text{g}$  sin y con TRH), mientras que las cuentas mitóticas y las cifras séricas de  $T_4$  y  $T_3$  se incrementaron (niveles de hipertiroidismo), las de TSH desaparecieron. Además del efecto sinérgico sobre la proliferación hipofisaria, los tratamientos también tuvieron un efecto mitogénico diferencial sobre los tipos celulares. Así, al compararlo con el grupo control en el cual los porcentajes de St, Tt y CMNIT fueron: 31%, 10% y 58% respectivamente, en los grupos Tx y Tx+TRH, no se encontraron St en mitosis, mientras que los tipos celulares restantes no se modificaron significativamente. En contraste, cuando se administraron dosis bajas de  $T_4$  (0.5  $\mu\text{g}$ ), reaparecieron los St, desaparecieron las CMNIT y se incrementaron significativamente los Tt. Además, cuando la  $T_4$  (0.5  $\mu\text{g}$ ) se administró junto con la TRH, reaparecieron las CMNIT. Mayores dosis de  $T_4$  (10  $\mu\text{g}$ ) incrementaron las cuentas mitóticas de los St y CMNIT, mientras que disminuyeron las de los Tt. La administración de esta dosis elevada de  $T_4$  +TRH, dio lugar a un efecto sinérgico sobre la replicación de los St, inhibió la de los Tt y no afectó más la de las CMNIT. Los resultados de los experimentos con hipotiroidismo crónico demuestran que: (a) A dosis altas, la  $T_4$  estimula la replicación de los somatotropos; (b) A dosis bajas la  $T_4$  es mitogénica sobre los Tt, mientras que a dosis altas es inhibitoria; (c) *Per se*, la TRH no posee efecto mitogénico sobre la adenohipófisis y (d) Dosis elevadas de  $T_4$ +TRH, tienen efecto sinérgico sobre la replicación de los St. Conclusiones generales: (1) En el eutiroidismo, las mitosis ocurren en los St y CMNIT y menos en los Tt; (2) Durante el hipotiroidismo, disminuye la replicación celular de los St, y se incrementa en los Tt y CMNIT; (3) Además de la replicación de los fenotipos celulares específicos, la replicación de las células no inmunoteñidas en mitosis parece jugar un papel importante en los mecanismos adaptativos de la adenohipófisis disparados por las demandas fisiológicas o desbalances hormonales en los cuales está involucrada; (4) Más estudios se requieren para establecer si las células en mitosis no inmunoteñidas, corresponden a un grupo de células totipotenciales o a diferentes líneas celulares que son reclutadas en respuesta a diversas condiciones endocrinas; (5) Nuestros resultados sugieren que la transdiferenciación celular puede estar ocurriendo durante la mitosis. Lo anterior apoya que las antiguas hipótesis sobre los cambios celulares de la adenohipófisis también pueden ocurrir por transdiferenciación celular, reclutamiento de células indiferenciadas y replicación de células totipotenciales.

## SUMMARY

The aim of this study was to assess the putative mitogenic effect of thyrotropin releasing-hormone (TRH) and thyroxine ( $T_4$ ) on pituitary cells. Specifically, thyrotrophs (Tt) and somatotrophs (St) cells were analyzed in short (15 d) and protracted (5 mo) thyroidectomized (Tx) Wistar male rats. In 15 d Tx rats, groups of 5 animals each received single doses of either  $T_4$  (10  $\mu\text{g}$  IM), TRH (25  $\mu\text{g}$  IP) or both  $T_4$  plus TRH (doses as above). Animals were sacrificed 12 h after the injections. The histology and the mitotic counts were done in pituitary slides stained with H-E, PAS-H, or immunostained for TSH and GH. Mitoses (stopped with colchicine) were counted in 1  $\text{mm}^2$  area at 1000X magnification. In Tx rats, mitoses were increased ( $p < 0.01$ : euthyroid vs Tx) and the mitotic counts in Tx rats remained unmodified with a single administration of  $T_4$ . TRH increased the mitotic counts ( $11.8 \pm 1.4$  vs  $8.1 \pm 0.4$  of Tx group,  $p < 0.05$ ). Comparatively mitotic counts were similar in Tx+TRH and Tx+ $T_4$ +TRH groups. Immunocytochemistry revealed a differential effect upon St and Tt replication and possibly other pituitary cellular types as well (non immunostained mitotic cells, NISMC). Thus, in euthyroid animals mitoses occurred in St (55%), NISMC (35%) and Tt (9.5%). In the Tx group, replication was increased in Tt and NISMC and decreased in St, while  $T_4$  administration did not change St and Tt replication and it inhibited the NISMC. The distribution of mitoses between St and Tt was not significantly affected by TRH administration but it was increased in NISMC. Similarly no further changes were induced in the mitotic counts by the addition of  $T_4$ . This set of experiments demonstrated that acute thyroid hormone deficiency is accompanied by a significant increase in mitotic counts in Tt and NISMC. In addition, a single dose of TRH increased the replication of NISMC whereas Tt and St remained unchanged. In protracted Tx rats and 10 days before sacrifice, animals were treated with different doses of  $T_4$  (0.5, 3 and 10  $\mu\text{g}$  IM every other day/10 days); TRH (100 ng SC 3 times a day/10 days) or  $T_4$ +TRH (same doses as above). Animals were sacrificed 24 h after the last  $T_4$  injection (4 h after the last TRH injection). Serum  $T_4$  and  $T_3$  were decreased while TSH was increased ( $p < 0.001$ ) in Tx and Tx+TRH groups. However, in neither group mitotic counts were significantly different as compared with the euthyroid control and Tx+0.5  $\mu\text{g}$  of  $T_4$  groups. By contrast, administration of 0.5  $\mu\text{g}$  of  $T_4$  plus TRH synergistically increased both, TSH and pituitary mitotic counts. Mitotic counts were further increased in those groups receiving higher doses of  $T_4$  (3 or 10  $\mu\text{g}$  with or without TRH), in which serum  $T_4$  and  $T_3$  were abnormally high and TSH absent. Besides its synergistic effect on pituitary mitoses, treatments also had a differential mitogenic effect on cellular types. Thus, as compared to euthyroid animals, in which the ratios were: 31% St, 10% Tt and 58% NISMC, in Tx and Tx+TRH groups, there was a complete absence of St in mitoses, whereas the other cell types remained unmodified. In contrast, when low doses of  $T_4$  (0.5  $\mu\text{g}$ ) were administered, St in mitosis reappeared, Tt were significantly increased, and NISMC disappeared. Furthermore, when TRH was added to this low dose of  $T_4$ , NISMC reappeared. Higher doses of  $T_4$  (10  $\mu\text{g}$ ) further increased mitotic figures in St and NISMC, and reduced the replication of Tt. As compared with 10  $\mu\text{g}$  of  $T_4$  alone, the administration of higher doses of  $T_4$  plus TRH had a synergistic effect on St replication, further inhibited Tt replication and had no effect on NISMC. Present results in protracted Tx rats demonstrated that: (a) In high doses,  $T_4$  stimulates St replication; (b) At low doses,  $T_4$  is mitogenic on Tt while at higher doses inhibits Tt replication; (c) *per se*, TRH is devoided of a mitogenic effect on anterior pituitary gland; (d) When co-administered,  $T_4$  + TRH, had a synergistic mitogenic effect on St. General conclusions: (1) In euthyroidism, mitoses occur in St and NISMC and are less frequent in Tt; (2) During hypothyroidism, cell replication is decreased in St and increased in Tt and NISMC; (3) Besides the replication of specific cellular phenotypes, replication of non immunostained mitotic cells seems to play an important role in the pituitary gland adaptative mechanisms triggered by physiological demands and/or hormonal imbalances in which she is involved; (4) Further studies are required to establish if these NISMC correspond to a single totipotential group of cells, or they are different cellular lines that are recruited in response to diverse endocrine conditions; (5) Our results suggest that cell transdifferentiation could be occurring also during mitosis. Therefore, supporting the ancient hypotheses of pituitary cell transdifferentiation, recruitment of indifferentiated cells and totipotential cells replication in the gland.

## I. INTRODUCCIÓN

El sistema endocrino (del gr. *Endon* hacia dentro y *Krínēin* secretar, que secreta o vierte hacia el interior del cuerpo), controla las actividades metabólicas de los sistemas vivos por medio de un linaje celular específico y altamente especializado. Este linaje de células endocrinas, por lo general agrupadas en glándulas conspicuas del organismo (hipófisis, tiroides, paratiroides, adrenales, gónadas, páncreas, mucosa intestinal y placenta entre las más tradicionales), está especializado en elaborar y secretar hacia el torrente sanguíneo una serie de sustancias químicas llamadas hormonas (del gr. *hormaein* excitar, mover). Las hormonas son distribuidas por la sangre e interactúan con receptores específicos localizados en los llamados células, tejidos u órganos blanco. La interacción hormona/receptor desencadena respuestas fisiológicas típicas, generalmente opuestas al cambio que originó la secreción de la hormona. Además de su papel en el mantenimiento de la homeostasis, el sistema endocrino también participa en el control de otros importantes fenómenos como iniciar, mediar y regular los procesos de crecimiento, desarrollo, maduración, reproducción y senectud (Genuth, 1990a).

El estudio de las interacciones entre el sistema nervioso y el sistema endocrino constituye el campo de la Neuroendocrinología, en donde destacan las relaciones entre el hipotálamo, la hipófisis y los órganos blanco de las hormonas hipofisarias. Aunque el conocimiento de los mecanismos reguladores de la síntesis y secreción de las diferentes hormonas hipofisarias es relativamente amplio, menos se conoce acerca de los mecanismos que controlan los cambios poblacionales de los diferentes tipos celulares de la glándula, cambios que ocurren simultáneamente con los ajustes homeostáticos en las tasas de síntesis y secreción de las hormonas adenohipofisarias.

En el presente estudio se analizaron los efectos e interacciones de la hormona hipotalámica liberadora de tirotrópica (TRH, tiroliberina) y la hormona tiroidea, tiroxina ( $T_4$ ) sobre el control de: a) la replicación y morfología de los tirotrópicos (Tt) y somatotrópicos (St) del lóbulo anterior de la glándula pituitaria y b) la secreción de la hormona hipofisiaria estimulante de la tiroides (TSH), utilizando a la rata como modelo de estudio. Por esta razón, y con el propósito de ubicarlas en su contexto fisiológico primeramente se revisa el conocimiento actual sobre los aspectos más relevantes acerca de la fisiología y la morfología de la glándula pituitaria, haciendo énfasis en las interacciones de los elementos que conforman al eje hipotálamo-hipófisis-tiroides que participan en la regulación de los tirotrópicos. Enseguida, se describen las hipótesis, objetivos, materiales, métodos y resultados, para finalizar con la discusión de los resultados y las conclusiones más importantes. Finalmente, en los anexos 1 y 2, se incluyen los manuscritos de 2 trabajos, uno ya publicado y otro en revisión, en los que se reporta en la literatura internacional los principales hallazgos de esta tesis.

## **II. UNIDAD HIPOTÁLAMO-HIPOFISIARIA**

La glándula hipófisis o pituitaria regula directa o indirectamente diversas funciones endocrinas. A su vez, las funciones hipofisiarias están bajo el control de un gran número de factores, principalmente neurales (hipotalámicos) y de las hormonas que producen sus órganos blanco. Efectivamente, la hipófisis y el hipotálamo, con sus conexiones vasculares y neuronales especializadas, forman una unidad funcional compleja, llamada unidad hipotálamo-hipofisiaria, cuya operación pone de manifiesto las estrechas y sutiles interrelaciones entre el sistema nervioso y el sistema endocrino. La hipófisis participa en el control del balance hidroelectrolítico, la secreción de leche, el parto, la reproducción, el crecimiento y desarrollo corporal, la lactancia y de las funciones endocrinas de las glándulas tiroides, gónadas y adrenales (Resumido de Genuth, 1990a).

En el presente estudio se analizaron los efectos e interacciones de la hormona hipotalámica liberadora de tirotropina (TRH, tiroliberina) y la hormona tiroidea, tiroxina ( $T_4$ ) sobre el control de: a) la replicación y morfología de los tirotropos (Tt) y somatotropos (St) del lóbulo anterior de la glándula pituitaria y b) la secreción de la hormona hipofisiaria estimulante de la tiroides (TSH), utilizando a la rata como modelo de estudio. Por esta razón, y con el propósito de ubicarlas en su contexto fisiológico primeramente se revisa el conocimiento actual sobre los aspectos más relevantes acerca de la fisiología y la morfología de la glándula pituitaria, haciendo énfasis en las interacciones de los elementos que conforman al eje hipotálamo-hipófisis-tiroides que participan en la regulación de los tirotropos. Enseguida, se describen las hipótesis, objetivos, materiales, métodos y resultados, para finalizar con la discusión de los resultados y las conclusiones más importantes. Finalmente, en los anexos 1 y 2, se incluyen los manuscritos de 2 trabajos, uno ya publicado y otro en revisión, en los que se reporta en la literatura internacional los principales hallazgos de esta tesis.

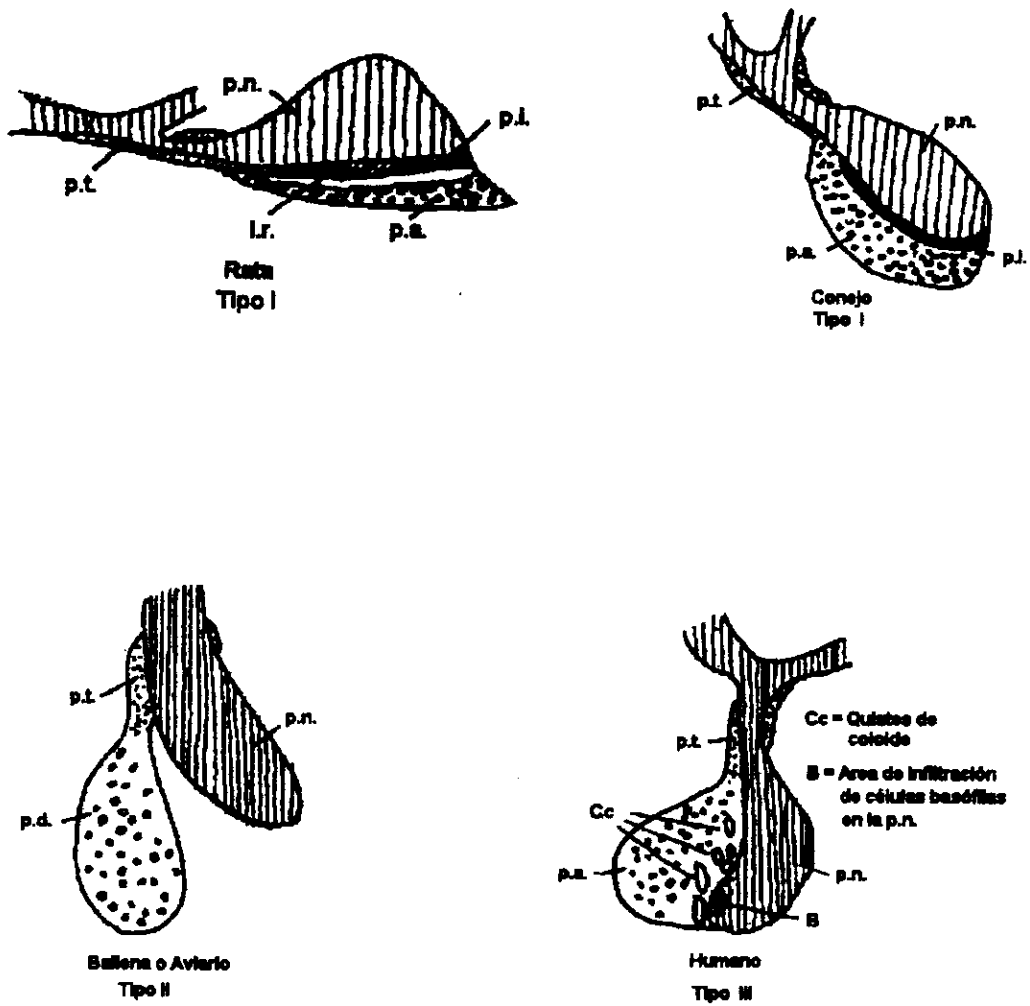
## **II. UNIDAD HIPOTÁLAMO-HIPOFISIARIA**

La glándula hipófisis o pituitaria regula directa o indirectamente diversas funciones endocrinas. A su vez, las funciones hipofisiarias están bajo el control de un gran número de factores, principalmente neurales (hipotalámicos) y de las hormonas que producen sus órganos blanco. Efectivamente, la hipófisis y el hipotálamo, con sus conexiones vasculares y neuronales especializadas, forman una unidad funcional compleja, llamada unidad hipotálamo-hipofisiaria, cuya operación pone de manifiesto las estrechas y sutiles interrelaciones entre el sistema nervioso y el sistema endocrino. La hipófisis participa en el control del balance hidroelectrolítico, la secreción de leche, el parto, la reproducción, el crecimiento y desarrollo corporal, la lactancia y de las funciones endocrinas de las glándulas tiroides, gónadas y adrenales (Resumido de Genuth, 1990a).

**Características Anatómicas de la Hipófisis.** La glándula pituitaria se encuentra localizada en una pequeña depresión del hueso esfenoides llamada silla turca, justo abajo del hipotálamo, al cual se encuentra conectada por un pequeño tallo llamado infundíbulo. Es un órgano compuesto que consiste de un lóbulo neural o posterior (neurohipófisis) y de un lóbulo anterior o adenohipófisis. En algunas especies existe un lóbulo intermedio (cuyo origen embrionario es común con el lóbulo anterior) formado por las células localizadas en la unión del lóbulo neural con el lóbulo anterior. Las distintas porciones que conforman la hipófisis derivan embriológicamente de dos primordios: la pars distalis o adenohipófisis, que proviene de una invaginación del techo del ectodermo del estomodeo llamada bolsa de Rathke, mientras que la neurohipófisis se origina de una evaginación del diencéfalo, al que queda unido por el tallo hipofisiario. Ambas estructuras se reúnen y forman la hipófisis (Purves, 1966).

En el animal desarrollado, dependiendo de la especie y sus relaciones finales con el lóbulo neural, se reconocen tres distintos tipos de hipófisis, los cuales son secundarios a la diferente evolución de la bolsa de Rathke. La presente clasificación, tomada de Purves (1966), se ha realizado con base en las siguientes características anatómicas: a) número de partes funcionales, b) variaciones en la persistencia de la luz de la bolsa de Rathke y c) variaciones en el grado de adherencia de la neurohipófisis a las porciones de la adenohipófisis con las cuales está en estrecha relación. En los vertebrados (con excepción de los peces) la hipófisis se ha clasificado en tres tipos (Figura 1).

Tipo I.- La adenohipófisis se divide en pars anterior y pars intermedia, esta última está adherida a la neurohipófisis. La luz residual de la bolsa de Rathke puede estar presente, reducida o ausente. Este tipo de hipófisis se encuentra en la rata y el conejo.



**Figura 1.- Diferentes formas de hipófisis en vertebrados.**  
 p.d. = Pars distalis, p.t. = Pars tuberalis, p.n. = Pars nervosa,  
 p.i. = Pars intermedia, p.a. = Pars anterior, l.r. = Luz residual.

Tomado de Purves (1966).

**Tipo II.-** La pars anterior y la pars intermedia se funden en una sola estructura llamada pars distalis o adenohipófisis. No hay adherencia al lóbulo neural ni existe lumen residual. Ejemplos de hipófisis con estas características se encuentran en las aves, el elefante y la ballena.

**Tipo III.-** La pars distalis está presente y adherida al lóbulo neural. Esta forma está descrita sólo en tres especies de mamíferos: el hombre, el gorila y el chimpancé.

**Embriogénesis.** Recientemente se han presentado evidencias que muestran que la adenohipófisis pudiera tener un origen nervioso, a partir del extremo anterior de la placa neural, la cual evoluciona para dar lugar a la bolsa de Rathke. Todavía no es claro si el compromiso para diferenciarse en los diferentes tipos celulares adenohipofisarios se adquiere durante el contacto inicial de los primordios embrionarios, que al desarrollarse darán origen al hipotálamo y la bolsa de Rathke, o si la diferenciación ocurre más tardíamente, inducida por los diversos factores hipofisiotrópicos hipotalámicos o de otro origen (Dubois y ElAmraoui, 1995). Durante el desarrollo intrauterino de la rata, el orden de aparición de los diversos fenotipos celulares es el siguiente: corticotropos, gonadotropos, tirotropos, somatotropos y lactotropos, los cuales aparecen completamente diferenciados a los 16, 17, 17-18, 19 y 21 días de gestación respectivamente (Dubois y Hemming, 1991).

**Interrelaciones Hipotálamo-Hipofisarias.** La irrigación y la inervación de cada uno de los lóbulos de la pituitaria refleja su origen embrionario diferente y permite comprender la regulación de sus funciones. El lóbulo posterior está ricamente inervado por fibras amielínicas que contienen gránulos secretorios en su extremo terminal. Los somas de estas neuronas se localizan en los núcleos supraópticos y paraventriculares del hipotálamo. El material secretado (hormonas antidiurética y oxitocina), es sintetizado en los somas y transportado por los axones (unido a neurofisinas) y



almacenado en las terminaciones bulbosas de la neurohipófisis. Desde aquí, el material es secretado a la red capilar que drena a la circulación general. Contrastando con lo anterior, en el lóbulo anterior sólo se han identificado escasas fibras nerviosas motoras que terminan en el lecho vascular, sugiriendo únicamente un control vasomotor (Green, 1966). En la rata y otras especies animales, la comunicación entre el hipotálamo y el lóbulo anterior es vascular. Ambas estructuras se encuentran interconectadas por el **sistema circulatorio portal hipotálamo-hipofisiario**, a través del cual la hipófisis recibe la mayor parte de su flujo sanguíneo. Las arterias hipofisiarias superiores irrigan, a través de una intrincada red de capilares llamado *plexo primario*, la eminencia media del hipotálamo. Los capilares venosos de este plexo primario convergen y forman *los vasos portales hipofisarios largos*, los cuales cursan hacia abajo por el tallo infundibular y penetran al lóbulo anterior de la hipófisis, al cual irrigan después de haber formado otro sistema capilar, llamado *plexo vascular secundario*. Por otro lado, las arterias hipofisiarias inferiores forman en la parte baja del tallo infundibular, un plexo capilar primario semejante al anterior. Estos capilares drenan en los *vasos portales cortos*, los cuales forman otro *plexo vascular* dentro del lóbulo anterior. En la rata, cerca del 70% de la sangre que recibe la adenohipófisis proviene de los vasos portales largos y el resto de los vasos portales cortos (Porter y col. 1967). Además del sistema portal, el lóbulo anterior recibe una pequeña cantidad de sangre arterial proveniente directamente de las arterias trabeculares, que son ramas de las arterias hipofisiarias superiores. La neurohipófisis es irrigada por las arterias hipofisiarias inferiores. El drenaje venoso de ambos lóbulos ocurre a través de venas cortas que desembocan en los senos cavernosos vecinos. Las terminales nerviosas de las neuronas de los diversos núcleos hipotalámicos terminan en estrecha proximidad con los plexos capilares primarios en la eminencia media y en el tallo infundibular, a donde vierten sus neurosecreciones, llamadas **hormonas hipofisiotrópicas hipotalámicas (HHH)**, las cuales son acarreadas por los vasos

portales a la adenohipófisis, en donde ejercen sus efectos fisiológicos (Reichlin, 1992; Goodman, 1994a).

**Hormonas y Células de la Adenohipófisis.** Las funciones endocrinas de la adenohipófisis están bien establecidas. Actualmente se sabe que esta parte de la pituitaria sintetiza y secreta cuando menos ocho diferentes sustancias de naturaleza protéica con actividad hormonal, las cuales por sus características bioquímicas se agrupan en tres grandes familias. La familia de la *proopiomelanocortina* (POMC) que incluye a su vez tres péptidos principales: la corticotropina (ACTH), las melanotropinas  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  (MSH), y péptidos opioides del grupo de las endorfinas. La familia de las *somatotropinas*, que incluye a la hormona del crecimiento (GH) y a la prolactina (PRL). La familia de las *glucoproteínas* comprende a la hormona estimulante del folículo (FSH), la hormona luteinizante (LH) y la hormona estimulante de la tiroides (tirotropina, TSH) (Resumido de Goodman, 1988a) (Cuadro 1).

Con el advenimiento de la inmunocitoquímica y microscopía electrónica (Horvath y col, 1990) se ha puesto en evidencia que más de una hormona hipofisiaria puede encontrarse en un mismo tipo celular tanto en condiciones normales como experimentales y/o patológicas. Así, por ejemplo en animales normales, la FSH y la LH se pueden encontrar en un mismo tipo celular, al que se le ha llamado gonadotropo (Baker, 1974), la PRL y la GH en los mamotropos (Porter y col, 1990) y las células POMC que dan origen a la ACTH,  $\beta$ -lipotropina, MSH y endorfinas (Pantic, 1975; Kriger y Liotta, 1990). No obstante, como se resume en el Cuadro 2, los tipos celulares se siguen nombrando en atención a la hormona que producen: somatotropos, hormona de crecimiento (GH); mamotropos, prolactina (PRL); corticotropos, corticotropina u hormona adrenocorticotrópica (ACTH); melanotropos, hormona estimulante de los melanocitos (MSH); foliculotropos, hormona folículoestimulante

CUADRO 1

HORMONAS DE LA ADENOHIPÓFISIS Y SUS FUNCIONES

HORMONA	ÓRGANO BLANCO	ACCIONES PRINCIPALES
<b>Familia Glucoprotéica</b>		
Hormona estimulante de la tiroides (TSH)	Glándula tiroides	Estimula la síntesis y secreción de las hormonas tiroideas.
Gonadotropinas: Hormona Foliculo estimulante (FSH)	Ovario	Estimula el crecimiento folicular y la secreción de progesterona.
	Testículo	Actúa sobre las células de Sertoli promoviendo la maduración de los espermatozoides.
Hormona Luteinizante (LH)	Ovario	Estimula la ovulación del folículo maduro y formación del cuerpo lúteo; estimula la síntesis de estrógenos y progesterona por el cuerpo lúteo.
	Testículo	Estimula en las células intersticiales de Leydig la síntesis y secreción de testosterona.
<b>Familia de la Somatomamotropina</b>		
Hormona del crecimiento (GH)	La mayoría de los tejidos	Promueve el crecimiento en estatura y masa; estimula la producción de somatomedina; estimula la síntesis de proteína; usualmente inhibe la utilización de glucosa y promueve la utilización de grasa.
Prolactina (PRL)	Glándula mamaria Ovario (rata)	Promueve la secreción de leche. Promueve la secreción de progesterona.
<b>Familia de la proopiomelancortina</b>		
Hormona adrenocorticotropica (ACTH)	Corteza adrenal	Promueve la síntesis y secreción de corticosteroides.
Hormona estimulante de los melanocitos ( $\alpha$ -MSH) (Kriger y Liotta, 1990)	Melanocitos	Dispersión de melanina en anfibios. Desconocido en mamíferos adultos
$\beta$ -Lipotropina	Desconocido	Papel fisiológico desconocido
$\beta$ -Endorfina	Desconocido	Papel fisiológico desconocido

Adaptado de Goodman (1994a).

## CUADRO 2

### Características tintoriales e inmunoultraestructurales de los diferentes tipos celulares adenohipofisarios

TIPO CELULAR	HORMONA	COLORACIÓN DE GRANULOS CITOPLÁSMICOS		INMUNOELECTROMICROSCOPIA (diámetro de los gránulos en nm)
		PAS-OG	PFA-AB	
Lactotropos	PRL	Amarillo	Amarillo	350 - 500
Somatotropos	GH	Amarillo-Naranja	Amarillo	275 - 350
Corticotropos	LPH ACTH MSH	Rojos	Rojos	375 - 550
Melanotropos (pars intermedia en la rata)	MSH	Rojos	—	375-550
Gonadotropos	FSH LH	Rojos	Azules	200 - 500
Tirotropos	TSH	Rojos	Azules	100 - 200

PAS-OG = Ácido peryódico-reactivo de Schiff-Naranja G

PFA-AB =Ácido perfórmico-Azul Alciano

Adaptado de Valverde RC. y Montes VJ., (1989)

(FSH); luteotropos, hormona luteinizante (LH); tiotropos, tiotropina u hormona estimulante de la tiroides (TSH) (Baker, 1974).

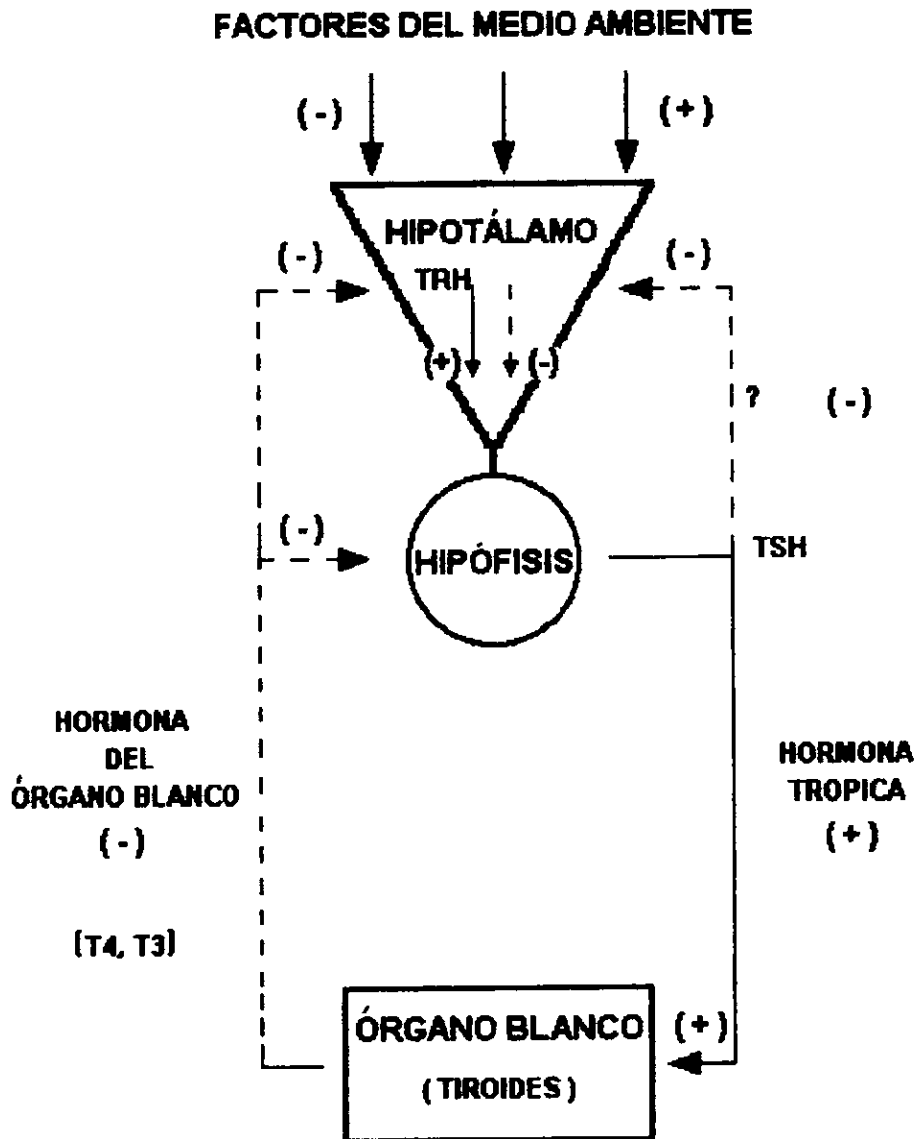
En años recientes se ha acumulado evidencia que muestra que además de las hormonas trópicas, las células adenohipofisarias pueden sintetizar y secretar una gran diversidad de otros péptidos y mensajeros endocrinos. Así, por ejemplo; la activina, inhibina y angiotensina II se encuentran en los gonadotropos; la galanina, angiotensina II, acetilcolina y péptido intestinal vasoactivo (VIP) en los mamotropos; la sustancia P, neuropéptido Y, galanina y VIP en los tiotropos; galanina, TRH (Bruhn y col, 1994a, 1994b, 1994c) y folistatina en los somatotropos; la acetilcolina, cromogranina A y colecistocinina en los corticotropos (Rehfeld, 1988, Aronin y col, 1988; Huben y Deneff, 1990 y Schwartz y Cherny, 1992). Las funciones de estos péptidos no han sido completamente dilucidadas, pero están relacionadas con el control local (paracrino y/o autocrino) de: 1) la secreción de hormonas trópicas, 2) el crecimiento, la diferenciación y la regeneración celular, 3) la microcirculación de la adenohipófisis y 4) las interacciones inmuno-neuroendocrinas (Heuben y Deneff, 1990; Schwartz y Cherny, 1992).

### **CONTROL DE LAS FUNCIONES DEL LÓBULO ADENOHIPOFISIARIO.**

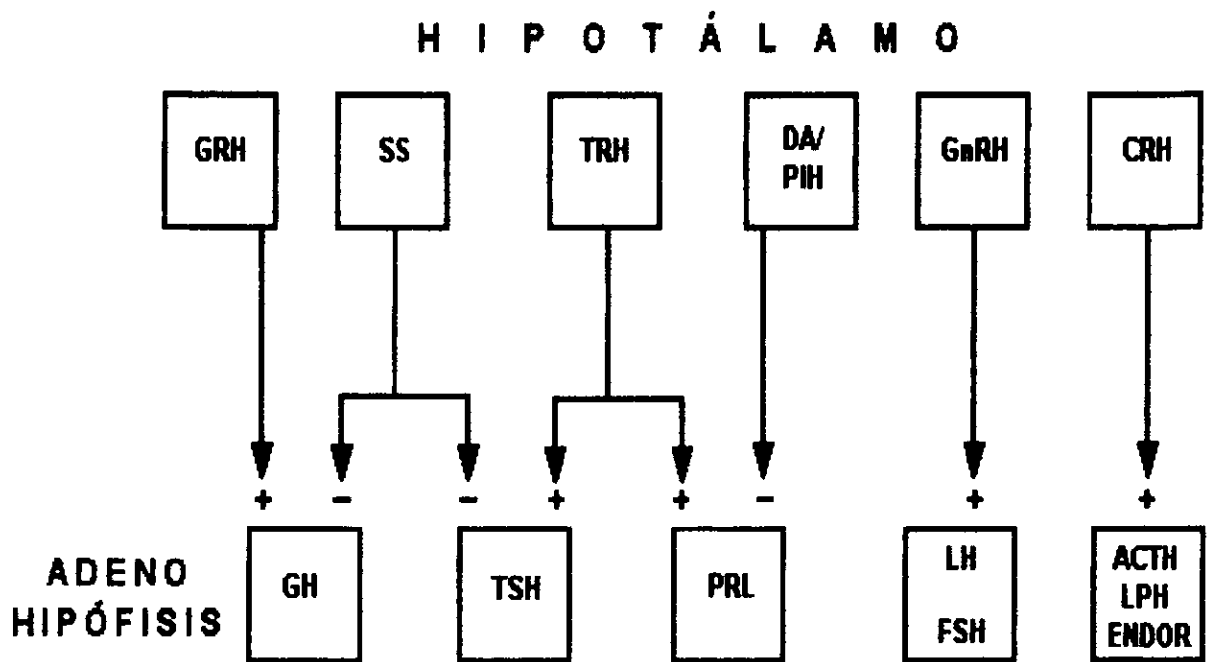
No obstante la capacidad autónoma de la adenohipófisis para sintetizar y liberar tanto *in vivo* como *in vitro*, PRL (Everett, 1956; Tixer-Vidal y col, 1975a) y FSH (Tixer-Vidal y col, 1975b; Hattori y col, 1986), se sabe que en el control de la síntesis y secreción de todas las hormonas hipofisarias participan un gran número de factores que en forma de señales neurocrinas, paracrinas y endocrinas interactúan a nivel del lóbulo anterior. Estos factores se pueden agrupar de la siguiente manera:

a) **Hormonas Producidas por los Órganos Blanco.** En este grupo se incluyen las hormonas tiroideas y los esteroides de origen suprarrenal y gonadal; así como otras hormonas elaboradas por los órganos blanco vgr., somatomedina e inhibina. Todas estas hormonas participan en los llamados mecanismos de retroalimentación negativa y positiva por medio de los cuales pueden inhibir, o estimular a las células adenohipofisarias (retroalimentación directa), o a las neuronas hipofisiotrópicas hipotalámicas (Pantic, 1975; Reichlin, 1992) (Figura 2).

b) **Hormonas Hipotálamo-Hipofisiotrópicas (HHH).** Bajo esta designación se agrupan un conjunto de neuropéptidos sintetizados en los somas de las neuronas hipotalámicas, desde donde fluyen por el axón (empacados en forma de gránulos secretorios) hasta las terminales de la telodendria axónica, las cuales a su vez quedan en estrecha proximidad con el plexo capilar primario hipotálamo-hipofisario, en donde liberan su contenido para estimular o inhibir la síntesis y secreción de las hormonas hipofisarias. Excepto la dopamina, que es un neurotransmisor cuyo mecanismo de síntesis es diferente, la mayoría de estas hormonas hipofisiotrópicas hipotalámicas son neuropéptidos (véase Guyton y Hall, 1996). Entre estas, las más conocidas son las siguientes: hormona liberadora de GH (GHRH), hormona inhibidora de GH (GHIH o somatostatina); hormona liberadora de ACTH (CRF o CRH), hormona liberadora de MSH (MRH), hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH, LHRH), hormona liberadora de TSH (TRH o tiroliberina), hormona liberadora de PRL (PRH) y hormona inhibidora de PRL (dopamina) (Grant y Vale, 1974; Schally y col, 1978; Reichlin, 1992). Se sabe que una misma hormona hipofisiotrópica hipotalámica puede estimular o inhibir la secreción de más de una hormona adenohipofisaria (Gill, 1991). En la Figura 3 se resumen los efectos secretores de algunas de las hormonas hipofisiotrópicas hipotalámicas sobre los diferentes tipos celulares de la adenohipófisis.



**Figura 2.- Regulación de la secreción de las hormonas adenohipofisiarias. Eje Hipotálamo-hipófisis-tiroides.**



**Figura 3.- Regulación de las funciones de las células adenohipofisarias por algunos de los factores hipofisiotrópicos hipotalámicos.**



**c) Neurotransmisores y Otros Péptidos.-** La dopamina, noradrenalina, serotonina, GABA y acetilcolina (que se sintetizan en el citosol de las terminales nerviosas) (Guyton y Hall, 1996) y péptidos opioides (Porter y col, 1990) son liberadas por neuronas hipotálamicas y neuronas aferentes al hipotálamo y que llegan a la adenohipófisis por el sistema circulatorio portal (Porter y col, 1990). Estas sustancias al parecer actúan regulando o modulando la respuesta de las células hipofisarias a las demás hormonas hipotalámicas hipofisiotrópicas, o a las hormonas de los órganos blanco de las hormonas hipofisarias (Krush, 1982; Tuomisto y Manisto, 1985; Aronin y col, 1988; Huben y Deneff, 1990).

**d) Posibles Mecanismos de Control Autocrino y Paracrino.** Las hormonas elaboradas por un tipo celular adenohipofisiario pueden afectar a nivel local tanto su propia síntesis y secreción (efectos autocrinos), como los de otras hormonas producidas por otros tipos celulares de las hipófisis (efectos paracrinos). Ejemplos de lo anterior lo constituyen los hallazgos de Kakita y col, (1984) y Hattori y col, (1986) para la TSH. Además de sintetizar y secretar sus respectivas hormonas periféricas, los diversos tipos celulares de la adenohipófisis sintetizan y secretan otro tipo de polipéptidos como; la activina, inhibina, folistatina, diversas interleucinas, citokinas, sustancias vasogénicas, galanina, TRH, diversos factores de crecimiento como factor de crecimiento epidermal, factor de crecimiento transformante  $\alpha$ , factores de crecimiento semejante a insulina I y II, etc., los cuales como se mencionó anteriormente, regulan autocrina o paracrinamente muchas de las funciones adenohipofisarias (Huben y Deneff; 1990; Schwartz y Cherny, 1992; Bruhn y col, 1994a, 1994b, 1994c; Renner y col, 1996; Leblanc y col, 1997).

## **EJE HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS-TIROIDES**

Las funciones de las hormonas tiroideas, tiroxina ( $T_4$ ) y triyodotironina ( $T_3$ ), se pueden dividir en dos tipos: a) las relacionadas con el crecimiento y desarrollo de los individuos, y b) las relacionadas con el control del metabolismo energético. Como se esquematiza en la Figura 2, el control preciso de las concentraciones sanguíneas y los requerimientos tisulares de hormonas tiroideas depende de la interacción coordinada del hipotálamo, la hipófisis y la glándula tiroidea; así como de la desyodación órgano-específica de las tironinas. La señal inicial de la secreción de hormonas tiroideas comienza en el hipotálamo por medio de la secreción de la TRH, proveniente de las neuronas de la porción parvicelular de los núcleos paraventriculares, que estimula la síntesis y secreción de TSH en los tirotropos. Poco o nada de TSH se produce cuando se destruye la zona hipotalámica hipofisiotrópica o cuando se secciona el tallo hipofisiario (Ishikawa y col, 1987; Taylor y col, 1990; Schwartz y Cherny 1992), o cuando la hipófisis es transplantada a un sitio alejado del control hipotalámico directo (Beddow y col, 1970; Amr y col, 1986; Schwartz y Cherny, 1992). La TSH constituye a su vez la señal más importante en el control de las funciones tiroideas, incluyendo el incremento de la captura de yodo y la síntesis y secreción de ambas tironinas. A continuación, por un mecanismo de retroalimentación inhibitoria la  $T_4$  y  $T_3$  circulantes inhiben directamente en los tirotropos la síntesis y secreción de TSH y en el hipotálamo la síntesis y secreción de TRH. Así, la administración de pequeñas cantidades de  $T_4$  y  $T_3$  inhiben, en la hipófisis, la secreción de TSH, exactamente hasta el nivel necesario para restablecer los valores normales de las hormonas tiroideas. Por el contrario, cualquier factor que provoque una disminución en las concentraciones plasmáticas de las hormonas tiroideas, dará lugar a un incremento en la secreción de TSH (Goodman, 1988b y McNabb, 1992).

## **MECANISMOS QUE CONTROLAN LA SÍNTESIS Y SECRECIÓN DE TSH**

La mayoría de los estudios sobre el control de la secreción de TSH, analizan la "secreción" de la hormona dando por sentado que tanto la síntesis como la liberación están acopladas y pueden ser consideradas como una unidad. Es posible que este concepto sea válido cuando ambos fenómenos se encuentran en equilibrio, es decir, cuando la intensidad de la síntesis sea equivalente a la liberación, esto sin importar si los mecanismos que las regulan sean los mismos (McNabb, 1992).

De los diferentes factores que regulan la síntesis y secreción de TSH, las hormonas tiroideas y la TRH son los más importantes. Esta noción, ha dado lugar al concepto del "tirostato" como una analogía con los sistemas de servomecanismos de control, ubicando el centro de la unidad a nivel del propio tirotripo (Goodman, 1988b).

**Estructura y Síntesis de TSH.** La TSH es una hormona glucoprotéica con peso molecular de 28 kd. Es un heterodímero que contiene aproximadamente 15% de carbohidratos. La TSH está compuesta de dos cadenas peptídicas denominadas  $\alpha$  y  $\beta$ , unidas entre si por un enlace no covalente. Aunque la subunidad  $\beta$  es la responsable de la unión a los receptores específicos de TSH y de la actividad biológica sobre el tirocito, se requiere de la molécula completa para que estos fenómenos puedan ocurrir. La subunidad  $\alpha$  de la TSH es semejante a la subunidad  $\alpha$  de las hormonas glucoprotéicas LH, FSH y gonadotropina coriónica (CG). En las diferentes especies estudiadas se ha encontrado que los genes que codifican para ambas subunidades de TSH, se localizan en cromosomas diferentes (McNabb, 1992). Los oligosacaridos juegan un papel muy importante en la organización estructural de la molécula completa ya que una vez secretada le confieren una mayor resistencia a la degradación metabólica (vida media más prolongada) (Ponsin y Mornex, 1983; Taylor y Weintraub, 1985; Constant y Weintraub 1986 (discutido por Wondisford y col, 1996). Asimismo, la

glucosilación de la TSH es un factor determinante de su actividad biológica (Fares y col, 1996). En el tirotripo, la glucosilación de la TSH tiene lugar durante el proceso de traducción de las subunidades individuales y es seguido por un procesamiento postraduccional de los polisacáridos en la molécula completa. En el retículo endoplásmico rugoso, durante la traducción, oligosacáridos con alto contenido de manosa son incorporados a las subunidades individuales. En seguida, en el aparato de Golgi, los fragmentos de carbohidrato enlazados a la asparagina, son procesados formando oligosacáridos complejos que contienen ácido siálico, sulfato, glucosa, galactosa y residuos de N-acetilglucosamina y N-acetilgalactosamina. Las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  glucosiladas se aparean en los gránulos de secreción o en la membrana plasmática formándose inicialmente un complejo laxo inactivo. En seguida, en estos mismos sitios, tiene lugar una reacción de primer orden, en donde la molécula se repliega lentamente para terminar en forma de dímero estable (Morley, 1981; Wondisfor y col, 1996).

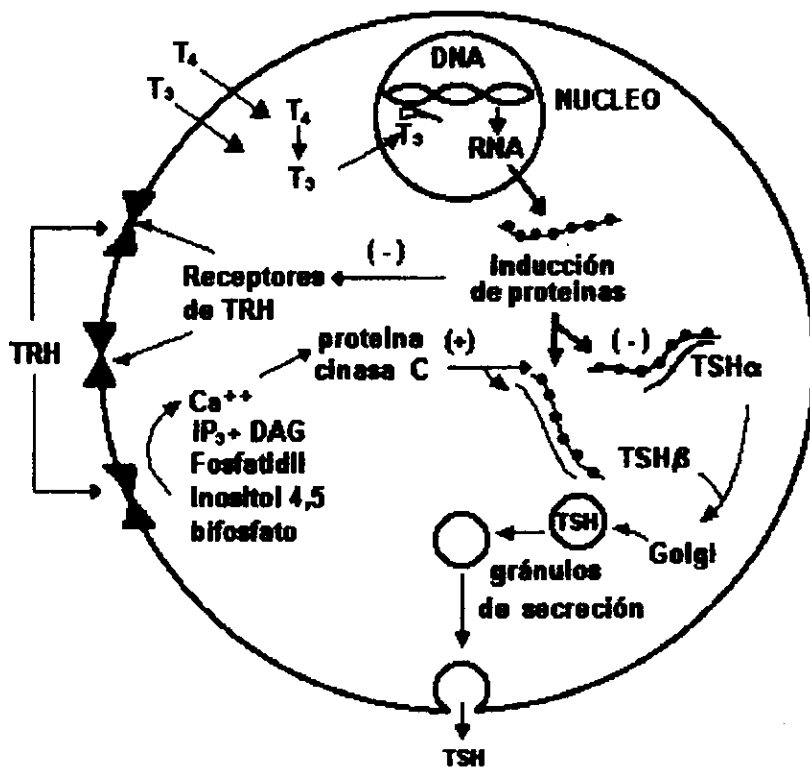
#### **Control de la Síntesis y Secreción de la TSH por las Hormonas Tiroideas.**

Las hormonas tiroideas constituyen el factor inhibidor más importante en el control de la síntesis y secreción de la TSH. Esta inhibición ocurre por diferentes mecanismos, el más importante es el mediado por la  $T_3$ , que inhibe la expresión de los genes que codifican para la formación de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de la molécula de TSH. Para que esto ocurra, la  $T_3$  y la  $T_4$  circulantes difunden hacia el interior del tirotripo. En el tirotripo la  $T_4$  es convertida a  $T_3$  por acción de las 5'-desyodasas I y II (5'DI y 5'DII), de las cuales la 5'DII aporta el 50% de la  $T_3$  que se enlaza específicamente a sus receptores nucleares (Kaplan, 1984; St. Germain y col, 1985). La  $T_3$  se une al extremo carboxi-terminal de su receptor nuclear, dando lugar al complejo  $T_3$ -receptor activo. Este complejo activado se une a una secuencia específica de nucleótidos en los genes blanco correspondientes, inhibiendo la transcripción del DNA en mRNA que codifica para las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de la TSH (Franklyn y col, 1986, 1987). Esta inhibición se

incrementa en proporción al número de receptores nucleares de  $T_3$  ocupados (Emerson y col, 1989; Gurr y col, 1990; Shupnik y Ridway, 1987; revisado por Scanlon, 1996) (Figura 4). Otros efectos de las hormonas tiroideas sobre el control del tirotrópo involucran: a) la reducción del número de receptores a TRH en la membrana del tirotrópo (vide infra) y b) la estimulación de la síntesis de la piro-glutamil peptidasa II, ectoenzima membranal de los mamotropos, que inactiva a la TRH (Bauer, 1987; Ponce y col, 1988; Bauer y col, 1990). Por ambos mecanismos las tironinas inhiben el efecto estimulante de la TRH sobre sus respectivos receptores (De Léan y col, 1977; Mori y col, 1988; Toft, 1991; Scanlon, 1996).

A nivel hipotalámico (núcleos paraventriculares) las hormonas tiroideas disminuyen las concentraciones de TRH (Yamada y col, 1989). Asimismo, inhiben la síntesis del RNAm que codifica para la TRH en las neuronas parvicelulares del núcleo paraventricular (Dyess y col, 1988; Taylor y col, 1990, revisado por Stevenin y Lee, 1995), lo que se traduce en una disminución en la secreción de TRH en la sangre portal (Rondeel y col, 1988; Okauchi y col, 1996) y un menor estímulo en la síntesis y secreción de la TSH. Por otro lado, en el hipotiroidismo la ausencia de hormonas tiroideas da lugar a un incremento tanto en la síntesis de mRNA que codifica para la TRH (Scanlon, 1996), como un incremento de la secreción de TRH hacia la sangre portal (Rondeel y col, 1992; Wang y col, 1994), lo que se traduce en un mayor estímulo en la síntesis y secreción de TSH. No obstante lo anterior, se considera que los efectos inhibitorios de las hormonas tiroideas sobre los tirotrópos, constituyen el factor más importante en el control global de la TSH (Morley, 1981; McNabb, 1992; Jackson, 1994).

**Control de la Síntesis y Secreción de la TSH por la Somatostatina.** La somatostatina, también llamada factor inhibidor de la secreción de GH (SS, GHIF), es un neuropéptido sintetizado y secretado por los núcleos periventriculares del



**Figura 4.- Representación del efecto de la TRH y Tironinas sobre el tirotropo.** La TRH se enlaza a receptores localizados en la superficie del tirotropo y activa la Fosfolipasa C, la cual rompe al fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato en Trifosfato de Inositol (IP<sub>3</sub>) y Diacilglicerol (DAG). El IP<sub>3</sub> promueve la movilización de Ca, mientras que el DAG activa a la proteína Cinasa C. Por otro lado, las tironinas T<sub>4</sub> y T<sub>3</sub> difunden hacia el tirotropo. En el interior, una desyodasa convierte a la T<sub>4</sub> en T<sub>3</sub>. La T<sub>3</sub> entra al núcleo y se une a receptores nucleares. Estos receptores activados, inhiben la transcripción de diferentes porciones de DNA; unos que codifican la formación de receptores de TRH (disminuyendo la sensibilidad de los tirotropos a la TRH), y otros que codifican la síntesis de TSH. Viceversa, una deficiencia de las tironinas incrementa la sensibilidad de los tirotropos a la TRH. Esto, debido al incremento en la transcripción de los genes que codifican para la formación de receptores de TRH y para la síntesis de TSH.

Adaptado de Goodman (1988b).

hipotálamo. Además de su efecto inhibitorio sobre la secreción de la GH, también juega un papel inhibitorio (aunque menos importante que sobre la GH) directo sobre la secreción de TSH e indirecto sobre las neuronas TRHérgicas de los núcleos paraventriculares del hipotálamo (Jackson, 1994). No obstante, en situaciones particulares la somatostatina puede tener un efecto inhibidor relevante en la secreción de TSH, como en la respuesta al estrés (Jackson 1994). Sin embargo, como se mencionó anteriormente, se considera que los efectos inhibitorios de las hormonas tiroideas sobre los tirotrapos, constituyen el factor más importante en el control global de la TSH (Morley, 1981; McNabb, 1992; Jackson, 1994).

**Control de la Síntesis y Secreción de la TSH por la TRH.** La TRH (piroglutamil-histidil-prolinamida, tiroliberina (Schally, 1978) es el factor más importante en el control de la secreción de la TSH. Esta noción se basa en los siguientes hechos: 1) En el hipotiroidismo primario, en los nucleos paraventriculares del hipotálamo, se incrementa el la síntesis del RNAm que codifica para la TRH (Taylor y col, 1990; revisado por Stevenin y Lee, 1995) y la secreción de TRH (Rondeel y col, 1992; Wang y col, 1994), 2) El hipotiroidismo hipotalámico experimental (destrucción o deaferentación de los núcleos paraventriculares del hipotálamo responsables de la síntesis y secreción de la TRH hipofisotrópica), provoca una significativa disminución de la síntesis y secreción de la TSH (Aizawa y col, 1984; Murakami y col, 1988; 1988; Taylor y col, 1990), 3) La administración de anticuerpos anti-TRH disminuye la secreción de TSH (Zabo y Frohman, 1977; Koch y col, 1977, Ishikawa y col, 1984), 4) La secreción basal de TSH cae casi a cero cuando la hipófisis es autotransplantada a sitios alejados del control hipotalámico directo y responde secretando TSH cuando se estimula con TRH (Lippman y col, 1986; Amr y col, 1986).

A nivel del tirotrapo, la TRH se une a receptores membranales específicos activando a una fosfolipasa C, la que a su vez cataliza la hidrólisis del fosfatidilinositol

4,5-bifosfato dando dos productos: 1,2-diacilglicerol (DAG) y 1,4,5-trifosfato de inositol (IP<sub>3</sub>). El IP<sub>3</sub> difunde hacia el retículo endoplásmico en donde se enlaza a receptores específicos relacionados a canales de Ca<sup>++</sup> dependientes de ligando. La interacción del IP<sub>3</sub>-receptor provoca la apertura de los canales de Ca<sup>++</sup>, lo que permite su difusión hacia el citosol. El Ca<sup>++</sup> libre junto con el DAG, actúan como segundos mensajeros que activan a la protein-quinasa C (C significa dependiente de calcio), la que a su vez fosforila diversas enzimas blanco (Shupnik y col, 1990; Carr y col, 1991). Algunas de estas enzimas regulan el grado de glucosilación de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de la TSH, hecho que influye en las formas moleculares de TSH que se producen. El grado de glucosilación de la TSH determina su bioactividad y rapidez de depuración plasmática (revisado por Magner, 1990). El Ca<sup>++</sup> libre en el citosol estimula directamente la liberación de TSH por exocitosis (Lehninger, 1993) (Figura 4). Además de lo anterior, Carr y col, (1991) han encontrado evidencia que muestra que la TRH estimula la síntesis de TSH, fenómeno mediado por los segundos mensajeros DAG y el Ca<sup>++</sup>, que estimulan al gen que codifica para la subunidad  $\beta$  de la molécula de TSH.

Los efectos de una sola dosis, de dosis repetidas o de la perfusión continua de TRH sobre la secreción de TSH, han sido estudiados en humanos y animales eutiroides, hipotiroideos e hipotiroideos con y sin tratamiento concomitante con hormonas tiroideas (Jaquet y col, 1974; Rabello y col, 1974; Saberi y Utiger, 1975; Fischer y col, 1977; Frey y Haug, 1977; Lippman y col, 1986; Tonooka y Greer, 1980; Maruta y Greer, 1987; Ishikawa y col, 1987; Toft, 1991). En general, la duración y magnitud de la respuesta secretora de TSH a un pulso de TRH, depende del estado funcional de la glándula tiroides, edad, dosis y vía de administración del tripéptido (Rabello y col, 1974; Lippman y col, 1986; Ishikawa y col, 1987; Maruta y Greer, 1987). En la rata eutiroides, el patrón de respuesta a un pulso de TRH inyectado por vía endovenosa, se caracteriza por un rápido y significativo incremento de la secreción de TSH, la cual alcanza valores sanguíneos máximos alrededor de los 15 minutos, y



disminuye a valores basales a los 60 minutos. La elevación inicial es rápida y los valores a los 5, 10, 15 y 20 minutos no son significativamente diferentes, aunque las medias muestran una curva relativamente uniforme alcanzando la máxima concentración a los 15 minutos. Inmediatamente después de iniciada la secreción de TSH en respuesta a la TRH, las cifras circulantes de  $T_4$  y  $T_3$  se incrementan, alcanzando valores máximos entre las 3-4 horas, y regresan a los valores basales alrededor de las 8 horas (Lippman y col, 1986). La administración de pulsos repetitivos o la perfusión continua de TRH durante períodos de tiempo cortos o prolongados, sobre las concentraciones plasmáticas de TSH y hormonas tiroideas también han sido estudiados. Así, a corto plazo (1-8 días), la infusión continua de TRH, da lugar a un incremento inicial de la TSH, semejante al descrito para el pulso único con el tripéptido, para disminuir a niveles ligeramente más elevados que en el control. Este ligero incremento de la TSH plasmática, se acompaña de un hipertiroidismo discreto (Lippman y col, 1986). Dosis repetidas de TRH inducen inicialmente una respuesta secretora de TSH semejante al pulso único. Los pulsos subsecuentes de TRH, inducen respuestas decrecientes de TSH, que se pueden acompañar o no de hipertiroidismo discreto (Nemeroff y col, 1980). Los efectos de la administración repetitiva TRH a largo plazo sobre el eje hipófisis-tiroides se caracteriza por la repuesta secretora de TSH y el hipertiroidismo inicial, para continuar después de una a dos semanas, con: 1) concentraciones plasmáticas de TSH dentro de los valores normales, 2) disminución creciente de la respuesta secretora de TSH a los pulsos subsecuentes de TRH y 3) concentraciones plasmáticas de hormonas tiroideas normales, o alguna de ellas ligeramente elevada o disminuida (Jaquet y col, 1974; Rabello y col, 1974; Saberi y Utiger, 1975; Fischer y col, 1977; Klindt y col, 1979; Nemeroff y col, 1980; Lippman y col, 1986; Amr y col, 1986).

En el hipotiroidismo primario, la respuesta secretora de TSH a la TRH está aumentada y aunque no es una regla, la magnitud de la secreción de TSH está

generalmente en función de las concentraciones circulantes de las hormonas tiroideas, que constituyen el factor más importante en el control del número de receptores membranales de TRH del tiotropo que serán ocupados por el tripéptido. En el control del número de receptores a TRH participan al menos dos mecanismos generales: a) uno relacionado con la endocitosis del complejo TRH/receptor el cual puede ser lisado o dar lugar a la respuesta fisiológica específica; o bien reincorporarse a la membrana plasmática, al separarse de la TRH y b) por la estimulación o inhibición de los genes que regulan la síntesis de los receptores de TRH. Entre los diferentes factores que participan en la regulación de la síntesis, el número y el recambio de los receptores de TRH se incluyen, además de las hormonas tiroideas, a la TRH misma y algunos agentes que aumentan la concentración intracelular de AMPc (revisado por Gershengorn y Osman, 1996). Se ha demostrado que las hormonas tiroideas constituyen el factor más importante en el control del número de receptores de TRH (De Léan y col, 1977; Tonooka y Greer, 1980; Amr y col, 1986; Mori y col, 1988). Así, en el hipotiroidismo primario la disminución de las hormonas tiroideas en el plasma, da lugar a un incremento en el número de receptores de TRH del tiotropo, lo que explica en gran medida el incremento en la respuesta secretora de TSH a la TRH en los individuos hipotiroideos. Por el contrario, un incremento de las hormonas tiroideas en el plasma o en el medio de cultivo, inducen una disminución en el número de receptores a TRH (De Léan y col, 1977; Tonooka y Greer, 1980; Hinkle y col, 1981; Amr y col, 1986; Mori y col, 1988). Por otro lado, Fujimoto y col (1991), han descrito un efecto inhibitor de la TRH sobre sus propios receptores, sugiriendo que el fenómeno puede estar mediado por la proteín-cinasa C, que induce una disminución del mRNA que codifica la síntesis de los receptores a TRH. Finalmente, Ikeda y Greer (1993), describieron que la perfusión continúa de TRH en ratas hipotiroideas produce una estimulación inicial pasajera de la secreción de TSH, la cual regresa a los valores previos, permaneciendo en este estado refractario hasta que la dosis de TRH perfundida se incrementa, produciéndose un incremento en la secreción de TSH de

menor magnitud que en la respuesta inicial, para disminuir nuevamente a las concentraciones iniciales de TSH a pesar de la perfusión continua de mayor dosis de TRH. Estos investigadores sugieren que la insensibilidad de los tirotopos a la perfusión continua con TRH, puede deberse a la existencia de tirotopos con diferente umbral de respuesta a la TRH. De los estudios anteriores, se puede decir que la refractoriedad de la respuesta secretora de TSH a la estimulación repetitiva con TRH puede ser explicada en función de: 1) los niveles elevados de las hormonas tiroideas secretadas en respuesta a la elevación de la TSH inducida inicialmente por la TRH, las cuales, por retroalimentación negativa inhiben a nivel del tirotrofo la secreción de TSH (Amr y col, 1986; Goodman, 1988b; Genuth, 1990c) y 2) el efecto inhibitorio de la TRH misma sobre el número de sus propios receptores en el tirotrofo (Nemeroff y col, 1980; Spencer y col, 1980 (citado por Toft , 1991), Morley, 1981; Fujimoto y col, 1991).

## **REACTIVIDAD CELULAR ADENOHIPOFISIARIA E HIPOTIROIDISMO PRIMARIO**

La adenohipófisis de las ratas normales ha sido clasificada como un órgano de baja actividad proliferativa y ninguna renovación celular (Leblond y Walker, 1956 (citado por Baker, 1974; Astier y col, 1980 y Childs y col, 1995). Sin embargo, la participación de la mitosis en el mantenimiento de la población celular hipofisiaria es sugerida por la presencia de mitosis ocasionales, de células en estado de degeneración y por el incremento que ocurre en el número relativo de los tipos celulares secretorios durante diferentes situaciones fisiológicas; vgr, lactancia y ciclo estral, o bien cuando los animales son sometidos a diferentes condiciones experimentales como la tiroidectomía, castración y adrenalectomía. Se ha aceptado en forma general, que los factores que controlan la síntesis y secreción de las hormonas del lóbulo anterior son los mismos que regulan la proliferación de los diversos tipos celulares que lo componen, es decir, las hormonas hipotalámicas hipofisotrópicas por

un lado y las hormonas de las glándulas periféricas por el otro (Pawlikowski y col, 1995).

La adenohipófisis de diversas especies animales exhibe una gran reactividad morfofuncional a una amplia variedad de estímulos, es decir, responde con profundos cambios histológicos y citológicos, así como cambios en la intensidad de la síntesis y secreción de las diversas hormonas que produce (Purves, 1966; Herlant, 1964; Costoff, 1973; Baker, 1974). Así, en la rata sometida a situaciones de deficiencia y por lo tanto de gran demanda de una hormona determinada, como en el hipotiroidismo, el hipogonadismo y el hipocorticismo suprarrenal, la adenohipófisis responde incrementando la síntesis y secreción de las hormonas TSH, FSH, LH y ACTH respectivamente. Esta hipersecreción hormonal adenohipofisiaria se acompaña además de cambios citológicos entre los que destacan: 1) la hipertrofia e hiperplasia de un tipo celular específico 2) cambios en el contenido celular de gránulos secretorios y 3) modificación del número de otros tipos celulares. Los factores más importantes que participan en estas respuestas son, la deficiencia de las hormonas tiroideas, gonadales y glucocorticoides adrenales (Herlant, 1964; Purves, 1966; Costoff, 1973; Baker, 1974; Tixer-Vidal, 1975; DeFesi y col, 1979; Horvat y col, 1990; Astier y col, 1980), y las correspondientes hormonas hipofisiotrópicas; TRH (Kunert-Radek y Pawlikowski, 1975; Dubois y Hemming, 1991), GnRH (Sakai y col, 1988; Lewis, 1986) y CRH (Westlund, 1985; Gertz, 1987; McNicol, 1988; Childs, 1995).

En el hipotiroidismo primario, además de la hipersecreción de TSH, la hipertrofia y la hiperplasia de los tirotrópos, la reactividad hipofisiaria también se acompaña de una importante disminución en la secreción de GH (Peake y col, 1973; Varela y col, 1991; Morreale de Escobar y col, 1993) y del número de somatotropos (Costoff, 1973b; Baker, 1974; Surks y col, 1977; DeFesi y col, 1979; Astier y col, 1980; Horvath y col, 1990).

## SECRECIÓN DE TSH Y GH EN EL HIPOTIROIDISMO PRIMARIO

*Secreción de TSH.*- La disminución en las concentración plasmática de las hormonas tiroideas se conoce con el nombre de hipotiroidismo. Cuando esta reducción de debe a causas inherentes a la glándula tiroides, se le conoce como *hipotiroidismo primario*. Entre los factores mejor conocidos que producen hipotiroidismo primario se encuentran la agenesia o aplasia de la glándula, la tiroidectomía, la deficiencia de yodo en la dieta y la administración de drogas que bloquean la captura de yodo por la glándula (vgr, perclorato), o su organificación al bloquear su incorporación a las moléculas de tirosina de la tiroglobulina (vgr, propiltiouracilo y metimazol) (Greenspan, 1994).

Los efectos de la tiroidectomía sobre la síntesis y secreción de TSH han sido descritos en la rata por Bakke y Lawrence (1964) y Spira y col (1979a, 1979b, 1981, 1986). Estos últimos autores describen los cambios cronológicos en el contenido hipofisiario y concentración plasmática a TSH en el hipotiroidismo de larga duración. Inicialmente (4 días), ocurre una caída en el contenido hipofisiario de TSH, con un incremento posterior paulatino, de tal manera que tres meses después de la tiroidectomía, el contenido hipofisiario de TSH regresa a los valores basales y continúa elevándose hasta alcanzar un valor máximo (50% por encima de los animales testigo), alrededor de los 4 meses después del tratamiento. A partir de los cuatro meses se inicia un lento descenso en la concentración de la hormona, de tal manera que a los seis meses de la tiroidectomía, el contenido hipofisiario de TSH ha disminuido a los valores encontrados en el grupo eutiroideo. Simultáneamente a los cambios hipofisarios, la tiroidectomía provocó cambios inmediatos en la concentración plasmática de TSH, la cual se incrementó uniformemente, de tal manera que a las cuatro semanas alcanzó un valor máximo equivalente a 63 veces el valor inicial. A partir de este momento se inicia un lento descenso en la concentración plasmática de

la hormona, aunque al cabo de seis meses de la tiroidectomía, las cifras son 30 veces mayores que las del grupo testigo.

Spira y col (1979b, 1981), Spira y Gordon (1986) mostraron que una sola inyección de  $T_3$  a ratas tiroidectomizadas de cinco días o tres meses de evolución post quirúrgica, tiene efectos inhibitorios sobre la síntesis y secreción de la TSH, con un corto período de latencia (minutos). Sin embargo la inhibición no ocurre simultáneamente sobre ambos procesos. Primero se inhibe la secreción, dando lugar a que mientras el contenido hipofisiario de TSH aumenta sus cifras plasmáticas disminuyen. La duración y magnitud de estos efectos son dependientes de la dosis de  $T_3$ . Resultados semejantes en ratas tiroidectomizadas, o tratadas con PTU y diferentes dosis de  $T_4$ , fueron descritos anteriormente por Bakke y Lawrence (1964).

El efecto de retroalimentación inhibitoria de las hormonas tiroideas sobre la síntesis y secreción de TSH es bien conocido sin embargo, existen datos paradójicos tanto en humanos como en animales hipotiroideos, en los que la administración de pequeñas dosis de hormonas tiroideas en lugar de inhibir, estimulan la secreción de TSH (Sellers y col, 1953; Teir y col, 1956; Sellers y Schonbaum, 1957; Yamada, 1959; Bakke y Lawrence, 1964; Aizawa y col, 1975 (citados por Tonooka y Greer, 1980), Ridgway y col, 1979 (citado por Toft, 1991); Morley, 1981). Aunque no se conoce el mecanismo de este fenómeno, se ha sugerido que la respuesta de la TSH puede deberse al efecto estimulante que pequeñas dosis de hormonas tiroideas ejercerían sobre el metabolismo energético del tirotripo, lo que se traduce en un incremento de la síntesis y secreción de TSH (Morley 1981; Toft, 1991; Wondisford y col, 1996). Este fenómeno no fué corroborado por Tonooka y Greer (1980).

*Secreción de GH.*- El hipotiroidismo se acompaña de una marcada disminución de la secreción de GH, efecto que es revertido por la administración de las hormonas

tiroideas (Franklyn y col, 1986, 1987; Lloyd y col, 1990; Miki y col,1995; Tam y col, 1996). En el somatotropo las hormonas tiroideas estimulan la tasa de síntesis y secreción de la GH a través de la regulación de la expresión de los receptores membranales para el factor liberador de la GH (GHRF) (Miki y col,1995; Tam y col, 1996), así como la maquinaria sintética de GH (Franklyn y col, 1986, 1987; Lloyd y col, 1990).

A nivel hipotalámico las hormonas tiroideas también regulan la tasa de síntesis y secreción de otras hormonas hipofisiotrópicas hipotalámicas (vide supra para la TRH). Así, la deficiencia de hormonas tiroideas induce por un lado, la expresión de los genes que codifican para el factor liberador de la GH (Tam y col, 1996) y por el otro inhibe la expresión de los genes que codifican para la somatostatina hipofisiotrópica (Tam y col,1996).

### **MORFOLOGÍA HIPOFISIARIA EN EL HIPOTIROIDISMO PRIMARIO Y EFECTOS DE LA T<sub>3</sub>**

Los cambios en la morfología del lóbulo anterior de la hipófisis durante el hipotiroidismo primario son bien conocidos y están ampliamente documentados. El peso hipofisario de las ratas hipotiroideas se incrementa en asociación con la hipertrofia y la hiperplasia de los tirotrópos, la aparición de las llamadas células de la tiroidectomía, y disminución de los somatotropos (Costoff, 1973; Baker, 1974; Surks y col, 1977; Horvath y col, 1990, y Ozawa, 1991). Conforme el hipotiroidismo progresa, los cambios histológicos y la tasa de proliferación celular de los tirotrópos, inicialmente intensa, van declinando conforme se prolonga la deficiencia de hormonas tiroideas hasta alcanzar, alrededor de los 30 días, un estado de equilibrio estable. Un cambio simultáneo, pero en sentido opuesto, ocurre con la replicación de los somatotropos, los cuales disminuyen en número hasta casi desaparecer (Surks y col, 1977; DeFesi y col,

1979 y Astier y col, 1980). Estos cambios son revertidos por la inyección de hormonas tiroideas (Baker, 1974; DeFesi y col, 1979; Astier y col, 1980; Horvath y col, 1990; Ozawa, 1991).

Astier y col (1980), al estudiar la cinética de la síntesis de DNA y su relación con la replicación de los tirotrópos y somatotropos durante el desarrollo del hipotiroidismo, así como su reversión al eutiroidismo por la administración de  $T_3$ , observaron que los somatotropos y tirotrópos de ratas hipotiroideas (tiroidectomizadas 30 días antes) tratadas con  $T_3$  (10  $\mu\text{g}/100$  g PC/IP) por 1, 2, 5, 10 y 20 días, incrementaron a los 2 y 5 días del tratamiento, la incorporación de timidina en los somatotropos 18 y 55 veces respectivamente el valor de los testigos hipotiroideos (Fig. 5). El tratamiento continuo durante diez días, disminuyó la incorporación de timidina a un valor semejante al encontrado al segundo día de tratamiento. Aunque la incorporación de timidina en los somatotropos continuó disminuyendo, al final del experimento la incorporación fue ocho veces mayor a la del grupo testigo hipotiroideo. Por otro lado, la incorporación de timidina marcada en los tirotrópos al primero, segundo y quinto día de tratamiento, *no se alteró de manera significativa* (Astier y col, 1980). Sin embargo, como se puede observar en la Fig. 5 (Fig. 10 de su trabajo), la incorporación de timidina en los tirotrópos en respuesta a la  $T_3$ , aumentó hasta alcanzar al quinto día, el doble del valor pretratamiento. El tratamiento continuado de  $T_3$  por 10 y 20 días indujo, inhibición de la incorporación de timidina en los tirotrópos hasta alcanzar a partir del décimo día, valores menores al 10% con respecto al testigo hipotiroideo. Estos resultados nos llevan a sugerir que en la rata tiroidectomizada, el tratamiento sustitutivo con  $T_3$ , estimula inicialmente la replicación de los tirotrópos.

Del trabajo anterior (Astier y col, 1980), también destaca que tanto durante el desarrollo del hipotiroidismo como durante su reversión al eutiroidismo con  $T_3$ , además de los cambios en la incorporación de timidina en los tirotrópos y somatotropos, en



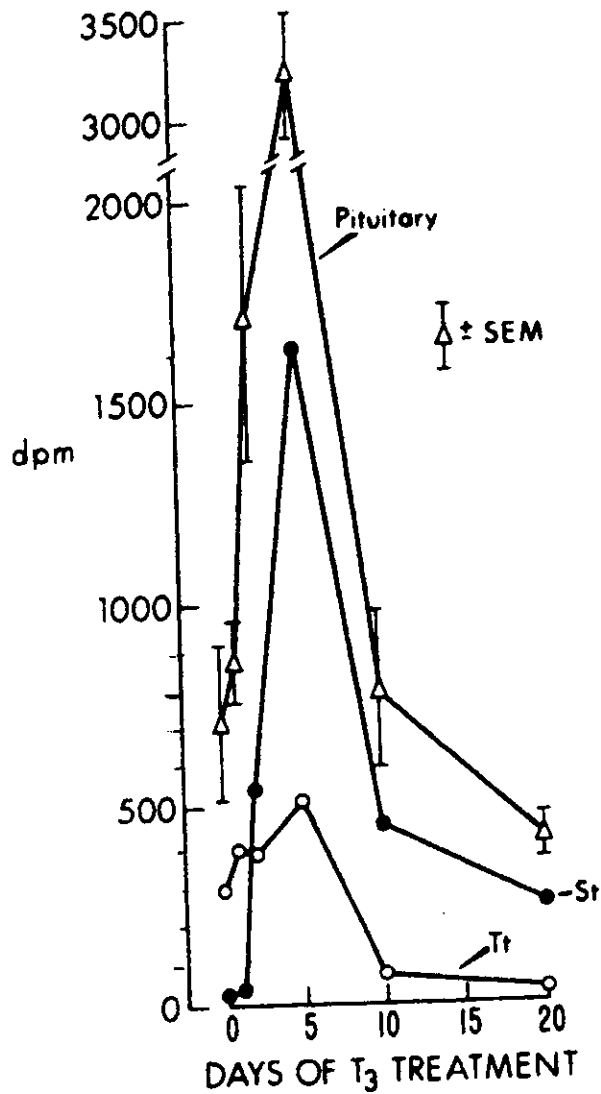


FIG. 10. [<sup>3</sup>H]Thymidine incorporation into pituitary, St, and Tt during T<sub>3</sub> treatment of thyroidectomized rats. Plotted are the disintegrations per min/pituitary (±SEM: Δ-Δ) and disintegrations per min in Tt (○-○) and St (●-●). DNA was calculated as the product of disintegrations per min per pituitary and the percentage distribution of these cells at the indicated time points.

**Figura 5.- Tomado de Astier HS, DeFees CR y Surks MI. (1980). Kinetics of deoxiribonucleic acid synthesis and replication on thyrotrophs and somatotrophs during development of hypothyroidism and L-triiodothyronine treatment of hypothyroid rats. Endocrinology, 106:1537-1548.**

estos estados tiroideos también ocurre una incorporación significativa de timidina en los demás fenotipos celulares (50% del total de la timidina incorporada en las células hipofisiarias); sobre todo en las células foliculares, células agranulares y principalmente en aquellas cuyo fenotipo no pudo ser identificado. Este resultado nos permite sugerir que en los diferentes estados tiroideos, la replicación de estos fenotipos celulares podría formar parte de los mecanismos homeostáticos que regulan las poblaciones relativas celulares de la hipófisis.

Primeramente sugerido por Astier y col (1981), recientemente Ozawa y Kurosumi (1993), informaron que en el hipotiroidismo, además de los cambios típicos en los tirotrópos y somatotropos, ocurre atrofia de los mamotropos y que la administración simultánea de T<sub>4</sub> y TRH, revierte la atrofia de los mamotropos a la normalidad o inclusive llegan a la hipertrofia. Cabe mencionar que en este último trabajo no se estudió la replicación celular.

Todo lo anterior, apoya el concepto de que las hormonas tiroideas participan en el control de la replicación celular hipofisiaria.

### **EFFECTOS MITOGÉNICOS DE LA TRH SOBRE LA ADENOHIPÓFISIS**

Las hormonas hipofisotrópicas hipotalámicas GnRH, GHRH y CRH tienen efectos mitogénicos específicos sobre los gonadotropos (Horacek y col, 1989; Sakai y col, 1988), somatotropos y mamotropos (Stefaneanu y col, 1989) y corticotropos (McNicol y col, 1988; Childs y col, 1995), respectivamente. En cambio, aunque el efecto mitogénico de la TRH sobre la adenohipófisis ha sido demostrado (Kunert-Radek y Pawlikowski, 1975; Pawlikowski y Slowinska-Klencka, 1994), un efecto específico sobre la replicación específica de los tirotrópos no ha sido confirmado (Komolov y col, 1978, 1985; Rappay y col, 1980).

Kunert-Radek y Pawlikowski (1975) describieron en ratas tiroidectomizadas de 10 días de evolución, que una dosis de TRH (25 µg IP) incrementa de manera significativa el número de mitosis en el lóbulo anterior hipofisiario. Este aumento observado a las 12 horas de la inyección de TRH, fue seguido de una disminución de la replicación celular a las 24 horas. Estos mismos efectos se observaron en fragmentos de hipófisis de ratas eutiroideas en cultivo de órganos, así como la inhibición del efecto proliferativo de la TRH por las hormonas tiroideas y la somatostatina (Pawlikowski y col, 1975, 1978).

En 1994, Pawlikowski y Slowinska-Klencka, describieron nuevamente el efecto mitogénico de la TRH cuando a animales eutiroideos se les inyectó una dosis elevada del tripéptido (100 µg/kg de peso SC). El resultado fue un aumento significativo en la incorporación nuclear de la bromo-deoxiuridina (la cual es utilizada como marcador de la replicación celular). En este trabajo demuestran además, que una sustancia aislada del colon de la rata y el ratón y estructuralmente parecida a la TRH (forma amidada del factor inhibidor de la mitosis del colon, CMI-NH<sub>2</sub>, pGlu-His-Gly-NH<sub>2</sub>), también posee efecto mitogénico sobre las células del lóbulo anterior de la hipófisis. Recientemente Pawelczyk y col, (1996), utilizando la incorporación nuclear de bromo-deoxiuridina, describen que una inyección de TRH (100 µg/kg de peso) estimula significativamente la proliferación celular en la pars intermedia de la hipófisis. Estos autores sugieren que el efecto mitogénico puede ser indirecto debido a que: a) no se han descrito receptores de TRH en las células de la pars intermedia b) la inyección de PRL o TSH *per se* estimularon de una manera significativa la replicación de las células de la pars intermedia. Según Komolov y col, (1978), el efecto proliferativo de la TRH sobre las células del lóbulo anterior *in vitro* sólo se observó en células "epitelioides" y "células parecidas a fibroblastos", pero no en tirotropos. Komolov y col, (1980, 1985) describen que en las células adenohipofisiarias en cultivo, la TRH estimula la síntesis total de DNA pero no la replicación de fenotipos celulares específicos y llegan a la conclusión

de que la TRH posee efecto mitogénico en otros tipos celulares y que es sólo efectiva para inducir la secreción de TSH y prolactina.

Heritier y Dubois (1993, 1994) observaron en cultivos de primordios hipofisarios (bolsa de Rathke) de embriones de rata de 11 días de gestación, que la incorporación de TRH o de GnRH o ambos al medio de cultivo, induce la diferenciación de diversos fenotipos celulares adenohipofisarios, lo que indica que algunos factores hipotalámicos hipofisiotrópicos pueden inducir la diferenciación de más de un fenotipo celular hipofisario. Tomados en conjunto, estos estudios apoyan el concepto de que algunas de las hormonas hipofisiotrópicas hipotalámicas poseen actividad mitogénica sobre algunos fenotipos celulares específicos y otras como la TRH podrían tener un efecto proliferativo sobre diversos tipos celulares de la adenohipófisis.

### **III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA EXPERIMENTAL**

De los mecanismos e interacciones hormonales entre los elementos del eje hipotálamo-hipófisis-tiroides e hipotálamo-hipófisis-tiroides-somatotropos, descritos en los párrafos anteriores, destacan los siguientes hechos:

1) Las hormonas tiroideas:

a) Ejercen un efecto de retroalimentación negativa sobre la síntesis y secreción de la TSH y de la TRH hipotalámica hipofisiotrópica.

b) Inhiben el efecto proliferativo de la TRH sobre las células del lóbulo anterior de la hipófisis.

c) Modulan el efecto estimulante de la TRH sobre la síntesis y secreción de la TSH.

d) Regulan la síntesis y secreción de GH, el número de somatotropos y la síntesis y secreción de GHRH y somatostatina.

de que la TRH posee efecto mitogénico en otros tipos celulares y que es sólo efectiva para inducir la secreción de TSH y prolactina.

Heritier y Dubois (1993, 1994) observaron en cultivos de primordios hipofisarios (bolsa de Rathke) de embriones de rata de 11 días de gestación, que la incorporación de TRH o de GnRH o ambos al medio de cultivo, induce la diferenciación de diversos fenotipos celulares adenohipofisarios, lo que indica que algunos factores hipotalámicos hipofisiotrópicos pueden inducir la diferenciación de más de un fenotipo celular hipofisario. Tomados en conjunto, estos estudios apoyan el concepto de que algunas de las hormonas hipofisiotrópicas hipotalámicas poseen actividad mitogénica sobre algunos fenotipos celulares específicos y otras como la TRH podrían tener un efecto proliferativo sobre diversos tipos celulares de la adenohipófisis.

### **III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA EXPERIMENTAL**

De los mecanismos e interacciones hormonales entre los elementos del eje hipotálamo-hipófisis-tiroides e hipotálamo-hipófisis-tiroides-somatotropos, descritos en los párrafos anteriores, destacan los siguientes hechos:

1) Las hormonas tiroideas:

a) Ejercen un efecto de retroalimentación negativa sobre la síntesis y secreción de la TSH y de la TRH hipotalámica hipofisiotrópica.

b) Inhiben el efecto proliferativo de la TRH sobre las células del lóbulo anterior de la hipófisis.

c) Modulan el efecto estimulante de la TRH sobre la síntesis y secreción de la TSH.

d) Regulan la síntesis y secreción de GH, el número de somatotropos y la síntesis y secreción de GHRH y somatostatina.

**2) A nivel hipofisiario la TRH:**

- a) Estimula la síntesis de TSH.**
- b) Es el factor estimulante de la secreción de TSH.**
- c) Estimula la síntesis de receptores de TRH en el tirotropo.**
- d) Estimula la proliferación de diversos tipos celulares.**
- e) Se sabe que la TRH estimula la secreción de GH.**

**3) Durante la instalación del hipotiroidismo primario en la rata:**

**a) El balance de la tasa de síntesis/almacenamiento y secreción de TSH exhibe un curso temporal complejo, en el que inicialmente predomina la secreción sobre la síntesis y el almacenamiento; posteriormente ocurre una inversión del fenómeno y predomina la síntesis y el almacenamiento sobre la secreción; al cabo de seis meses alcanza un balance permanente en el que nuevamente predomina la secreción de TSH sobre la síntesis y el almacenamiento.**

**b) Mientras persista la deficiencia de hormonas tiroideas, la síntesis y secreción de la GH disminuye rápidamente y permanece en estas condiciones.**

**4) Aunque el control inhibitorio que ejercen las hormonas tiroideas sobre la síntesis y secreción de TSH está bien establecido, existe información en la que paradójicamente, el tratamiento substitutivo con hormonas tiroideas a pacientes o animales hipotiroideos, da lugar a un incremento inicial en la secreción de TSH. Se ha especulado que esta respuesta se debe al incremento en el metabolismo energético de los tirotropos estimulado por las hormonas tiroideas. Así, es posible que exista un estado funcional particular en que las interacciones más sutiles de las hormonas tiroideas con el tirotropo determinan en que momento estas estimulan o inhiben la secreción de TSH.**

5) En la rata la celularidad adenohipofisaria y en particular la de los tirotrópos y somatotrópos, se caracteriza por:

a) En el eutiroidismo la relación tirotrópos/somatotrópos es de  $\cong 1:5$  y prácticamente no ocurre la replicación de los tirotrópos.

b) Durante el desarrollo del hipotiroidismo, la relación tirotrópos/somatotrópos se invierte por la replicación de los tirotrópos y la disminución de los somatotrópos.

c) En el hipotiroidismo de larga evolución, la relación tirotrópos/somatotrópos alcanza un estado estable de  $\cong 2:1$  hacia las 4 semanas post-tiroidectomía y persiste en estas condiciones al menos durante un año.

d) La administración de hormonas tiroideas durante 15-20 días a los animales hipotiroides, revierte a los valores eutiroides las poblaciones celulares de tirotrópos, que disminuyen y la de los somatotrópos, que se incrementan.

6) En las ratas hipotiroides el incremento inicial y pasajero de la incorporación de timidina marcada por los tirotrópos en respuesta al tratamiento con  $T_3$ , permite sugerir que la replicación celular puede ser parte de la respuesta de los tirotrópos durante la reversión al eutiroidismo.

7) Durante el desarrollo del hipotiroidismo, así como durante su reversión al eutiroidismo producido por la administración de  $T_3$ , la mitad de la timidina marcada incorporada en la adenohipófisis se observó en las células foliculares, células agranulares y principalmente en las que el fenotipo no pudo identificarse. Esto nos lleva a sugerir que además de los cambios respectivos en los tirotrópos, somatotrópos y mamotrópos, los demás fenotipos celulares de la adenohipófisis proliferan en respuesta a los cambios en las concentraciones plasmáticas de las hormonas tiroideas.

8) Según la información disponible no ha sido bien estudiada la interacción entre las hormonas tiroideas y la TRH en el control del número de tirotrópos y somatotrópos.

9) Durante el desarrollo del hipotiroidismo primario ocurre una situación opuesta entre la actividad metabólica de los tejidos periféricos, que disminuye, y la del eje hipotálamo-tirotrópo, que se incrementa, lo que resulta en:

- a) el aumento de la síntesis y secreción de TRH y TSH.
- b) el aumento del número de receptores TRHérgicos del tirotrópo.
- c) la hipertrofia e hiperplasia de los tirotrópos.

10) En el hipotiroidismo crónico los cambios morfológicos adenohipofisarios así como la síntesis y secreción de TSH alcanzan un estado estable; es posible que en el hipotiroidismo crónico, las tasas de síntesis y secreción de TRH también alcancen un estado estable.

#### **IV. HIPÓTESIS**

1) Dado que ha sido demostrado el efecto mitogénico específico de la GnRH, GHRH y CRH sobre los gonadotrópos, somatotrópos y corticotrópos respectivamente; que el efecto mitogénico de la TRH sobre las adenohipófisis parece ser inespecífico; que durante el desarrollo inicial del hipotiroidismo la tasa de replicación de los tirotrópos se incrementa significativamente y que la administración de un pulso de TRH incrementa aun más el número de células hipofisarias que se dividen, el conteo diferencial de los tirotrópos y somatotrópos en mitosis, nos permitirá establecer si la TRH posee o no un efecto mitogénico específico sobre estos tipos celulares.



8) Según la información disponible no ha sido bien estudiada la interacción entre las hormonas tiroideas y la TRH en el control del número de tirotrópos y somatotrópos.

9) Durante el desarrollo del hipotiroidismo primario ocurre una situación opuesta entre la actividad metabólica de los tejidos periféricos, que disminuye, y la del eje hipotálamo-tirotrópo, que se incrementa, lo que resulta en:

- a) el aumento de la síntesis y secreción de TRH y TSH.
- b) el aumento del número de receptores TRHérgicos del tirotrópo.
- c) la hipertrofia e hiperplasia de los tirotrópos.

10) En el hipotiroidismo crónico los cambios morfológicos adenohipofisarios así como la síntesis y secreción de TSH alcanzan un estado estable; es posible que en el hipotiroidismo crónico, las tasas de síntesis y secreción de TRH también alcancen un estado estable.

#### **IV. HIPÓTESIS**

1) Dado que ha sido demostrado el efecto mitogénico específico de la GnRH, GHRH y CRH sobre los gonadotrópos, somatotrópos y corticotrópos respectivamente; que el efecto mitogénico de la TRH sobre las adenohipófisis parece ser inespecífico; que durante el desarrollo inicial del hipotiroidismo la tasa de replicación de los tirotrópos se incrementa significativamente y que la administración de un pulso de TRH incrementa aun más el número de células hipofisarias que se dividen, el conteo diferencial de los tirotrópos y somatotrópos en mitosis, nos permitirá establecer si la TRH posee o no un efecto mitogénico específico sobre estos tipos celulares.

Ya que al inicio del tratamiento del hipotiroidismo con hormonas tiroideas primero estimulan la replicación de los tirotrópos, el conteo diferencial de las mitosis en estos tipos celulares en respuesta a un pulso de  $T_4$ , nos permitirá establecer si la proliferación inicial de los tirotrópos forma parte de la respuesta del hipotiroidismo al tratamiento con hormonas tiroideas.

Por lo tanto, si en el hipotiroidismo la respuesta proliferativa inicial de los tirotrópos al tratamiento con  $T_3$  es mediado por la  $T_3$  y por la TRH endógena, es posible que la co-administración de  $T_4$  y TRH tengan un efecto sinérgico pasajero sobre la replicación de los tirotrópos.

En el animal hipotiroideo, el tratamiento con hormonas tiroideas estimula la replicación de los somatotropos. Si la TRH juega algún papel en la regulación de la replicación de los somatotropos deberá ocurrir un incremento de las mitosis en este tipo de células en respuesta a la co-administración de TRH y  $T_4$ .

2) En el hipotiroidismo de larga evolución, en el que la secreción de TSH y la tasa de recambio celular han alcanzado un estado estable, es posible que la administración de pequeñas cantidades de hormonas tiroideas estimulen la síntesis y secreción de TSH por un mecanismo en el que las tironinas primero estimularían el metabolismo energético del tirotrópo, lo que se traduciría en un aumento de la síntesis de TSH y del número de receptores de TRH, incrementando así la sensibilidad de los tirotrópos a las diferentes acciones de la TRH. Dosis mayores de hormonas tiroideas ejercerían los efectos inhibidores correspondientes. Si lo anterior es cierto, se puede esperar que en el hipotiroidismo crónico, la administración repetitiva de TRH no afectará la replicación de los tirotrópos ni la secreción de TSH, mientras que la administración de pequeñas dosis de hormonas tiroideas las estimularán sólo de manera discreta. Además, también es posible que la co-administración de TRH y

pequeñas cantidades de hormonas tiroideas estimulen más intensamente la replicación de los tirotrópos y la secreción de TSH.

3) Está bien establecido que en el hipotiroidismo la síntesis y secreción de GH y el número de somatotropos disminuye y que la administración de las hormonas tiroideas revierte estos cambios. Si la TRH participa en el control de la replicación de los somatotropos, la administración de TRH y hormonas tiroideas a animales hipotiroideos, incrementará el número de somatotropos en mitosis.

## **V. OBJETIVOS**

1) Estudiar en ratas tiroidectomizadas de corta evolución los efectos de un pulso de TRH, T<sub>4</sub> o TRH+T<sub>4</sub>, sobre la proliferación celular adenohipofisaria y en particular de los tirotrópos y somatotropos

2) Estudiar en ratas tiroidectomizadas de larga evolución, los efectos de la administración repetitiva de TRH, T<sub>4</sub> o TRH+T<sub>4</sub>, sobre la secreción de TSH, la proliferación celular adenohipofisaria y en particular de los tirotrópos y somatotropos.

pequeñas cantidades de hormonas tiroideas estimulen más intensamente la replicación de los tirotrópos y la secreción de TSH.

3) Está bien establecido que en el hipotiroidismo la síntesis y secreción de GH y el número de somatotropos disminuye y que la administración de las hormonas tiroideas revierte estos cambios. Si la TRH participa en el control de la replicación de los somatotropos, la administración de TRH y hormonas tiroideas a animales hipotiroideos, incrementará el número de somatotropos en mitosis.

## **V. OBJETIVOS**

1) Estudiar en ratas tiroidectomizadas de corta evolución los efectos de un pulso de TRH,  $T_4$  o TRH+ $T_4$ , sobre la proliferación celular adenohipofisiaria y en particular de los tirotrópos y somatotropos

2) Estudiar en ratas tiroidectomizadas de larga evolución, los efectos de la administración repetitiva de TRH,  $T_4$  o TRH+ $T_4$ , sobre la secreción de TSH, la proliferación celular adenohipofisiaria y en particular de los tirotrópos y somatotropos.

## **Experimento I**

**Objetivo 1.-** Estudiar en ratas tiroidectomizadas de corta evolución los efectos de un pulso de TRH,  $T_4$  o TRH+ $T_4$ , sobre la proliferación celular adenohipofisaria y en particular de los tirotrópos y somatotrópos.

**Justificación.-** Con este experimento se pretende analizar si existe una interacción entre la  $T_4$  y la TRH en el control de la proliferación celular adenohipofisaria, en particular de los tirotrópos y somatotrópos en el hipotiroidismo de corta evolución.

## **VI. MATERIAL Y MÉTODOS**

**Animales y Tiroidectomía.-** Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar, de 7 semanas de edad ( $186 \pm 21$  g de peso). Previa anestesia con éter etílico, los animales fueron tiroparatiroidectomizados quirúrgicamente.

**Manipulación Experimental.-** Los animales tuvieron libre acceso al agua y al alimento estándar (Purina chow para rata). El agua de beber se suplementó con lactato de calcio al 1%. Los ciclos de luz-oscuridad se ajustaron a 12X12 hs (luces encendidas a las 7 hs) y la temperatura del cuarto a  $23 \pm 2^\circ\text{C}$ . Los testigos eutiroides se mantuvieron con agua corriente y alimento estándar. Todos los tratamientos se iniciaron a los 15 días de la tiroidectomía. Las ratas se dividieron en los siguientes grupos de 5 animales cada uno:

- 1) Testigo Eutiroides + Solución salina
- 2) Tiroidectomizados + Solución salina
- 3) Tiroidectomizados + TRH
- 4) Tiroidectomizados +  $T_4$
- 5) Tiroidectomizados +  $T_4$  + TRH

## **Experimento I**

**Objetivo 1.-** Estudiar en ratas tiroidectomizadas de corta evolución los efectos de un pulso de TRH,  $T_4$  o TRH+ $T_4$ , sobre la proliferación celular adenohipofisaria y en particular de los tirotrópos y somatotrópos.

**Justificación.-** Con este experimento se pretende analizar si existe una interacción entre la  $T_4$  y la TRH en el control de la proliferación celular adenohipofisaria, en particular de los tirotrópos y somatotrópos en el hipotiroidismo de corta evolución.

## **VI. MATERIAL Y MÉTODOS**

**Animales y Tiroidectomía.-** Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar, de 7 semanas de edad ( $186 \pm 21$  g de peso). Previa anestesia con éter etílico, los animales fueron tiroparatiroidectomizados quirúrgicamente.

**Manipulación Experimental.-** Los animales tuvieron libre acceso al agua y al alimento estándar (Purina chow para rata). El agua de beber se suplementó con lactato de calcio al 1%. Los ciclos de luz-oscuridad se ajustaron a 12X12 hs (luces encendidas a las 7 hs) y la temperatura del cuarto a  $23 \pm 2^\circ\text{C}$ . Los testigos eutiroideos se mantuvieron con agua corriente y alimento estándar. Todos los tratamientos se iniciaron a los 15 días de la tiroidectomía. Las ratas se dividieron en los siguientes grupos de 5 animales cada uno:

- 1) Testigo Eutiroideo + Solución salina
- 2) Tiroidectomizados + Solución salina
- 3) Tiroidectomizados + TRH
- 4) Tiroidectomizados +  $T_4$
- 5) Tiroidectomizados +  $T_4$  + TRH

Tanto al grupo testigo eutiroideo como al sólo tiroidectomizado, se les inyectaron 100 µl/SC de solución salina fisiológica 12 horas antes del sacrificio. Basados en el estudio de Kunert-Radek (1975), en que el efecto proliferativo máximo de la TRH (25 µg/IP) se observó a las 12 horas de la inyección del tripéptido y a que el efecto inhibitor de las hormonas tiroideas sobre las funciones de los tirotrópos inicia a los pocos minutos y alcanza su máximo al cabo de algunas horas (Spira y col, 1979), se consideró que 12 horas serían suficientes para hacer manifiestos los respectivos efectos hormonales. Por lo tanto, la TRH (Sigma Chemical Co. St. Louis Mo. USA) se administró en una sola dosis de 25 µg/rata/IP y la T<sub>4</sub> (Sigma Chemical Co. St Louis Mo. USA) en una sola dosis de 10 µg/rata/IM. Todos los animales fueron sacrificados 12 horas después de los respectivos tratamientos.

Dada la reconocida propiedad de la colchicina para detener las mitosis en metafase y permitir con ello un incremento en la eficiencia del conteo mitótico (Sakai y col, 1988), 2 horas antes del sacrificio todos los animales recibieron, 0.5 mg/100 g de peso/IP de colchicina (Aldrich Chemical Co. Inc. Milwaukee, Wi. USA).

**Sacrificio y Autopsia.**- Los animales fueron decapitados bajo ligera anestesia con éter etílico. Antes de remover las adenohipófisis, los lóbulos neurointermedios fueron desprendidos y desechados. En seguida, los lóbulos anteriores fueron extirpados, pesados y fijados en formol neutro al 10% durante una semana.

**Histología.**- Después de la deshidratación con etanoles graduados, las adenohipófisis fueron incluidas en parafina y cortadas en secciones horizontales de 5-6 µm de espesor. Secciones contiguas de cada glándula fueron teñidas con Hematoxilina-Eosina (H-E) o Acido peryódico-reactivo de Schiff-Hematoxilina (PAS-H). Las hipófisis fueron examinadas con un microscopio fotónico (Nikon).

**Inmunohistoquímica.-** En tres animales de cada grupo tomados al azar, se realizó la tinción inmunohistoquímica de los tirotrópos y somatotropos, por el método del complejo avidina-biotina-peroxidasa (Vectastin ABC kit, Dimention Laboratories Inc. Toronto, Ontario. Canada). Los anticuerpos primarios anti TSH y anti GH de rata fueron donados por el NIDDK del NIH (Bethesda MD. USA). Los detalles para la técnica inmunohistoquímica y los controles se encuentran descritos en Stefaneanu y col, (1990).

**Conteo Mitótico.-** Las células en mitosis fueron definidas como aquellas que presentaron cromosomas claramente identificables y sin recubrimiento de la membrana nuclear. Las células en mitosis fueron contadas dos veces en cada laminilla teñida con H-E, PAS-H e inmunoteñidas para rTSH y rGH utilizando un objetivo de aceite de inmersión a una amplificación de 1000X (Woosley, 1991). Así, para cada rata las cuentas mitóticas se repitieron ocho veces sin que el observador tuviera conocimiento del tratamiento previo respectivo. Las cuentas incluyeron las zonas central y lateral del lóbulo anterior y se expresaron como la media  $\pm$  EEM de las cuentas mitóticas/mm<sup>2</sup>.

Para el conteo diferencial de tirotrópos y somatotropos en mitosis se tomaron en cuenta solamente aquellas células que además de estar en mitosis, presentaron una clara inmunorreactividad para la TSH o la GH respectivamente. También se cuantificaron las células en mitosis cuyo citoplasma no se tiñó con ninguna de los dos procedimientos y se nombraron células en mitosis no inmunoteñidas.

**Análisis de los Resultados.-** Los resultados de todas las variables se expresan como la media  $\pm$  EEM. Las diferencias entre las medias de los diferentes grupos se compararon utilizando el análisis de varianza en una sola dirección (ANOVA), seguida de la prueba de Tukey-Kramer. Un valor de  $p < 0.05$  se consideró significativamente diferente. Los resultados de los conteos mitóticos, se analizaron por la prueba de



diferencia de medias. Lo anterior se debe a que no obstante que el número de mitosis es una respuesta discreta que toma valores enteros no negativos, el análisis empírico de los histogramas de cada grupo mostraron una tendencia a la normalidad.

## VII. RESULTADOS

**Peso Corporal.-** No se observaron diferencias significativas entre los pesos de las ratas de los diferentes grupos. (Testigo eutiroideo;  $210.4 \pm 12$ , Tiroidectomizados;  $211.6 \pm 7$ , Tiroidectomizados + TRH;  $187.6 \pm 5$ , Tiroidectomizados +  $T_4$ ;  $224.7 \pm 13$ , Tiroidectomizados + TRH +  $T_4$ ;  $181 \pm 12$ ).

**Peso Hipofisiario.-** El peso hipofisiario de los animales tiroidectomizados fue mayor que en los animales testigo. Las diferencias solo fueron significativas entre los grupos Tiroidectomizados y Tiroidectomizados +  $T_4$  (Testigo eutiroideo;  $5.1 \pm 0.4$  vs Tiroidectomizados;  $7.4 \pm 0.5$ ,  $p < 0.01$  y Tiroidectomizados +  $T_4$ ;  $7.8 \pm 0.4$ ,  $p < 0.001$  respectivamente).

**Cuentas Mitóticas.-** En la Tabla I se muestran los resultados de los conteos mitóticos hipofisarios totales y diferenciales de los tirotrópos, somatotrópos y células en mitosis no inmunotefñidas, de los diferentes grupos experimentales. En los animales eutiroideos ocurre la replicación mitótica. La tiroidectomía casi duplicó el número de células adenohipofisarias en mitosis ( $p < 0.01$ ). La administración de  $T_4$  a los animales tiroidectomizados inhibió de manera no significativa la replicación celular. La inyección de TRH a los animales tiroidectomizados provocó el aumento del número de mitosis (45.6%,  $p < 0.01$ ) al compararlo con los sólo tiroidectomizados. La inyección de  $T_4$  no afectó la respuesta mitótica estimulada por la TRH sola.

diferencia de medias. Lo anterior se debe a que no obstante que el número de mitosis es una respuesta discreta que toma valores enteros no negativos, el análisis empírico de los histogramas de cada grupo mostraron una tendencia a la normalidad.

## VII. RESULTADOS

**Peso Corporal.**- No se observaron diferencias significativas entre los pesos de las ratas de los diferentes grupos. (Testigo eutiroideo;  $210.4 \pm 12$ , Tiroidectomizados;  $211.6 \pm 7$ , Tiroidectomizados + TRH;  $187.6 \pm 5$ , Tiroidectomizados +  $T_4$ ;  $224.7 \pm 13$ , Tiroidectomizados +TRH +  $T_4$ ;  $181 \pm 12$ ).

**Peso Hipofisario.**- El peso hipofisario de los animales tiroidectomizados fue mayor que en los animales testigo. Las diferencias solo fueron significativas entre los grupos Tiroidectomizados y Tiroidectomizados +  $T_4$  (Testigo eutiroideo;  $5.1 \pm 0.4$  vs Tiroidectomizados;  $7.4 \pm 0.5$ ,  $p < 0.01$  y Tiroidectomizados +  $T_4$ ;  $7.8 \pm 0.4$ ,  $p < 0.001$  respectivamente).

**Cuentas Mitóticas.**- En la Tabla I se muestran los resultados de los conteos mitóticos hipofisarios totales y diferenciales de los tirotropos, somatotropos y células en mitosis no inmunotefñidas, de los diferentes grupos experimentales. En los animales eutiroideos ocurre la replicación mitótica. La tiroidectomía casi duplicó el número de células adenohipofisarias en mitosis ( $p < 0.01$ ). La administración de  $T_4$  a los animales tiroidectomizados inhibió de manera no significativa la replicación celular. La inyección de TRH a los animales tiroidectomizados provocó el aumento del número de mitosis (45.6%,  $p < 0.01$ ) al compararlo con los sólo tiroidectomizados. La inyección de  $T_4$  no afectó la respuesta mitótica estimulada por la TRH sola.

**Tabla I.- Cuentas mitóticas totales y número de tirotropos y somatotropos en mitosis y células en mitosis no inmunotefidas de adenohipófisis de ratas tiroidectomizadas 15 días antes. Efectos de una sola dosis de TRH, T<sub>4</sub> o TRH+T<sub>4</sub>.**

Grupo	Mitosis/mm <sup>2</sup> Media ± EEM	Número de Tt, St y células no inmunotefidas en mitosis/mm <sup>2</sup>		
		Tirotropos	Somatotropos	No inmunotefidas
Testigo Eutiroideo (TE)	4.2±0.3 <sup>a</sup>	0.4±0.2 <sup>a</sup>	2.3±0.3 <sup>a</sup>	1.5
Tiroidectomizado (TX)	8.1±0.4 <sup>b</sup>	2.7±0.7 <sup>b</sup>	1.3±0.4 <sup>a</sup>	4.1
TX + T <sub>4</sub>	5.9±0.4 <sup>a,b</sup>	1.8±0.3 <sup>ab</sup>	1.8±0.4 <sup>a</sup>	2.3
TX + TRH	11.8±1.0 <sup>c</sup>	1.8±0.6 <sup>ab</sup>	2.2±0.8 <sup>a</sup>	7.8
TX + T <sub>4</sub> +TRH	12.4.±1.4 <sup>c</sup>	3.3±0.6 <sup>b</sup>	2.1±0.6 <sup>a</sup>	7

Las cuentas mitóticas se expresan como la media ± EEM de 5 animales por grupo. Las medias de los tirotropos y somatotropos en mitosis, se obtuvieron de cortes hipofisarios de tres ratas por grupo inmunotefidas para rTSH y rGH respectivamente. El número de células no inmunotefidas en mitosis se determinaron restando de las cuentas mitóticas totales la suma de los tirotropos y somatotropos en mitosis de los grupos respectivos. Las medias con diferente letra dentro de la misma columna, son significativamente diferentes.

**Número de Tirotrópos y Somatotrópos en Mitosis.-** La inmunotinción permitió la identificación precisa de los tirotrópos y somatotrópos tanto en mitosis como en interfase (Figuras 1 y 2). En comparación con el grupo testigo eutiroideo, en los animales tiroidectomizados el número de tirotrópos en mitosis fue 6.75 veces mayor (Tabla I) ( $p < 0.01$ ). La replicación mitótica de los tirotrópos observada en los animales tiroidectomizados no fue modificada por la inyección de  $T_4$ , TRH o  $T_4$ +TRH. Ninguno de los tratamientos indujo cambios significativos en el número de somatotrópos en mitosis (Tabla I),

**Número de Células en Mitosis No Inmunoteñidas.-** Este número se calculó sustrayendo de las cuentas mitóticas totales la suma de los tirotrópos y somatotrópos en mitosis. En comparación con los animales eutiroideos, el número de células en mitosis que dieron resultado negativo a la inmunotinción para TSH y GH, tuvieron las siguientes tendencias: aumentó en los animales tiroidectomizados, tiroidectomizados tratados con TRH o  $T_4$ +TRH y no se modificó en los que sólo recibieron  $T_4$ .

**Histología.-** Similar a lo descrito en la literatura, cambios obvios subjetivos ocurrieron en la histología hipofisiaria de los diferentes grupos experimentales. En comparación con el grupo testigo eutiroideo, los tirotrópos y somatotrópos de los animales tiroidectomizados, respondieron de una manera opuesta; así, mientras que los tirotrópos experimentaron degranulación, vacuolación, hipertrofia, hiperplasia y transformación en células de la tiroidectomía, los somatotrópos además de perder sus gránulos citoplásmicos, disminuyeron en número. La administración de  $T_4$  sola, o administrada simultáneamente con TRH, indujo una ligera regranulación de los tirotrópos (Fig. 1) y somatotrópos (observada sólo en las laminillas teñidas con la técnica inmunohistoquímica para TSH o GH). Excepto por el mayor número de células en mitosis, la administración de TRH sola, no modificó el cuadro histológico, el cual fué



**Figura 1.-** Inmunotinción para tirotropos (rTSH) en un corte adenohipofisiario de rata Tx 15 días antes, tratada con 10  $\mu\text{g}$  de  $\text{T}_4$  12 h previos al sacrificio. La flecha muestra un tirotropo en mitosis. Amplificación = 1000X . Barra = 5  $\mu\text{m}$ .



**Figura 2.-** Inmunotinción para somatotropos (rGH) en un corte adenohipofisiario de rata eutiroides. La flecha indica un somatotropo en mitosis. Amplificación X1000. Barra = 5  $\mu\text{m}$ .

indistinguible al del grupo solo tiroidectomizado. Cabe hacer notar que con excepción de los conteos mitóticos, los demás datos fueron apreciados sólo de manera subjetiva.

## VIII. DISCUSIÓN

Los hallazgos de este experimento corroboran la hiperplasia de los tirotrópos y disminución de la replicación de los somatotrópos en el hipotiroidismo de corta evolución (Costoff, 1973; Baker, 1974; Surks y col, 1977; DeFesi y col, 1979; Astier y col, 1980; Horvath y col, 1990; Ozawa, 1991).

Muestran además que durante la instalación del hipotiroidismo ocurre la proliferación de otro tipo de células, las que por sus características inmunotintoriales se designaron como células en mitosis no inmunotefidas. Aunque es posible que algunas de estas correspondan a tirotrópos o somatotrópos degranulados, también es posible que las mitosis estén ocurriendo en otros tipos celulares tanto de naturaleza endocrina (gonadotrópos, corticotrópos o mamotrópos) como del tipo "indiferenciado". Este hallazgo también ha sido observado por Surks y De Fesi (1977) y Astier y col, (1980), quienes describen que durante el hipotiroidismo, además de aumentar significativamente la población relativa de los tirotrópos, que pasan del 10 al 30% y la disminución de los somatotrópos del 55 al 17%, también encontraron cambios en el conjunto de células formado por las células foliculares, agranulares y las que no se pudieron clasificar en un fenotipo específico, que aumentan del 8.5 al 23.5%. Estos mismos autores no encontraron cambios significativos en las poblaciones relativas de de gonadotrópos, corticotrópos y mamotrópos.

El aumento en el número de mitosis observado en los tirotrópos de los animales tiroidectomizados y la tendencia a la disminución en los somatotrópos, están en concordancia con los hallazgos de Surks y De Fesi (1977) y Astier y col (1980), sobre

indistinguible al del grupo solo tiroidectomizado. Cabe hacer notar que con excepción de los conteos mitóticos, los demás datos fueron apreciados sólo de manera subjetiva.

## VIII. DISCUSIÓN

Los hallazgos de este experimento corroboran la hiperplasia de los tirotrópos y disminución de la replicación de los somatotrópos en el hipotiroidismo de corta evolución (Costoff, 1973; Baker, 1974; Surks y col, 1977; DeFesi y col, 1979; Astier y col, 1980; Horvath y col, 1990; Ozawa, 1991).

Muestran además que durante la instalación del hipotiroidismo ocurre la proliferación de otro tipo de células, las que por sus características inmunotintoriales se designaron como células en mitosis no inmunotefidas. Aunque es posible que algunas de estas correspondan a tirotrópos o somatotrópos degranulados, también es posible que las mitosis estén ocurriendo en otros tipos celulares tanto de naturaleza endocrina (gonadotrópos, corticotrópos o mamotrópos) como del tipo "indiferenciado". Este hallazgo también ha sido observado por Surks y De Fesi (1977) y Astier y col, (1980), quienes describen que durante el hipotiroidismo, además de aumentar significativamente la población relativa de los tirotrópos, que pasan del 10 al 30% y la disminución de los somatotrópos del 55 al 17%, también encontraron cambios en el conjunto de células formado por las células foliculares, agranulares y las que no se pudieron clasificar en un fenotipo específico, que aumentan del 8.5 al 23.5%. Estos mismos autores no encontraron cambios significativos en las poblaciones relativas de de gonadotrópos, corticotrópos y mamotrópos.

El aumento en el número de mitosis observado en los tirotrópos de los animales tiroidectomizados y la tendencia a la disminución en los somatotrópos, están en concordancia con los hallazgos de Surks y De Fesi (1977) y Astier y col (1980), sobre

el aumento de tirotrópos y la disminución de somatotrópos observados 15 días después de la tiroidectomía.

Con base en nuestros hallazgos y lo publicado se puede pensar que la replicación normal de las células de la adenohipófisis es regulada tanto por las hormonas tiroideas como por la TRH. En condiciones de hipotiroidismo se mantiene este mismo tipo de regulación. Esta interpretación concuerda con lo propuesto por Kunert-Radek y Pawlikowski (1975) y por Pawlikowski y col. (1975), Komolov y col. (1978, 1985) y Rappay y col. (1980).

Incrementos en la replicación de células sin fenotipo definido, también han sido descritos durante la instalación del hipogonadismo e hipocorticismos primarios, en los que además del incremento en la replicación específica de gonadotrópos (Stadtler y col, 1970) y corticotrópos (Taniguchi y col, 1995), también se incrementa el número de células que no pudieron clasificarse en un fenotipo secretor específico. Ambos grupos de investigadores coincidieron en llamarlas células "totipotenciales" o "indiferenciadas" y sugieren que podrían dar origen, una vez diferenciadas, a los fenotipos celulares específicos correspondientes.

Nuestros resultados corroboran el efecto mitogénico de la TRH sobre la adenohipófisis (Kunert-Radek y Pawlikowski, 1975; Pawlikowski y col, 1975, 1978; Komolov y col, 1978, 1985, Rappay y col, 1980; Pawlikowski y Slowinska-Klencka, 1994; Pawelzyk y col, 1996). A diferencia del efecto mitogénico específico de la GHRH y GnRH y CRH sobre los somatotrópos y mammosomatotrópos (Stefaneanu y col, 1989), gonadotrópos (Horacek y col, 1989; Sakai y col, 1988) y los corticotrópos (McNicol y col, 1988), respectivamente, nuestros resultados sugieren que el efecto mitogénico de la TRH no es sobre los tirotrópos, sino sobre las células en mitosis no



inmunoteñidas. Esta interpretación es apoyada por los hallazgos de Komolov y col (1978, 1985) y Rappay y col (1980), quienes trabajando en cultivos hipofisarios, describieron que la TRH estimula únicamente la replicación de células de naturaleza "epitelioide" o "fibroblástica" y no tuvo efecto mitogénico sobre los tirotrapos o mamotropos. Todo lo anterior, apoya el concepto de que durante el hipotiroidismo, la replicación o inhibición de tipos celulares específicos de la adenohipófisis son afectados de una manera diferencial, y que el concepto de la replicación de células "totipotenciales" o "indiferenciadas" hipofisarias continúa siendo vigente (Oliver, 1975).

En el hipotiroidismo de corta evolución, la administración de hormonas tiroideas bloquea o inhibe los efectos del hipotiroidismo, entre los que se encuentran; la inhibición de la secreción de TSH, la inhibición de la replicación de los tirotrapos (Messier, 1969) y la estimulación de la replicación de los somatotropos. Mientras que el efecto inhibitorio de las tironinas sobre la secreción de TSH es de latencia breve (minutos) (Spira y col, 1979b, 1981; Spira y Gordon, 1986), el efecto inhibitorio de la replicación celular, sólo es significativo después de 24 hs (Astier y col, 1980). Nuestros resultados muestran que en el hipotiroidismo agudo la T<sub>4</sub> inhibe la replicación de las células en mitosis no inmunoteñidas. Esto nos lleva a sugerir que el efecto inhibitorio de la T<sub>4</sub> sobre la replicación de las células no inmunoteñidas es de latencia breve y los efectos inhibitorios sobre la replicación de los tirotrapos y estimulación de la replicación de los somatotropos descritos en la literatura, se hacen significativos después de las 12 horas.

A diferencia de la inhibición del efecto mitogénico de la TRH por la T<sub>4</sub> descrita por Pawlikowski y col (1975), en hipófisis "in vitro", en nuestro estudio la administración de T<sub>4</sub> no inhibió el efecto mitogénico de la TRH. Estas respuestas, aparentemente contradictorias, pueden ser explicadas por las características del modelo experimental utilizado, el mecanismo de acción de las hormonas, las dosis

utilizadas y los diferentes esquemas de tratamiento empleados. Mientras que en nuestro estudio la  $T_4$  y la TRH se administraron simultáneamente en un solo pulso, Pawlikowski y col (1975) incubaron primeramente los fragmentos hipofisarios con dosis elevadas de  $T_4$  y a las dos horas agregaron dosis también elevadas de TRH al medio de cultivo, y el experimento terminó 12 horas después. Dado que el efecto inhibitorio de la  $T_4$  sobre la síntesis del mRNA que codifica para las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  de la molécula de TSH, son claramente manifiestos a los 60 minutos (Franklyn y col, 1987), es posible que la elevada concentración de  $T_4$  y el tiempo de exposición previa de la tironina (2 horas) de los experimentos del grupo de Pawlikowski (Pawlikowski y col, 1975) hayan sido suficientes para bloquear el efecto mitogénico de la TRH a nivel de los mecanismos nucleares que desencadenan la mitosis. En 1969, Messier describió que la administración de  $T_4$  inmediatamente después de la tiroidectomía, bloquea la reacción proliferativa de los tirotrópos a la deficiencia aguda de hormonas tiroideas. En nuestro estudio, es posible que la falta de inhibición del efecto mitogénico de la TRH por la  $T_4$ , se haya debido al menor periodo de latencia para el efecto de la TRH (con respecto a la  $T_4$ ), que estimularía primero los mecanismos que regulan la replicación celular, adelantándose en el tiempo al efecto inhibitorio de la  $T_4$  sobre este fenómeno. Será necesario realizar otros experimentos para demostrar o rechazar esta hipótesis.

## **IX. CONCLUSIONES**

De los resultados de este primer experimento se puede concluir lo siguiente:

1.- En ratas jóvenes eutiroides, el recambio celular es más activo en los somatotropos que en los tirotrópos.

2.- En el hipotiroidismo de corta evolución se incrementa la tasa de replicación celular debido a la replicación mitótica de los tirotrópos y posiblemente a la de las células no inmunotefidas.

3.- Que la TRH tiene efecto mitogénico sobre la adenohipófisis de ratas tiroidectomizadas de corta evolución.

4.- Que la TRH estimula la replicación de las células indiferenciadas de la adenohipófisis.

5.- La TRH no posee efecto mitogénico específico sobre los tirotrópos.

6.- La replicación de las células del tipo "indiferenciado" participan en los ajustes funcionales del eje hipófisis-tiroides.

7.- Que las hormonas tiroideas constituyen el factor más importante en la regulación o modulación de la replicación celular de los tirotrópos y de las células "indiferenciadas".

## **Experimento II**

**Objetivo 2.-)** Estudiar en ratas tiroidectomizadas de larga evolución, los efectos de la administración repetitiva de TRH, T<sub>4</sub> o TRH+T<sub>4</sub>, sobre la secreción de TSH, la proliferación celular adenohipofisiaria y en particular de los tirotrópos y somatotrópos.

**Justificación.-** El propósito de este experimento es analizar las interacciones entre la T<sub>4</sub> y la TRH en el control de la proliferación celular adenohipofisiaria, en particular de los tirotrópos y somatotrópos y la secreción de TSH en el hipotiroidismo de larga evolución.

## **VI. MATERIAL Y MÉTODOS**

**Animales y Cirugía.-** Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar de 200 ± 30 g de peso (2 meses de edad al inicio del experimento). Al momento de la cirugía, se anestesiaron con eter etílico y se tiroparatiroidectomizaron quirúrgicamente(Tx).

**Manipulación Experimental.-** Los animales se mantuvieron con lactato de calcio en el agua de beber y alimento estándar para rata (Purina chow para rata) *ad libitum*. Las luces del cuarto se ajustaron a ciclos de luz-oscuridad de 12 X 12 hs (luces encendidas a las 7 hs) y una temperatura ambiente de 23°± 2°C. A los cuatro meses de la cirugía, la dieta estándar se cambió a una dieta baja en yodo (20% de caseinato de calcio más 80% de maíz quebrado (Perera, 1984). Los animales testigo se mantuvieron con Purina estándar y agua corriente. Todos los experimentos se iniciaron a los 5 meses de la Tx. Las ratas se dividieron en nueve grupos experimentales (12-15 animales cada uno) de la siguiente manera:

- 1) Testigo Eutiroides (TE) + Solución salina
- 2) Tiroidectomizados (Tx) + Solución salina
- 3) Tiroidectomizados+TRH
- 4) Tiroidectomizados+0.5 µg T<sub>4</sub>
- 5) Tiroidectomizados+TRH+ 0.5 µg T<sub>4</sub>
- 6) Tiroidectomizados+3 µg T<sub>4</sub>
- 7) Tiroidectomizados+TRH+ 3 µg T<sub>4</sub>
- 8) Tiroidectomizados+ 10 µg T<sub>4</sub>
- 9) Tiroidectomizados+TRH+ 10 µg T<sub>4</sub>

Tanto a los testigo eutiroides como a los sólo tiroidectomizados, se les inyectaron subcutáneamente 100 µl de solución salina fisiológica 3 veces al día/10 días. La última dosis se administró 4 horas antes del sacrificio. A los grupos tratados con TRH, el péptido se administró a razón de 100 ng/SC 3 veces al día/10 días (3 µg totales/rata). La última dosis se inyectó 4 h antes del sacrificio. La T<sub>4</sub> se inyectó por vía IM en dosis de 0.5, 3 o 10 µg cada tercer día durante 10 días. La dosis total por rata fue 2.5, 15 y 50 µg para el grupo correspondiente. Los animales se sacrificaron 24 h después de la última inyección, coincidiendo con las 4 horas post administración de la TRH.

Para la determinación de las cuentas mitóticas, a 3 animales de cada grupo se les administró colchicina a razón de 0.5 mg/100 g de peso corporal/IP, 2 h antes del sacrificio (Sakai y col, 1988).

**Sacrificio y Autopsia.-** Los animales fueron decapitados entre las 10-11 a.m. bajo ligera anestesia con éter etílico y excepto los animales que fueron tratados con colchicina, en los demás la sangre del tronco fue colectada, dejada coagular a temperatura ambiente y centrifugada a 3500 rpm por 15 min. Los sueros separados se

congelaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta las determinaciones radioinmunométricas (RIA) de TSH,  $T_4$  y  $T_3$ . In situ se removieron y descartaron los lóbulos neurointermedios de las hipófisis, luego se extirparon los lóbulos anteriores, los que se pesaron en una balanza analítica y se fijaron en formol neutro al 10% durante 1 semana.

**Radioinmunoensayos (RIAs) de TSH,  $T_4$  y  $T_3$ .**- Para la cuantificación de la TSH se utilizó el juego de reactivos rat TSH-RIA, proporcionado por el NIADDK del The National Pituitary Agency, Baltimore Maryland, MD. El estándar de referencia fue el NIAMDD rTSH RP-2. En nuestro laboratorio las variaciones intra-ensayo e inter-ensayo, han sido del 7% y 10% respectivamente (Acevedo, 1989). Para las determinaciones de  $T_4$  y  $T_3$  se utilizaron estuches comerciales de Diagnostic Products Corp., Los Angeles, CA. Los coeficientes de variación intra e inter-ensayo fueron del 6.5% y 8% para la  $T_4$  y 7.5 y 14.2% para la  $T_3$  respectivamente.

**Histología.**- Las adenohipófisis se incluyeron en parafina, y se cortaron transversalmente en rebanadas seriadas de 5-6  $\mu\text{m}$  de grueso. Secciones contiguas de cada glándula, se tiñeron con Hematoxilina-Eosina (H-E), Acido peryódico-reactivo de Schiff-Hematoxilina (PAS-H) o método de Heindeinhain. El estudio histológico de las hipófisis, se realizó con un microscopio fotónico (Nikon).

**Inmunohistoquímica.**- Para la identificación inmunohistoquímica de los tirotrópos y somatotrópos, se utilizó el método del complejo avidina-biotina-peroxidasa (Vectastin ABC kit, Dimention Laboratories Inc.). Los anticuerpos primarios contra rTSH y rGH fueron donados por el NIDDK (Bethesda MD USA). Los detalles para la técnica inmunohistoquímica y los controles, se encuentran descritos en Stefaneanu y col, 1990).

**Conteo Mitótico.-** Las cuentas mitóticas se realizaron siguiendo los criterios descritos por Woosley (1991), utilizando un objetivo de aceite de inmersión y una amplificación de 1000X. Sin el conocimiento del tratamiento previo respectivo, las células en mitosis se contaron dos veces en cada laminilla teñida con H-E, PAS-H o inmunoteñidas para rTSH o rGH. Así, para una rata dada, las cuentas mitóticas se repitieron al menos 8 veces. Las cuentas incluyeron las partes central y laterales de la adenohipófisis y se expresaron como número de mitosis/mm<sup>2</sup>. Recuérdese que las cuentas mitóticas y el análisis histológico solo incluye a 3 animales por grupo tratados con colchicina. Excepto los grupos Tx + 3 µg de T<sub>4</sub> sin o con TRH, las hipófisis de los demás grupos fueron inmunoteñidas para rTSH y rGH.

**Análisis de los Resultados.-** Los resultados de todas las variables se expresan como la media ± EEM. Las diferencias entre las medias de los diferentes grupos se compararon utilizando el análisis de varianza en una sola dirección (ANOVA) seguida de la prueba de Tukey-Kramer. Un valor de p < 0.05 se consideró significativamente diferente.

Los resultados de los conteos mitóticos, se analizaron por la prueba de diferencia de medias. Lo anterior se debe a que no obstante que el número de mitosis es una respuesta discreta que toma valores enteros no negativos, el análisis empírico de los histogramas de cada grupo mostraron una tendencia a la normalidad.

## VII. RESULTADOS

**Peso Corporal.-** El peso corporal de los animales tiroidectomizados fue significativamente menor que el de los animales eutiroides (Tabla II). Los tratamientos con T<sub>4</sub>, TRH o T<sub>4</sub>+TRH, no tuvieron efectos adicionales sobre este parámetro.

**Peso Hipofisiario.-** A los cinco meses de la tiroidectomía, excepto el grupo tratado con 0.5 µg de T<sub>4</sub>+TRH, la comparación de los pesos hipofisarios entre el resto de los grupos no mostró diferencias significativas. Con respecto a los grupos; testigo eutiroideo, tiroidectomizados tratados con 3 µg de T<sub>4</sub> y tiroidectomizados tratado con 10 µg de T<sub>4</sub> sin o con TRH, el peso hipofisiario del los animales tiroidectomizados tratados con 0.5 µg de T<sub>4</sub>+TRH fue significativamente mayor (Tabla II). En comparación con este último grupo, la administración de dosis crecientes de T<sub>4</sub> sin o con TRH, indujeron una reducción creciente y significativa del peso hipofisiario.

**Cuentas Mitóticas.-** El número de figuras mitóticas observadas en los animales eutiroideos de 7 meses de edad fue significativamente menor que el de las ratas eutiroideas de dos meses de edad ( $1.6 \pm 0.3$  vs  $4.2 \pm 0.30$ ,  $p < 0.0001$ ,  $t$  Student).

Como se muestra en la Tabla III, la tiroidectomía de 5 meses de evolución no incrementó significativamente las cuentas mitóticas adenohipofisarias.

La administración de TRH o de 0.5 µg de T<sub>4</sub> a los animales tiroidectomizados no indujeron cambios significativos en el número de mitosis (Tabla III).

Los animales tiroidectomizados tratados con 3 o 10 µg de T<sub>4</sub>, respondieron con incrementos en el número de mitosis proporcionales a la dosis. La TRH administrada simultáneamente con las respectivas dosis de T<sub>4</sub>, tuvo un efecto sinérgico, aunque no significativo sobre la proliferación mitótica (Tabla III). Mientras que la administración de 3 y 10 µg de T<sub>4</sub> (sin o con TRH), indujeron una disminución de los pesos adenohipofisarios (Tabla II), el número de células en mitosis se incrementó (Tabla III).

**Número de Somatotropos y Tirotropos en Mitosis.-** En los somatotropos de las hipófisis de los animales tiroidectomizados no se observaron figuras en mitosis.



**Tabla II.- Pesos corporal y del lóbulo anterior de la hipófisis de ratas con hipotiroidismo de 5 meses de evolución. Efecto de la TRH, diferentes dosis de T<sub>4</sub> sin o co-administrada con TRH.**

Grupo	Peso Corporal (g)	Peso del Lóbulo Anterior Hipofisiario (mg de Peso Humedo)
1.- Testigo Eutiroides (TE)	406.2± 13	7.8± 0.67 <sup>a</sup>
2.- Tiroidectomizado (Tx)	243.0± 12 <sup>a</sup>	8.4± 0.60 <sup>a,c</sup>
3.- Tx + TRH	227.8± 9 <sup>a</sup>	8.9± 0.73 <sup>ad</sup>
4.- Tx + 0.5 µg T <sub>4</sub>	225.5± 17 <sup>a</sup>	9.1± 0.47 <sup>ae</sup>
5.- Tx + 0.5 µg T <sub>4</sub> + TRH	272.8± 27 <sup>a</sup>	11.23± 1.08 <sup>bcd</sup>
6.- Tx + 3.0 µg T <sub>4</sub>	259.1± 11 <sup>a</sup>	7.7± 0.18 <sup>a</sup>
7.- Tx + 3.0 µg T <sub>4</sub> + TRH	222.0± 2 <sup>a</sup>	7.3± 0.54 <sup>a</sup>
8.- Tx + 10 µg T <sub>4</sub>	256.0± 9 <sup>a</sup>	6.5± 0.22 <sup>a</sup>
9.- Tx + 10 µg T <sub>4</sub> + TRH	270.0± 8 <sup>a</sup>	6.5± 0.23 <sup>a</sup>

Los valores se expresan como las medias ± EEM. Las medias con diferente letra dentro de la misma columna, son significativamente diferentes. n = 10-12 ratas por grupo para el peso corporal. n = 5-6 ratas por grupo para los pesos hipofisarios.

**Tabla III.- Cuentas mitóticas totales, número de somatotropos y tirotropos en mitosis y células en mitosis no inmunotefidas del lóbulo anterior de la hipófisis de ratas tiroidectomizadas de 5 meses de evolución. Efecto de TRH, diferentes dosis de T<sub>4</sub> y diferentes dosis de T<sub>4</sub> + TRH.**

Grupo	Número de mitosis/mm <sup>2</sup>	Número de St, Tt y células no inmunotefidas en mitosis/mm <sup>2</sup>		
		Somatotropos	Tirotropos	No inmunotefidas
1.- Testigo Eutiroideo (TE)	1.6± 0.3 <sup>a</sup>	0.5± 0.3 <sup>a</sup>	0.16±0.1 <sup>a</sup>	0.94
2.- Tiroidectomizados (Tx)	2.2± 0.4 <sup>bc</sup>	0.0 <sup>a</sup>	0.66±0.6 <sup>a</sup>	1.54
3.- Tx + TRH	1.5± 0.3 <sup>a</sup>	0.0 <sup>a</sup>	0.66±0.3 <sup>a</sup>	0.84
4.- Tx + 0.5 µg T <sub>4</sub>	3.8± 0.5 <sup>ad</sup>	1.6±0.3 <sup>a</sup>	4.3±1.6 <sup>bc</sup>	—
5.- Tx + 0.5 µg T <sub>4</sub> +TRH	5.7± 0.4 <sup>bcd</sup>	0.5±0.5 <sup>a</sup>	4.5±0.5 <sup>bd</sup>	0.7
6.- Tx + 3.0 µg T <sub>4</sub>	6.2± 0.9 <sup>bd</sup>	NA	NA	NA
7.- Tx + 3.0 µg T <sub>4</sub> +TRH	8.2± 1.1 <sup>be</sup>	NA	NA	NA
8.- Tx + 10 µg T <sub>4</sub>	8.3± 1.5 <sup>de</sup>	3.5±2.5 <sup>bc</sup>	2.5±0.5 <sup>acd</sup>	2.3
9.- Tx + 10 µg T <sub>4</sub> +TRH	10.0± 1.0 <sup>e</sup>	7.0±1.0 <sup>bc</sup>	0.6±0.6 <sup>ad</sup>	2.4

Las cuentas mitóticas se expresan como la media ± EEM de tres ratas por grupo. Todos los conteos se realizaron en cortes de hipófisis inmunotefidas para rGH o rTSH. NA = No Analizado. Las cuentas mitóticas de los grupos 6 y 7 se obtuvieron de los cortes histológicos de hipófisis tefidas con H-E y PAS-H. El número de células en mitosis no inmunotefidas se determinaron sustrayendo de las cuentas mitóticas totales la suma de los somatotropos y tirotropos en mitosis de los grupos respectivos. Las medias con diferente letra dentro de la misma columna son estadísticamente diferentes (p < 0.05).

Este cuadro no fue modificado por la inyección de TRH. La inyección simultánea de 10  $\mu\text{g}$  de  $\text{T}_4$  y TRH, tuvo un efecto sinérgico significativo del número de mitosis observado en este tipo celular (Tabla III).

En los animales tiroidectomizados el número de tirotrópos en mitosis fue semejante al encontrado en los animales eutiroideos. La administración de TRH a los animales tiroidectomizados no modificó el número de tirotrópos en mitosis. En comparación con el animal tiroidectomizado, la administración de 0.5 de  $\text{T}_4$  sola o acompañada de TRH, resultó en ambos casos en un aumento significativo en el número de tirotrópos en mitosis (Tabla III).

El tratamiento a ratas tiroidectomizadas, con dosis altas de  $\text{T}_4$  sin y con TRH, dio lugar a que el número de tirotrópos en mitosis fuera similar al de los animales sólo tiroidecomizados (Tabla III).

**Número de Células en Mitosis No Inmunotñidas.** Este número se calculó sustrayendo de las cuentas mitóticas totales la suma de los tirotrópos y somatotropos en mitosis. El número de células en mitosis que no se tiñen con la reacción inmunocitoquímica para TSH y GH en la hipófisis de los animales de siete meses de edad es semejante al encontrado en los animales de 2 meses de edad (Tablas I y III).

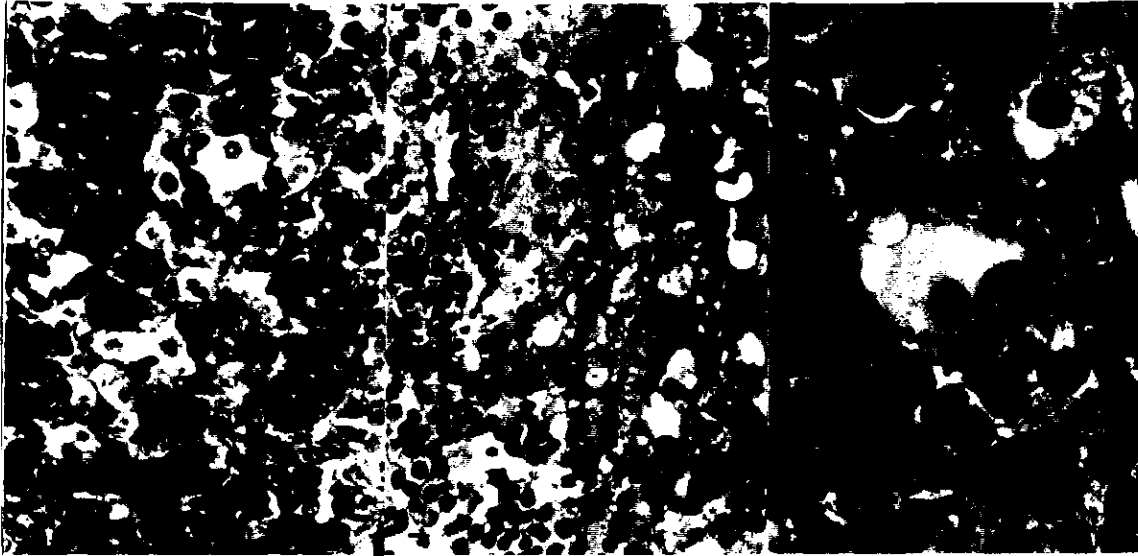
En los animales tiroidectomizados aumenta el número de células en mitosis que no se tiñeron con la reacción inmunocitoquímica para TSH y GH. Este resultado no fue modificado por el tratamiento con TRH, mientras que no se observaron este tipo de células en los animales tiroidectomizados tratados con la dosis baja de  $\text{T}_4$ . Los resultados obtenidos en ratas tiroidectomizadas que recibieron tratamiento simultáneo con dosis bajas de  $\text{T}_4$  + TRH son semejantes a los tiroidectomizados sin tratamiento. En cambio, en los animales tratados con dosis elevadas de  $\text{T}_4$  sin o con TRH, el

número de células en mitosis que no se tiñeron con la reacción inmunocitoquímica para TSH y GH se incrementó un 50% aproximadamente (Tabla III).

Obsérvese en la Tabla III, que en el grupo tratados sólo con  $T_4$  la suma de los somatotropos, tirotropos y células en mitosis no inmunotefidas es mayor al número total de mitosis (columna 1).

**Histología.-** Similar a lo descrito en la literatura, cambios subjetivos obvios ocurrieron en las hipófisis de los diferentes grupos. En los animales con hipotiroidismo crónico, los tirotropos y somatotropos mostraron los cambios típicos de este estado: degranulación, vacuolización, hipertrofia y desarrollo de gran número de células de tiroidectomía. En las figuras 3 y 4 se muestra la histología hipofisiaria de un animal eutiroides (3A), tiroidectomizado 5 meses antes (3B, 4A, 4B) y tiroidectomizado 5 meses antes tratado con  $10 \mu\text{g}$  de  $T_4$  por diez días antes del sacrificio (3C, 4C). La gran mayoría de los tirotropos presentaron los característicos gránulos citoplásmicos de Pearse PAS-positivos (lisosomas) (Fig. 5). Los somatotropos perdieron sus granulaciones citoplásmicas y disminuyeron en número (Figs. 3B y 4B). Este aspecto concuerda con lo descrito previamente por diversos autores (Herlant, 1964; Purves, 1966; Costoff, 1973; Baker, 1974; Tixer-Vidal, 1975; DeFesi y col, 1979; Astier y col, 1980; Horvat y col, 1990).

Aunque 10 días de tratamiento no fueron suficientes, la administración de  $T_4$  revierte dicho cuadro histológico al eutiroidismo; disminución de la cantidad de "células de tiroidectomía", incremento del número de somatotropos y recuperación de las granulaciones citoplásmicas de los tirotropos y somatotropos (Figs. 3C y 4C).

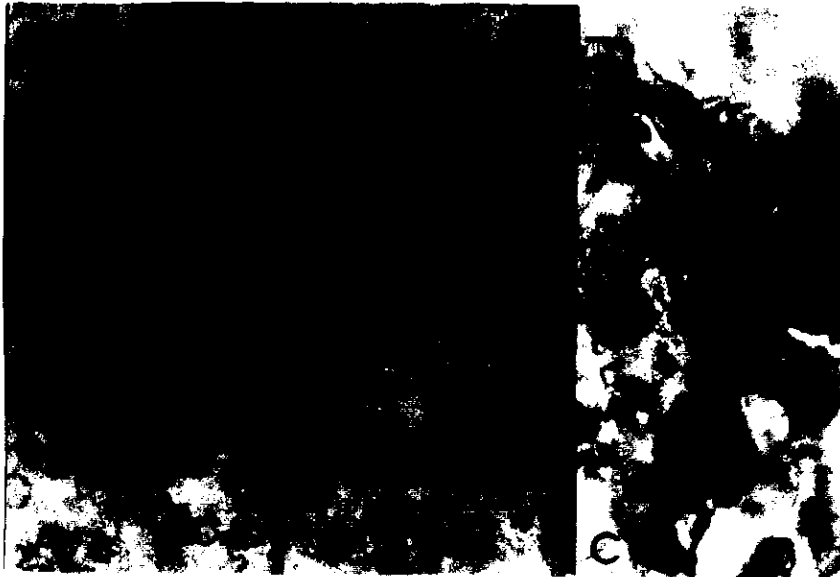


**FIGURA 3**

A) Sección histológica del lóbulo anterior hipofisiario de una rata del grupo testigo eutiroides. Nótese la gran cantidad de células acidófilas (rosa, principalmente somatotropos) y entremezcladas las células basófilas (azul grisáceo). (H-E, X400) Barra = 5  $\mu$ m para A, B y C.

B) Sección histológica del lóbulo anterior de la hipófisis de una rata tiroidectomizada 5 meses antes. La comparación con la Fig. 3 A, permite apreciar la hipertrofia y vacuolación de los tirotropos así como la hiperplasia de este tipo celular, incluyendo las células de la "tiroidectomía" (todas en azul grisáceo). Obsérvese la desaparición de la acidofilia (somatotropos). (H-E, 400X).

C) Corte histológico del lóbulo anterior de la hipófisis de una rata tiroidectomizada 5 meses antes y tratada durante 10 días con 3  $\mu$ g de  $T_4$ +TRH. Obsérvese la regraniculación de las células acidófilas. (H-E, 1000X).

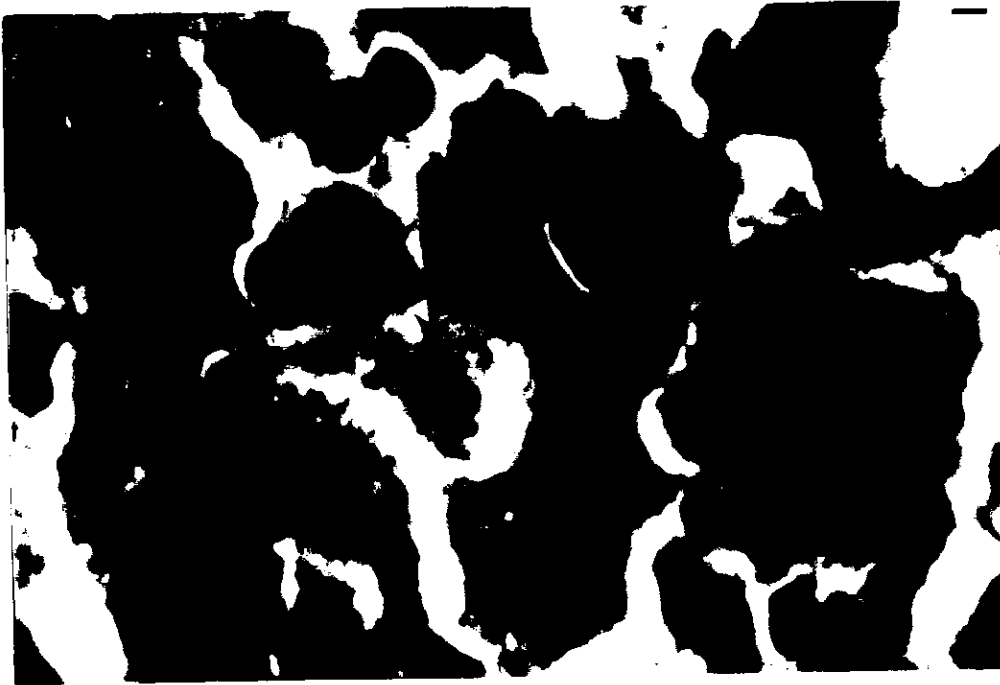


**FIGURA 4**

A.- Corte histológico del lóbulo anterior de la hipófisis de una rata Tx de 5 meses de evolución. La flecha indica un Tt en mitosis. Otros tirotropos en interfase, o vacuolados con escasos gránulos citoplásmicos inmunotefidos (asterisco) también se observan. Inmunotinción para rTSH . Amplificación: 400X. Barra = 10  $\mu$ m.

B.- Similar a A, pero inmunotefida para rGH. Note la débil tinción de los gránulos dentro de los St y las grandes vacuolas inmunonegativas (asterisco) dentro de los Tt. Amplificación: 400X. Barra = 10  $\mu$ m.

C.- Sección de una hipófisis de rata 5 meses después de la Tx y 10 días de tratamiento con 10  $\mu$ g de T<sub>4</sub>. Tanto los Tt (café) como los St (negro) se han regranulado densamente. Doble inmunotinción para rTSH y rGH. Amplificación: 1000X. Barra = 5  $\mu$ m.



**FIGURA 5**

Sección del lóbulo anterior de la hipófisis de una rata tiroidectomizada 5 meses antes y tratada durante 10 días con 0.5  $\mu\text{g}$  de  $\text{T}_4$ . Nótese en el citoplasma de los tirotropos las granulaciones PAS "+" (rojizo tenue), así como los gránulos gigantes (de color púrpura intenso) también PAS "+" (llamados gránulos T de las células de la "tiroidectomía). Los gránulos T dentro de una célula en mitosis sugieren que es un tirotropo (flecha). (PAS-H, X1000). Barra = 5  $\mu\text{m}$ .

**Concentraciones Plasmáticas de Tironinas y TSH.-** En los animales tiroidectomizados de 5 meses de evolución las concentraciones plasmáticas de  $T_4$  y  $T_3$  disminuyeron en un 75% y 50% respectivamente ( $p < 0.01$ ) (Fig. 6, páneles a y b); mientras que los de TSH se incrementaron 11.45 veces ( $p < 0.001$ ). La administración de TRH al grupo tiroidectomizado, no produjo cambios en las concentraciones de estas hormonas.

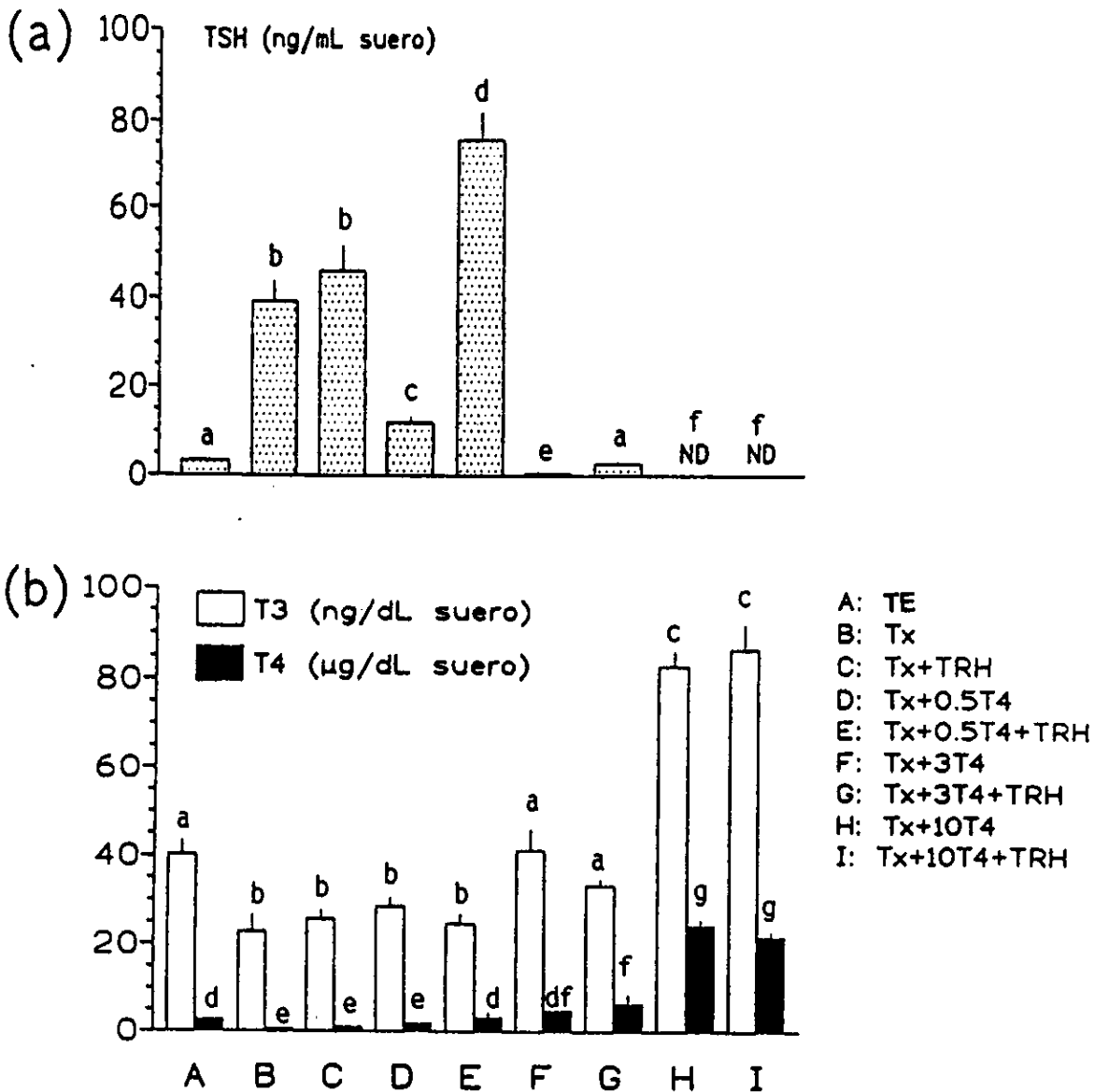
Por otro lado, la administración de dosis bajas de  $T_4$ , no alcanzaron a restablecer las concentraciones de  $T_4$  al nivel eutiroideo, mientras que las de  $T_3$  no se modificaron. El tratamiento con 3  $\mu\text{g}$  de  $T_4$  elevaron las cifras de  $T_4$  a niveles de hipertiroidismo ligero, mientras que las de  $T_3$  alcanzaron el valor eutiroideo.

El tratamiento con 10  $\mu\text{g}$  de  $T_4$  resulto en el incremento de las concentraciones séricas de ambas tironinas a niveles de hipertiroidismo intenso. El tratamiento con TRH y 0.5  $\mu\text{g}$  de  $T_4$  resulto en el incremento de las cifras circulantes de TSH casi en un 100%, con respecto al grupo tiroidectomizado ( $p < 0.001$ ). En los grupos restantes, el tratamiento simultáneo de  $T_4$  y TRH no modifico los resultados observados en los animales tratados sólo con  $T_4$ .

## VIII. DISCUSIÓN

Los resultados de este experimento, confirman y amplian los estudios ahora clásicos de Herlant (1964), Purves (1966), Costoff (1973), Baker (1974), Surks y Defesi (1977), DeFesi y col (1979), Astier y col (1980), Horvath y col (1990), en los que se muestra que en el hipotiroidismo de larga evolución persisten la hipertrofia, un mayor número de tirotrópos y una disminución de los somatotropos. En este estudio, la semejanza entre las cuentas mitóticas de los grupos testigo eutiroideo y tiroidectomizado, muestra que no obstante los cambios en las poblaciones de





**Figura 6.-** Efectos de la TRH, diferentes dosis de  $T_4$  y la co-administración de diferentes dosis de  $T_4$ +TRH, sobre las concentraciones séricas de TSH (Panel a),  $T_4$  y  $T_3$  (Panel b) en ratas tiroidectomizadas (Tx) 5 meses antes. Testigos eutiroides (TE) permanecieron intactos. TRH; 100 ng SC 3 veces al día/10 días.  $T_4$ ; 0.5, 3 o 10  $\mu$ g MI cada tercer día/10 días.  $n = 9-10$  ratas/grupo. Los valores se expresan como la media  $\pm$  EEM. ND = No detectable. Las letras diferentes encima de las barras indican diferencias significativas entre ellas. En el panel b, de la a-c corresponden a la  $T_3$  y de la d-g a la  $T_4$ .

tirotropos y somatotropos en mitosis, la replicación celular hipofisiaria en el grupo tiroidectomizado alcanzó un estado estable, semejante al del grupo testigo eutiroideo. La comparación entre el grupo testigo eutiroideo de este experimento con el testigo eutiroideo del Experimento I (jóvenes vs adultos) (Tablas I y III), muestra que la tasa de replicación celular es menor en los animales adultos, confirmando así que la renovación celular adenohipofisiaria disminuye conforme se envejece (Baker, 1974).

La presencia de dos hormonas diferentes en un mismo tipo celular ha sido demostrado para la FSH y LH en los gonadotropos (Baker, 1974) y GH y PRL en los mammosomatotropos (Stefaneanu y col, 1989). Horvat y col (1990) utilizando técnicas de doble inmunotinción a nivel de microscopía electrónica y doble inmunotinción histoquímica, describieron que durante la instalación del hipotiroidismo primario ocurre el fenómeno de transdiferenciación celular de somatotropos a tirotropos, durante el cual, los gránulos secretorios de los somatotropos se desplazan hacia la periferia y son secretados, mientras que en el retículo endoplásmico rugoso empieza a aparecer la TSH, cuyo proceso sintético continúa hasta aparecer en los gránulos de secreción substituyendo completamente a los de GH. Cambios opuestos ocurren en los animales hipotiroideos tratados con  $T_3$ .

En nuestro estudio, los tratamientos con  $T_4$  incrementaron el número total de células en mitosis en función de la dosis. La co-administración de  $T_4$  y TRH tuvo un efecto sinérgico sobre este mismo parámetro. Pequeñas dosis de  $T_4$  no afectaron la replicación de los somatotropos, estimuló la replicación de los tirotropos e inhibió la replicación de las células en mitosis no inmunoteñidas. Pequeñas dosis de  $T_4$  + TRH tuvieron efecto semejante al del grupo anterior sobre los somatotropos y tirotropos excepto que sobre las células en mitosis no inmunoteñidas tuvo un efecto mitogénico estimulante. Dosis elevadas de  $T_4$  (10  $\mu$ g) acompañadas o no con TRH, afectaron diferencialmente la replicación de los somatotropos, que se incrementaron, y

tirotropos, que disminuyeron y la replicación de las células no inmunotefidas que también aumentaron.

En nuestro estudio, el tratamiento con 0.5  $\mu\text{g}$  de  $T_4$  durante 10 días a los animales tiroidectomizados, aunque insuficiente para modificar los valores plasmáticos de ambas tironinas y el número total de mitosis, si fue suficiente para inhibir la secreción de TSH y estimular la replicación diferencial de los tirotropos. Sin embargo, la suma de los tirotropos, somatotropos y células en mitosis no inmunotefidas es mayor que el número total de células en mitosis. Este resultado sugiere que una célula en mitosis puede contener a ambos tipos hormonales o bien que además de estarse transdiferenciando de somatotropo a tirotropo, también puede experimentar mitosis, lo que explicaría la duplicación en el conteo de algunas de las células en mitosis. La aplicación de técnicas de doble inmunotinción tanto a nivel de microscopía electrónica como histoquímica en conjunto con la citometría de flujo, ayudarían tal vez a contestar o desechar estas posibilidades.

Según Astier y col (1980) la administración de  $T_4$  a animales tiroidectomizados estimula la replicación de otros tipos celulares (aparte de los tirotropos, somatotropos, mamotropos, gonadotropos y corticotropos). Aunque por los resultados de nuestro estudio no se puede descartar la posibilidad de que las células en mitosis no inmunotefidas sean tirotropos o somatotropos degranulados, el incremento en el número de mitosis tanto en los somatotropos y en las células en mitosis no inmunotefidas de los animales hipotiroideos tratados con 10  $\mu\text{g}$  de  $T_4$ , apoyan el concepto de que las hormonas tiroideas juegan un papel central en el control de la proliferación celular adenohipofisiaria.

El efecto mitogénico de la TRH sobre las células adenohipofisiarias ha sido demostrado tanto in vivo por Kunert-Radek y Pawlikowski (1975), Pawlikowski y

Slowinska-Klencka (1994) y por nosotros (vide supra), así como in vitro por Pawlikowski y col (1975, 1978), Komolov y col (1978, 1985) y Rappay y col (1980). Los estudios de Komolov y col (1978, 1985) y Rappay y col (1980) en los que se emplearon células dispersas de hipófisis en cultivo, mostraron que la TRH tiene un efecto mitogénico general sobre la adenohipófisis y ningún efecto sobre la replicación específica de los tirotrópos. En nuestros resultados la administración de TRH a los animales con hipotiroidismo crónico no tuvo efecto mitogénico sobre ninguno de los tipos celulares estudiados. Esta contradicción entre el efecto proliferativo de la TRH observado en el hipotiroidismo agudo y en las células de hipófisis en cultivo y la ausencia de este efecto en el hipotiroidismo crónico observado en nuestro experimento, puede ser explicado en parte por la presencia de las hormonas tiroideas.

Así, es posible que en el hipotiroidismo de 15 días, todavía esten circulando pequeñas cantidades de hormonas tiroideas (Van Middlesworth, 1974), y que los efectos remanentes de las hormonas tiroideas sobre las funciones celulares persisten mayor tiempo, lo que apoya la idea de que al evaluar el estado tiroideo se deben considerar no solo las concentraciones plasmáticas de las hormonas tiroideas (McNabb, 1992c).

La presencia de hormonas tiroideas en los medios de cultivo también explicarían los efectos mitogénicos de la TRH en células adenohipofisarias en cultivo, ya que los cultivos hipofisarios fueron complementados con suero completo, que se sabe contienen hormonas tiroideas. Esta interpretación es apoyada por el efecto mitogénico de la  $T_4$  cuando se administró sola y el efecto mitogénico sinérgico que se observó en los animales con hipotiroidismo crónico con la administración simultánea de  $T_4$ +TRH.

Nuestros resultados permiten sugerir que en el hipotiroidismo crónico: a) *per se* la TRH no posee efecto mitogénico, b) que los efectos mitogénicos de la TRH son dependientes de la presencia de hormonas tiroideas y c) que el efecto mitogénico de la TRH es sobre los somatotropos y las células no inmunotefidas.

Los valores de las concentraciones séricas de la hormona tiroideas en los animales tiroidectomizados fueron mayores a las concentraciones esperadas. No se tiene una explicación para este resultado, a menos que se piense que la T<sub>4</sub> sea liberada lentamente a partir de sitios de reserva no descritos hasta el momento.

Los presentes resultados también muestran que la T<sub>4</sub> ejerce un efecto diferencial entre la síntesis-secreción de TSH y la replicación celular. La mayoría de los estudios sobre el control de la secreción de TSH, analizan la "secreción" de la hormona dando por sentado que tanto la síntesis como la liberación están acopladas y pueden ser consideradas como una unidad. Es posible que este concepto sea válido cuando ambos fenómenos se encuentran en equilibrio, es decir cuando la intensidad de la síntesis es equivalente a la secreción, ésto sin importar si los mecanismos que las regulan sean los mismos (McNabb, 1992a). Con base en los estudios de Spira y col (1979a, 1979b, 1980 y 1986) sobre la síntesis y secreción de TSH, los de Astier y col (1980) y DeFesi y col (1981) sobre las poblaciones hipofisarias de tirotrópos y somatotropos en animales tiroidectomizados, así como nuestros resultados sobre la replicación celular y secreción de TSH, se puede pensar que, al igual que ocurre en el grupo testigo eutiroideo, en los animales tiroidectomizados los procesos de síntesis/secreción, poblaciones celulares y replicación celular, se encuentran en equilibrio. La disociación observada entre la inhibición de la secreción de TSH y el incremento en el porcentaje relativo de los tirotrópos en mitosis en respuesta a la dosis más baja de T<sub>4</sub>, tiene múltiples explicaciones. Resulta razonable proponer que estas pequeñas dosis de hormona tiroidea en el tirotrópo estimula la maquinaria responsable

de la replicación celular, la síntesis y el almacenamiento de TSH pero no su secreción y también el número de receptores a TRH.

A diferencia de lo descrito por Sellers y col (1953, 1957); Teir y col (1956) y Yamada (1959) (discutidos por Tonooka y Greer, 1980; Morley, 1981; Scanlon y Toft, 1996), en nuestro estudio no se observó el incremento paradójico de la secreción de TSH de los animales tiroidectomizados en respuesta al tratamiento con las diferentes dosis de  $T_4$ . Una posible explicación sería que en nuestro experimento los animales cursan con un hipotiroidismo profundo, por lo que la TRH endógena no tendría efecto sobre la secreción de TSH. Si esto es cierto, la administración de pequeñas cantidades de  $T_4$  sensibilizaría a los tirotrapos al efecto secretagogo y mitogénico de la TRH. Esto ocurrió en el grupo que recibió simultáneamente 0.5  $\mu\text{g}$  de  $T_4$ +TRH, en el que tanto la replicación de los tirotrapos y las concentraciones séricas de TSH se incrementaron significativamente.

Que la co-administración de bajas dosis de  $T_4$ +TRH se acompañara, al cabo de 4 horas post TRH, de cifras elevadas de TSH circulante, permite sugerir que en el hipotiroidismo primario, la TRH induce la síntesis de formas más glucosiladas de TSH, hecho que les confiere una vida media más prolongada (Ponsin y Mornex (1983); Taylor y Weintraub (1985); Constant y Weintraub (1986); Wondisford y col (1996)). Esta observación, aunada a la ausencia de efectos secretagogos y mitogénicos de la TRH cuando se administró sola, apoya la noción de que la TRH y las hormonas tiroideas interactúan a nivel del tirotropro y determinan su estado funcional, controlando la sensibilidad del propio tirotropro a la acción de ellas mismas, así como a la acción de otros factores hipofisiotrópicos.

Los efectos inhibitorios de las dosis altas de  $T_4$ , sin y con TRH, sobre la secreción de TSH, la replicación de los tirotrapos y la estimulación de los

somatotropos confirman los bien conocidos efectos de retroacción de las hormonas tiroideas sobre la hipófisis (Bakke y Lawrence, 1964; Spira y col, 1979,1986; Tonooka y Greer, 1980; Franklyn y col, 1986, 1987; Emerson y col, 1989; Amr y col, 1986; Gurr y col, 1990; Shupnik and Ridway, 1987 revisado por Scanlon, 1996 ; De Léan y col, 1977; Hinkle y Perrone, 1981; Nemeroff y col, 1980).

Cabe destacar que nuestros resultados también apoyan el concepto de que las hormonas tiroideas constituyen el factor más importante en el control global de las funciones del tiotropo (McNabb, 1992; Jackson, 1994), y participan en el control de las funciones del eje hipotálamo-somatotropos (De Gennaro y col, 1988 ; Varela y col, 1991; Miki y col, 1992; Morreale de Escobar y col, 1993; Rodríguez García y col, 1995).

## **IX. CONCLUSIONES**

Los resultados de este estudio, concuerdan con el bien conocido efecto regulatorio, permisivo o ambos de las hormonas tiroideas sobre la replicación y actividad biosintética de los tiotropos y somatotropos hipofisarios (DeFesi y col, 1979; Astier y col, 1980; Samuels y col, 1988; Davis, 1991; McNabb 1992), y permiten concluir que en el hipotiroidismo de larga evolución:

- 1) La tasa de recambio celular adenohipofisaria es semejante al del animal eutiroides.
- 2) La  $T_4$  en pequeñas cantidades, posee efecto mitogénico sobre los tiotropos, mientras que en dosis elevadas inhibe a los tiotropos y estimula la replicación de los somatotropos y a las células del tipo "indiferenciado".
- 3) La TRH sola no tiene efecto mitogénico sobre la adenohipófisis.

**4) La TRH junto con dosis elevadas de  $T_4$  tienen un efecto mitogénico sinérgico sobre los somatotropos e inhibitorio sobre los tirotropos.**

**5) Las hormonas tiroideas participan en el control de las funciones de los tirotropos, somatotropos y posiblemente sobre las funciones de las células del tipo "indiferenciado".**



## **CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS**

**De los resultados de esta tesis, se obtuvieron las siguientes conclusiones:**

**En la adenohipófisis de las ratas eutiroideas:**

**1) La tasa de renovación celular mas activa ocurre en las células “indiferenciadas” y en los somatotropos y menos en los tirotropos.**

**2)La tasa de renovación de los somatotropos, tirotropos y células en mitosis no inmunotefidas disminuye conforme se envejece.**

**En la adenohipófisis de las ratas con hipotiroidismo agudo:**

**1) La tasa de replicación celular se incrementa en base a la replicación mitótica de los tirotropos y de las células no inmunotefidas.**

**2) La TRH estimula la replicación de las células en mitosis no inmunotefidas.**

**3) La TRH no posee efecto mitogénico sobre los tirotropos.**

**4) Al parecer, las células en mitosis no inmunotefidas participan en los ajustes de las poblaciones celulares.**

**5) La deficiencia de hormonas tiroideas estimula la replicación mitótica de los tirotropos y de las células en mitosis no inmunotefidas.**

6) La deficiencia de hormonas tiroideas y la TRH co-participan en la estimulación de la replicación de las células en mitosis no inmunotefidas.

En la adenohipófisis de las ratas con hipotiroidismo crónico:

1) La tasa de recambio celular alcanza un equilibrio semejante al del animal eutiroideo.

2) En pequeñas dosis, la  $T_4$  posee efecto mitogénico sobre los tirotropos, mientras que en dosis elevadas inhibe a los tirortopos y estimula la replicación de los somatotropos y a las células en mitosis no inmunotefidas.

3) La TRH *per se*, no tiene efecto mitogénico sobre la adenohipófisis.

4) La TRH junto con dosis elevadas de  $T_4$  tienen un efecto mitogénico sinérgico sobre los somatotropos e inhibitorio sobre los tirotropos.

Además de las conclusiones anteriores, nuestros resultados sugieren que:

1.- Junto con los cambios en la replicación de los fenotipos celulares específicos, la replicación de las células en mitosis no inmunotefidas parece jugar un papel importante en los mecanismos de adaptación de la adenohipófisis, estimulados por las demandas fisiológicas o desbalances hormonales en los cuales esta involucrada.

2.- Más estudios se requieren para establecer si las células en mitosis no inmunotefidas corresponden a un grupo de células totipotenciales, o a diferentes líneas celulares que son reclutadas en respuesta a diversas condiciones endocrinas.

**3.- El fenómeno de la transdiferenciación celular y la replicación mitótica podrían estar ocurriendo simultáneamente.**

**4.- Lo anterior apoya que las antiguas hipótesis sobre los cambios celulares de la adenohipófisis también pueden ocurrir por transdiferenciación celular, reclutamiento de células indiferenciadas y replicación de células totipotenciales.**

**El conocimiento de los mecanismos a través de los cuales ocurren los ajustes celulares de la adenohipófisis a las diversas situaciones endocrinas en las que esta involucrada, nos ayudará a conocer los procesos fisiopatológicos que desencadenan la aparición de los diferentes tipos de tumores adenohipofisarios.**

**Por todo lo anterior se puede apreciar que aún queda un largo camino por recorrer, camino en el que trataremos de seguir avanzando según nuestras posibilidades.**

## **XI. REFERENCIAS**

1. Acevedo MS. (1989): Estandarización del radioinmunoanálisis de las hormonas triyodotironina y tirotropina en suero de rata. **Tesis de Licenciatura para obtener el título de Biólogo**. Universidad Autónoma de Aguascalientes.
2. Aizawa T, Kobayashi M, Komiya I, Hiramatsu K, Sato A y Yamada T. (1984). Increased sensitivity of the thyrotroph to thyrotropin-releasing hormone in rats with hypothalamic hypothyroidism. **Endocrinology**, **114**: 8-13.
3. Amr S, Lippman SS y Weintraub BD. (1986): Effects of TRH on thyrotrophs function and number in rat pituitaries transplanted to renal capsule. **American Journal of Physiology**, **251**: E563-E568.
4. Aronin N, Doslovsky R y Chase K. (1988): hypothyroidism increases substance P concentrations in the heterotropic anterior pituitary. **Endocrinology**, **122**:2911-2914.
5. Astier HS, DeFesi CR y Surks MI. (1980) Kinetics of deoxyribonucleic acid synthesis and replication on thyrotrophs and somatotrophs during development of hypothyroidism and L-triiodothyronine treatment of hypothyroid rats. **Endocrinology**, **106**:1537-1548.
6. Baker BL. (1974): Functional Cytology of the Hypophysial Pars Distalis and Pars Intermedia. En: Handbook of Physiology. Section 7. Vol. IV. Part 1. **The Pituitary Gland and its Neuroendocrine Control**. American Physiological Society. Washington, D.C. pp, 45-80.

7. Bakke JL y Lawrence N. (1964): Influence of propylthiouracil and thyroxine on synthesis and secretion of thyroid stimulating hormone in the hypothyroid rat. **Acta Endocrinologica (Copenh.)**, **46**:111-123.
8. Bauer K. (1987). Adenohypophyseal degradation of thyrotropin-releasing hormone regulated by thyroid hormones. **Nature**, **330**: 375-378.
9. Bauer K, Carmeliet P, Schulz M, Baes M y Deneef C. (1990). Regulation and cellular localization of the membrane-bound thyrotropin-releasing hormone-degrading enzyme in primary cultures of neuronal, glial and adenohypophysial cells. **Endocrinology**, **127**: 1224-1233.
10. Beddow D, Dhariwal PS y McCann SM. (1970): Effects of chronic administration of sheep stalk-median eminence extract on organ weights of immature hypophysectomized rats with pituitary grafts. **Proceedings Society for Experimental Biology and Medicine**, **135**: 671-674.
11. Bruhn TO, Rondeel JMM, Bolduc TG y Jackson IM. (1994). Thyrotropin-releasing hormone (TRH) gene expression in the anterior pituitary. I. Presence of pro-TRH messenger ribonucleic acid and pro-TRH-derived peptide in a subpopulation of somatotrophs. **Endocrinology**, **134**: 815-820.
12. Bruhn TO, Rondeel JMM, Bolduc TG y Jackson IM. (1994). Thyrotropin-releasing hormone gene expression in the anterior pituitary. II. Stimulation by glucocorticoids. **Endocrinology**, **134**: 821-825.

13. Bruhn TO, Rondeel JMM, Bolduc TG y Jackson IM. (1994). Thyrotropin-releasing hormone gene expression in the anterior pituitary. III. Stimulation by thyroid hormone: Potentiation by glucocorticoids. **Endocrinology**, 134: 826-830.
14. Carr FE, Galloway RJ, Reid AH, Kassem LL, Dhillon G, Fein HG y Smallridge RC. (1991): Thyrotropin-releasing hormone regulation of thyrotropin  $\beta$ -subunit gene expression involves intracellular calcium and protein kinasa C. **Biochemistry**, 30: 3721-3728.
15. Childs GV, Rougeau D y Unabia G. (1995): Corticotropin-releasing hormone and epidermal growth factor: mitogens for anterior pituitary corticotropes. **Endocrinology**, 136:1595-1602.
16. Constant RB y Weintraub BD. (1986): Differences in the metabolic clearance of pituitary and serum thyrotropin (TSH) derived from euthyroid and hypothyroid rats. **Endocrinology**, 119: 2720-2730.
17. Costoff A. (1973a): Thyrotropes. En: **Ultrastructure of Rat Adenohypophysis. Correlation with Function**. Academic Press. New York. pp, 13-25.
18. Costoff A. (1973b): Somatotropes. En: **Ultrastructure of Rat Adenohypophysis. Correlation with Function**. Academic Press. New York. pp, 113-129.
19. Davis PJ. (1991): Cellular actions of thyroid hormones En: LE Braverman, RD Utiger. J.B (Ed). **Werner and Ingbar's. The Thyroid A Fundamental and Clinical Text**. Lippincott Company. Philadelphia. pp, 190-203.

20. De Gennaro V, Cella SG, Bassetti M, Rizzi R, Cocchi D and Muller EE. (1988): Impaired growth hormone secretion in neonatal hypothyroid rats: hypothalamic versus pituitary component. **Proceedings Society Experimental Biology and Medicine**, **187**:99-106.
21. De Léan A, Ferland L, Drouin J, Kelly PA y Labrie F. (1977): Modulation of pituitary thyrotropin releasing hormone receptor levels by estrogens and thyroid hormones. **Endocrinology**, **100**:1496-1504.
22. DeFesi CR, Astier HS y Surks MI. (1979): Kinetics of thyrotrophs and somatotrophs during development of hypothyroidism and L-triiodothyronine treatment of hypothyroid rats. **Endocrinology**, **104**:1172-1180.
23. DeFesi CH y Surks MI. (1981): 3,5,3'- Triiodothyronine effects on the growth rate and cell cycle of cultured GC cells. **Endocrinology**, **108**: 259-267.
24. Dubois PM y Hemming FJ. (1991): Fetal development and regulation of pituitary cell type. **Journal of Electron Microscopy Technique**, **19**:2-20.
25. Dubois PM y ElAmraoui A. (1995): Embryology of the pituitary gland. **Trends In Endocrinology and Metabolism**, **6**:1-7.
26. Dyess EM, Segerson TP, Lipozits Z, Paull WK, Wu P, Jackson IMD y Lechan RM. (1988): Triiodothyronine exerts direct cell-specific regulation of thyrotropin-releasing-hormone gene expression in the hypothalamic paraventricular nucleus. **Endocrinology**, **123**: 2291-2297.

27. Emerson CH, Lew R, Braberman LE y DeVito WJ. (1989): Serum thyrotropin concentrations are more highly correlated with serum triiodothyronine concentrations in thyroid hormone-infused thyroidectomized rats. **Endocrinology**, **124**: 2415-2418.
28. Everett JW. (1956): Functional corpora lutea maintained for months by autografts of rats hypophysis. **Endocrinology**, **58**: 786-796.
29. Fares FA, Gruener N y Kraiem Z. (1996): The role of the asparagine-linked oligosaccharides of the  $\alpha$ -subunit in human thyrotropin bioactivity. **Endocrinology**, **137**: 555-560.
30. Franklin JA, Lynam T, Docherty K, Ramsdem DB y Sheppard MC. (1986): Effect of hypothyroidism on pituitary cytoplasmic concentrations of messenger RNA encoding thyrotropin  $\beta$  and  $\alpha$  subunits, prolactin and growth hormone. **Journal of Endocrinology**, **108**: 43-47.
31. Franklyn JA, Wood DF, Balfour NJ, Ramsden DB, Docherty K, Chin WW and Sheppard M. (1987): Effect of hypothyroidism and thyroid hormone replacement *in vivo* on pituitary cytoplasmic concentrations of thyrotropin- $\beta$  and  $\alpha$ -subunit messenger ribonucleic acids. **Endocrinology**, **120**: 2279-2288.
32. Fujimoto J, Straub RE y Gershengorn MC. (1991): Thyrotropin-releasing hormone (TRH) and phorbol myristate acetate decrease TRH receptor messenger RNA in rat pituitary GH3 cells: Evidence that protein kinase-C mediates the TRH effect. **Molecular Endocrinology**, **5**: 1527-1532.



33. Genuth SM. (1990a): **General Principles of Endocrine Physiology**. En: Berne RM and Levy MN (Ed). **Principles of Physiology**. The C.V. Mosby Co. St. Louis Mo. pp, 478-490.
34. Genuth SM. (1990b): **The Hypothalamus and Pituitary Gland** En: Berne RM and Levy MN (Ed). **Principles of Physiology**. The C.V. Mosby Co. St. Louis Mo. pp, 529-545.
35. Genuth SM. (1990c): **The Thyroid Gland**. En: Berne RM and Levy MN (Ed). **Principles of Physiology**. The C.V. Mosby Co. St. Louis Mo. pp, 546-557.
36. Gershengorn MC y Osman R. (1996): **Molecular and cellular biology of thyrotropin-releasing hormone receptor**. **Physiological Reviews**, 76:175-191.
37. Gertz BJ, Contreras LN, McComb DJ, Kovacs K, Tyrrell JB y Dallman MF. (1987): **Chronic administration of corticotropin-releasing factor increases pituitary corticotroph number**. **Endocrinology**, 120: 381-388.
38. Gill JN. (1991): **The Hypothalamic-Pituitary Control System**. En: **Best and Taylor's Physiological Basis of Medical Practice**. Jhon B. West Editor. William & Wilkins Baltimore. pp,795-810.
39. Goodman HM. (1994a): **Pituitary Gland**. En: **Basic Medical Endocrinology**. Raven Press. New York. pp, 28-45.
40. Goodman HM. (1994b): **Thyroid Gland**. En: **Basic Medical Endocrinology**. Raven Press. New York. pp, 46-70.

41. Grant GF y Vale W. (1974): Hypothalamic control of anterior pituitary hormone secretion characterized hypothalamic-hypophysiotropic peptides. En: **Current Topics in Experimental Endocrinology. Vol 2.** James-Martini (Ed). Academic Press Inc. pp, 37-72.
42. Green JD. (1966): The comparative anatomy of the portal vascular system and of the innervation of the hypophysis. En: Harris GW and Donovan BT (Ed). **The Pituitary Gland.** London Butterworths. Berkeley: Univ. of California Press. Vol 1. pp, 127-146.
43. Greenspan FS. (1994): The Thyroid Gland. En: Greenspan FS and Dexter JB(Ed). **Basic & Clinical Endocrinology.** Appleton & Lange. Norwalk, Connecticut. pp, 160-226.
44. Gurr JA, Januszkeski MM, Tidikis IM, Norcross JJ y Kourides IA. (1990): Thyroid hormones regulates expression of the thyrotropin  $\beta$ -subunit gene from both transcription start sites in the mouse and rat. **Molecular and Cellular Endocrinology, 71:** 185-193.
45. Guyton AC y Hall JE. (1996): Organization of the nervous system; Basic functions of synapses and transmitter substances. En: **Textbook of Medical Physiology.** W.B. Saunders Co. Philadelphia. pp, 565-582.
46. Hattori A, Ishii S y Wada M. (1986): different mechanisms controlling FSH and lh release in japanese quail (*coturnix coturnix japonica*): evidence for an inherently spontaneous release and production of FSH. **Journal of Endocrinology, 108:**239-245.

47. Heritier AG y Dubois M. (1993): Influence of thyroliberin on the rat pituitary cell type differentiation: an *in vitro* study. **Endocrinology**, **132**: 634-639.
48. Herlant M. (1964): The cells of the adenohipophysis and their functional significance. **International Review of Cytology**, **17**:299-382.
49. Hinkle PM, Perrone MH y Schonbrunn A. (1981): Mechanism of inhibition of thyrotropin-releasing hormone action. **Endocrinology**, **108**: 199-205.
50. Horacek MJ, Campbell GT y Blake ChA. (1989): Luteinizing hormone (LH)-releasing hormone: effects on induction of LH, follicle-stimulating hormone, and prolactin cell differentiation. **Endocrinology**, **124**: 1800-1806.
51. Horvath E, Lloyd RV y Kovacs K. (1990): Propylthiouracyl-induced hypothyroidism results in reversible transdifferentiation of somatotrophs in thyroidectomy cells. **Laboratory Investigation**, **63**:511-519.
52. Huben H y Deneff C. (1990): Regulatory peptides produced in the anterior pituitary. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, **1**:398-403.
53. Ikeda I y Greer MA. (1993): TSH secretory response to prolonged infusion of TRH in hypothyroid rats. **Endocrine Journal**, **40**: 289-295.
54. Ishikawa K, Inoue K, Kakegawa T y Suzuki M. (1984): Role of the hypothalamic paraventricular nucleus in the secretion of thyrotropin under adrenergic and cold-stimulated conditions in the rat. **Endocrinology**, **114**: 352-358.

55. Ishikawa K, Inoue K, Kakegawa T y Suzuki M. (1987): Thyrotropin response to thyrotropin-releasing hormone in rats with hypothalamic knife cuts. **Neuroendocrinology**, **46**: 312-317.
56. Jackson IMD. (1994): Regulation of Thyrotropin Secretion. En: Imura H (Ed). **The Pituitary Gland**. Raven Press. New York. pp, 179-216.
57. Jaquet P, Jaquet C, Carayon P y Strauch G. (1974): Effets de l'administration prolongée de TRH chez le babouin. **Annales d' Endocrinologie (Paris)**, **35**: 581-582.
58. Jones KE y Chin WW. (1991): Differential regulation of thyroid hormone receptor messenger ribonucleic acid levels by thyrotropin-releasing hormone. **Endocrinology**, **128**: 1763-1768.
59. Kakita T, Patrilli LN y Odell W. (1984): Autoregulatory control of thyrotropin in rabbits. **Endocrinology**, **114**: 2301-2305.
60. Kaplan MM. (1984): The role of thyroid hormone deiodination in the regulation of hypothalamo-pituitary function. **Neuroendocrinology**, **38**: 254-260.
61. Klindt J, Davis SL y Ohlson DL. (1979): Plasma concentration of thyrotropin-releasing hormone, thyrotropin, prolactin, and growth hormone during five-day osmotic pump infusion of thyrotropin-releasing hormone. **Endocrinology**, **104**: 45-49.

- 62.Koch Y, Goldhaber G, Fireman I, Zor U, Shani J y Tal E. (1977): Suppression of prolactin and thyrotropin secretion in the rat by anti-serum to thyrotropin-releasing hormone. **Endocrinology**, **100**: 1476-1478.
- 63.Komolov IS, Fazekas I, Morozova LG, Rappay G y Fedotov VP. (1978): Effect of thyroliberin (thyrotropin-releasing hormone) on proliferation of adenohypophysis cells in monolayer culture. **Problemy Endokrinologii**, **24**: 60-62.
- 64.Komolov IS, Fedotov VP, Rappay G, Fazekas I, Gudoshnikov VI y Bácsy E. (1985): DNA synthesis in lactotrophs of primary rat anterior pituitary cell culture. Effects of thyroliberin, bromocriptine and somatostatin. **Histochemistry**, **82**: 497-500.
- 65.Krieg RJ, Johnson JH y Adler RA. (1989): Growth hormone (GH) secretion in the pituitary-grafted male rat: in vivo effects of GH-releasing hormone and isoproterenol and in vitro release by individual somatotropes. **Endocrinology**, **125**: 2273-2278.
- 66.Kruger D y Liotta A. (1990). ACTH y Related Peptides. En: Baulieu ET & Kelly PA (Ed) **Hormones From molecules to disease**. Hermann Publishers in Arts and Science. Chapman and Hall. New York. pp, 229-251.
- 67.Krulich L. (1982): Neurotransmitter control of thyrotropin secretion. **Neuroendocrinology**, **35**: 139-147.
- 68.Kunert-Radek J y Pawlikowski M (1975): The effect of thyrotropin releasing hormone on cell proliferation in the anterior pituitary gland of thyroidectomized rats. **Neuroendocrinology**, **17**:92-95.

69. Larsen PR, Silva JE y Kaplan MM. (1981). Relationships between circulating and intracellular thyroid hormones: Physiological and clinical implications. **Endocrine Reviews**, 2: 87-102.
70. Leblanc P, L'Heritier A y Kordon C. (1997). Cryptic gonadotropin-releasing hormone receptors of rat pituitary cells in culture and unmasked by epidermal growth factors. **Endocrinology**, 138:574-579.
71. Lehninger A, Nelson DL y Cox MM. (1993): Integration and Hormonal Regulation of Mammalian Metabolism. En: **Principles of Biochemistry**. Worth Publishers. New York. pp, 736-787.
72. Lewis CE, Megson A, Morris JF y Charlton HM. (1986): Multiple injections of LH-releasing hormone into hypogonadal (*hpg*) mice induce the appearance of two morphologically distinct populations of gonadotrophs. **Journal of Endocrinology**, 11: 483-493.
73. Lippman SS, Amr S y Weintraub BD. (1986): Discordant Effects of Thyrotropin (TSH)-Releasing Hormone on Pre- and Posttranslational Regulation of TSH Biosynthesis in rat Pituitary. **Endocrinology**, 119: 343-348.
74. Lloyd RV, Jin L, Song J, Terry LC, Horvath E y Kovacs K. (1990). Effects of propylthiouracil on growth hormone and prolactin messenger ribonucleic acids in the rat pituitary. **Laboratory Investigation**, 62: 347-354.
75. Magner JA. (1990): Thyroid-Stimulating Hormone: biosynthesis, cell biology, and bioactivity. **Endocrine Reviews**, 11: 354-385.

76. Maruta S y Greer MA. (1987): Repetitive or continuous thyrotropin (TSH) releasing hormone administration induces a biphasic rise in plasma TSH in euthyroid but not in hypothyroid rats. **Endocrinology**, 121: 1946-1952.
77. McNabb A. (1992): Control of Thyroid Gland Function. En: Hadley MC (Ed). **Thyroid Hormones**. Prentice Hall Endocrinology Series. Englewood Cliffs, NJ. pp, 49-73.
78. McNabb FMA (1992): The hypothalamic-pituitary-thyroid axis. Regulation of TSH secretion. En: Hadley MC (Ed). **Thyroid Hormones**. Prentice Hall Endocrinology Series. Englewood Cliffs, NJ. pp, 51-56.
79. McNabb FMA (1992): Circulating thyroid hormones and hormone kinetics. En: Hadley MC (Ed). **Thyroid Hormones**. Prentice Hall Endocrinology Series. Englewood Cliffs, NJ. pp, 95-112.
80. McNicol AM Kubba MA y McTeague E. (1988): The mitogenic effect of corticotropin releasing factor on the anterior pituitary gland of the rat. **Journal of Endocrinology**, 118:237-241.
81. Menezes-Ferreira MM, Petrick PA y Weintraub BD. (1986): Regulation of thyrotropin (TSH) bioactivity by TSH-releasing hormone and thyroid hormone. **Endocrinology**, 118: 2125-2130.
82. Messier B. (1969): Effects of exogenous thyroxine on <sup>3</sup>H-thymidine uptake in mouse pituitary gland. **Acta Endocrinologica Copenh.** 61: 133-136.
83. Miki N, Ono M, Murata Y, Ohsaki E, Tamistu K, Ri t, Demura H y Yamada M. (1995): Thyroid hormone regulation of gene expression of the pituitary growth hormone-

releasing factor receptor. **Biomedical and Biophysics Research Communication**, 217:1087-1093.

84. Miki N, Ono M, Hizuka N, Aoki T y Demura H. (1992) : Thyroid hormone modulation of the hypothalamic growth hormone (GH)-releasing factor-pituitary GH axis in the rat. **Journal Clinical Investigation**, 90:113-120.

85. Mori M, Yamada M y Kobayashi S. (1988): Role of the hypothalamic TRH in the regulation of its own receptors in rat anterior pituitary pituitaries. **Neuroendocrinology**, 48: 153-159.

86. Morley JE. (1981): Neuroendocrine control of thyrotropin secretion. **Endocrine Reviews**, 2: 396-436.

87. Morreale de Escobar G, Calvo R, Escobar del Rey F y Obregón MJ. (1993): Differential effects of thyroid hormones on growth hormone and thyrotropic hormones in rat fetuses near term. **Endocrinology**, 132: 2054-2056.

88. Murakami M, Tanaka K, Greer MA y Mori M. (1988). Anterior pituitary type II thyroxine 5'-Deiodinase activity is not affected by lesions of the hypothalamic paraventricular nucleus which profoundly depress pituitary thyrotropin secretion. **Endocrinology**, 123: 1676-1681.

89. Nemeroff CHB, Bissette G, Martin JB, Brazeau P, Vale W, Kizer JS y Prange AJ. (1980): Effect of chronic treatment with thyrotropin-releasing hormone (TRH) or an analog of trh (linear  $\beta$ -alanine TRH) on the hypothalamic-pituitary-thyroid axis. **Neuroendocrinology**, 30: 193-199.



90. Okauchi Y, Takahashi H, Mizobuchi M, Bando H y Saito S. (1996). Thyrotropin-releasing hormone release in normal and hyperthyroid rats measured by microdialysis. **Tokushima Journal Experimental Medicine**, **43**: 93-100.
91. Olivier L, Vila-Porcile E, Racador O, Peillon F y Racadot J. (1975): Ultrastructure of pituitary tumor cells: a critical study. En: **Ultrastructure Biological Systems**. Dalton JA and Haguenu F (Ed) and Tixer-Vidal A and Farquhar (Ed). **The Anterior Pituitary Vol. 7**. Academic Press, Inc. New York. pp, 231-376.
92. Ozawa H. (1991): Changing ultrastructure of thyrotrophs in the rat anterior pituitary after thyroidectomy as studied by immuno-electron microscopy and enzyme cytochemistry. **Cell Tissue Research**, **263**: 405-412.
93. Ozawa H y Kurosumi K. (1993): Morphofunctional study on prolactin-producing cells of the anterior pituitaries in adult male rats following thyroidectomy, thyroxine treatment and/or thyrotropin-releasing hormone. **Cell Tissue Research**, **272**: 41-47.
94. Pantic VR. (1975): The specificity of pituitary cells and regulation of their activities. **International Review of Cytology**, **40**:153-186.
95. Pawelczyk T, Pawlikowski M y Kunert-Radek J. (1996): Effects of TRH, prolactin and TSH on cell proliferation in the intermediate lobe of the rat pituitary gland. **Journal of Endocrinology**, **148**: 193-196.
96. Pawlikowski M y Slowinska-Klencka D. (1994): Effects of TRH and TRH-like peptides on anterior pituitary cell proliferation in rats. **Cytobios**, **79**: 117-122.

97. Pawlikowski M, Stepień H y Kunert-Radek J (1975): Thyroxine inhibition of the proliferative response of the anterior pituitary to thyrotropin-releasing hormone *in vitro*. **Neuroendocrinology**, **18**:277-280.
98. Pawlikowski M, Kunert-Radek J y Stepień H. (1975): Somatostatin inhibits the mitogenic effect of thyroliberin. **Separatum Experientia**, **34**: 271.
99. Pawlikowski M, Stepień H y Kunert-Radek J. (1995): Neuroendocrine control of the anterior pituitary cell proliferation and its relevance for pathogenesis and treatment of pituitary adenomas. **Annales Academiae Medicae Lodzensis (Poland)**, **36**: 25-30.
100. Peake GT, Birge CA y Daughaday WH. (1973). Alterations of radiomunoassayable growth hormone and prolactin during hypothyroidism. **Endocrinology**, **92**: 487-493.
101. Perera MJG. (1984): Estandarización e implementación del bioensayo de tirotrópina humana (hTSH) en rata. **Tesis de Licenciatura para obtener el título de Biólogo**. Facultad de Ciencias. UNAM. México.
102. Ponce G, Charli JL, Pasten Ja, Aceves C y Joseph-Bravo P. (1988). Tissue-specific regulation of pyroglutamate aminopeptidase II activity by thyroid hormones. **Neuroendocrinology**, **48**: 211-218.
103. Ponsin G y Mornex R. (1983): Control of thyrotropin glycosylation in normal rat pituitary cells in culture: effect of thyrotropin-releasing hormone. **Endocrinology**, **13**: 549-556.

104. Porter JC, Hines MFM, Smith KR, Repass RC y Smith AJK. (1967): Quantitative evaluation of local blood flow of the adenohipofisis in rats. **Endocrinology**, **80**:583-592.
105. Porter TE, Hill JB, Wiles CD y Frawley L.S. (1990): Is the mammosomatotrope a transitional cell for the functional interconversion of growth hormone- and prolactine-secreting cells? suggestive evidence for virgen, gestating, and lactating rats. **Endocrinology**, **127**:2789-2794.
106. Purves HD. (1966): Cytology of the adenohipofisis. En: Harris GW and Donovan BT (Ed). **The Pituitary Gland**. London Butterworths. Berkeley: Univ. of California Press. Vol 1. pp, 147-232.
107. Rabello MM, Snyder PJ y Utiger RD. (1974): Effects on the pituitary-thyroid axis and prolactin secretion of single and repetitive oral doses of thyrotropin-releasing hormone (TRH). **Journal Clinical and Endocrinology Metabolism**, **39**: 571-578.
108. Rappay G, Komolov IS, Fazecas Y, Báksy E, Abramova VV y Fedotov VP. (1980): Rate of thymidine incorporation and incidence of parenchymal cell division in adult rat hypophyseal cell cultures. Effect of thyroliberin and somatostatin. **Acta Biol Acad Sci Hung.**, **31**:249-255.
109. Rehfeld JF. (1988): The expression of progastrina, procholecystokinina and their hormonal products in pituitary cells. **Journal of Molecular Endocrinology**, **1**:87-94.
110. Reichlin S. (1992): Neuroendocrinology. Hypothalamus and Pituitary En: Wilson y Foster (Ed). **Williams Textbook of Endocrinology**. WB Saunders Co. Philadelphia. pp, 135-219.

111. Renner U, Pagotto U, Artz E y Stalla GK (1996). Autocrine and paracrine roles of polypeptide growth factors cytokines and vasogenic substances in normal and tumorous pituitary function and growth: a review. **European Journal of Endocrinology**, **135**: 515-532.
112. Rodríguez-García M, Jolín T, Santos A y Pérez-Castillo A. (1995): Effect of perinatal hypothyroidism on the developmental regulation of rat pituitary growth hormone and thyrotropin genes. **Endocrinology**, **135**: 4339-4350.
113. Rondeel JMM, de Greef WJ, Van der Schoot P, Karels B, Klootwijk W y Visser TJ. (1988): Effect of thyroid status and paraventricular area lesions on the release of thyrotropin-releasing hormone and catecholamines into hypophysial portal blood. **Endocrinology**, **123**: 523-527.
114. Rondeel JMM, DeGreef WJ, Klootwijk W y Visser TJ. (1992): Effects of hypothyroidism on hypothalamic release of thyrotropin-releasing hormone in rats. **Endocrinology**, **130**: 651-656.
115. Saberi M y Utiger RD. (1975): Augmentation of thyrotropin response to thyrotropin-releasing hormone following small decreases in serum thyroid hormone concentration. **Journal Clinical Endocrinology and Metabolism**, **40**: 435-441.
116. Sakai T, Inoue K, Hasegawa Y y Kurosumi K. (1988): Effect of passive immunization to gonadotropin-releasing hormone (GnRH) using GnRH antiserum on mitotic activity of gonadotrophs in castrated male rats. **Endocrinology**, **122**: 2803-2808.

117. Samuels HH, Aranda A y Casanova J. (1988): Identification of the *cis*-acting elements and *trans*-acting factors that mediate cell-specific and thyroid hormone stimulation of growth hormone gene expression. **Recent Progress Hormone Research**, **44**: 53-59.
118. Scanlon MF y Toft AD. (1996): Neuroendocrine Control of Thyrotropin Secretion. En: Braverman LE and Utiger RD (Ed). **Werner and Ingbar's. The Thyroid A Fundamental and Clinical Text**. JB. Lippincott Company. Philadelphia pp, 220-240.
119. Schally AV, Coy DH y Meyers Ch. (1978): A Hypothalamic regulatory hormones. **Annual Review of Biochemistry**, **47**:89-128.
120. Schwartz J y Cherny R. (1992): Intracellular communication within the anterior pituitary influencing the secretion of hypophyseal hormones. **Endocrine Reviews**, **13**: 453-475.
121. Shupnik MA y Ridgway ECH. (1987): Thyroid hormone control of thyrotropin gene expression in rat anterior pituitary cells. **Endocrinology**, **121**: 619-624.
122. Shupnik MA, Ridgway ECH y Chin WW. (1989): Molecular biology of thyrotropin. **Endocrine Reviews**, **10**: 459-475.
123. Shupnik MA, Rosenzweig BA y Showers MO. (1990): Interactions of thyrotropin-releasing hormone, phorbol ester, and forskolin-sensitive regions of the rat thyrotropin-beta gene. **Molecular Endocrinology**, **4**: 829-836.

- 124.Spira O y Gordon A. (1986): Thyroid hormone feedback effects on thyroid-stimulating hormone. En: Georg Hennemann (Ed). **Basic and Clinical Endocrinology/8 Thyroid Hormone Metabolism**. MDI Dekker. pp, 535-578.
- 125.Spira O, Birkenfeld A, Gross J y Gordon A. (1979): TSH synthesis and release in the thyroidectomized rat. a) effect of short-and long-term hypothyroidism. **Acta Endocrinologica (Copenh.)**, 92: 489-501.
- 126.Spira O, Birkenfeld A, Avini A, Gross J y Gordon A. (1979): TSH synthesis and release in the thyroidectomized rat. b) effect of T<sub>3</sub>. **Acta Endocrinologica (Copenh.)**, 92: 502-511.
- 127.Spira O, Gross J y Gordon A. (1981): TSH synthesis and release in the thyroidectomized rat. c) The effect of T<sub>3</sub> on hypothyroidism of varying duration. **Acta Endocrinologica (Copenh.)**, 97: 85-90.
- 128.St. Germain DL, Adler RA y Galton VA. (1985): Thyroxine 5'-deiodinase activity in anterior pituitary glands transplanted under the renal capsule in the rat. **Endocrinology**, 117: 55-63.
- 129.Stadtler F, Stocker E, Dhom G y Tietze HU. (1979): Autorradiographic studies on nuclear DNA and RNA synthesis in adenohipophysis of castrated rats. **Acta Endocrinologica**, 64: 324-338.
- 130.Stefaneanu L, Kovacs K, Horvath E, Asa SL, Losinski NE, Billestrups N, Price J y Vale W. (1989): Adenohipophysial changes in mice transgenic for human growth-hormone releasing factor: A histological, immunocytochemical, and electron microscopic investigation. **Endocrinology**, 125: 2710-2718.

131. Stefanescu L, Kovacs K, Horvath E, Losinski EN, Mayerhofer A, Wagner TE y Bartke A. (1990): An immunocytochemical and ultrastructural study of adenohypophyses of mice transgenic for human growth hormone. **Endocrinology**, **126**:608-615.
132. Stevenin B y Lee SL. (1995): Hormonal regulation of thyrotropin-releasing hormone (TRH) gene. **The Endocrinologist**, **5**:286-296.
133. Surks MI y DeFesi CR. (1977): Determination of the cell number of each cell type in the anterior pituitary of euthyroid and hypothyroid rats. **Endocrinology**, **101**:946-958.
134. Tam S-P, Lam KSL y Srivastava G. (1996). Gene expression of hypothalamic somatostatin, Growth hormone releasing factor, and their pituitary receptors in hypothyroidism. **Endocrinology**, **137**: 418-424.
135. Taniguchi Y, Tamatani R, Yasutaka S y Kaurai Y. (1995): Proliferation of pituitary corticotrophs following adrenalectomy as revealed by immunohistochemistry combined with bromodeoxyuridine-labeling. **Histochemistry**, **103**: 127-130.
136. Taylor T y Weintraub BD. (1985): Thyrotropin (TSH)-releasing hormone regulation of TSH subunit biosynthesis and glycosylation in normal and hypothyroid pituitaries. **Endocrinology**, **116**: 1968-1976.
137. Taylor T, Scouten ChW, Jacobowitz DM y Weintraub BD. (1986). The effects of anterior hypothalamic deafferentation on thyrotropin (TSH) biosynthesis and response to TSH-releasing hormone. **Endocrinology**, **118**: 2417-2424.

138. Taylor T, Wondisford FE, Blaine T y Weintraub BD. (1990): The paraventricular nucleus of the hypothalamus has a major role in thyroid hormone feedback regulation of thyrotropin synthesis and secretion. **Endocrinology**, **126**: 317-324.
139. Tixier-Vidal A, Gourdgi D y Tougard C. (1975): A cell culture approach to the study of anterior pituitary cells. **International Review of Cytology**, **41**: 173-239.
140. Tixier-Vidal A. (1975): Ultrastructure of anterior pituitary cells in culture. En: Tixier-Vidal A. and Farquhar MG. (Ed). **The Anterior Pituitary**. vol 7. Academic Press Inc. pp, 181-230.
141. Toft AD. (1991): Thyrotropin Assay, Secretory Physiology, and Testing of Regulation. En: Braverman LE and Utiger RD (Ed). **Werner and Ingbar's. The Thyroid A Fundamental and Clinical Text**. JB. Lippincott Company. Philadelphia. pp, 287-305.
142. Tonooka N y Greer MA. (1980): The Effect of Graded Doses of Thyroxine on plasma Thyrotropin Concentration in Rats Made Hypothyroid by Thyroidectomy or Propylthiouracyl. **Endocrinology**, **106**: 818-822.
143. Tuomisto J y Manisto P. (1985): Neurotransmitter Regulation of Anterior Pituitary Hormones. **Pharmacological Reviews**, **37**: 249-332.
144. Valverde RC y Montes V. (1989). Fisiología y Patología de la Unidad Hipotálamo-Hipofisiaria. En Woolrich J, Olivares L y Chávez IR (Ed). **Tratado de Medicina Interna**. El Manual Moderno, SA de CV. México. pp, 51-81.



145. Van Middlesworth L. (1974): Metabolism and excretion of thyroid hormones En: Handbook of Physiology. Section 7. Vol. III. Thyroid. Greep OR and Astwood EB (Ed). American Physiological Society. Washington, D.C. pp, 215-231.
146. Varela C, Cacicedo L, Fernández G, de los Frailes T y Sánchez Franco F. (1991): Influence of hypothyroidism duration on developmental changes in hypothalamic factors implicated in growth hormone secretion in the male rat. **Neuroendocrinology**, **54**: 340-345.
147. Wang PS, Huang SW, Tung YF, Pu HF, Tsai SC, Lau CP, Chien EJ y Chien CH. (1994). Interrelationship between thyroxine and estradiol on secretion of thyrotropin-releasing hormone and dopamine into hypophysial portal blood in ovariectomized-thyroidectomized rats. **Neuroendocrinology**, **59**: 202-207.
148. Westlund KN, Aguilera G y Childs GV. (1985): Quantification of morphological changes in pituitary corticotropes produced by *in vivo* corticotropin-releasing factor stimulation and adrenalectomy. **Endocrinology**, **116**: 439-445.
149. Wilbur DL, Yee JA y Raigue SE. (1978): Hypophysial portal vascular infusion of TRH in the rat: an ultrastructural and radioimmunoassay study. **American Journal of Anatomy**, **151**: 277-293.
150. Wondisford FE, Magner JA y Weintraub BD. (1996): Thyrotropin. En: Braverman LE and Utiger RD (Ed). **Werner and Ingbar's. The Thyroid A Fundamental and Clinical Text**. JB. Lippincott Company. Philadelphia. pp. 190-220.
151. Woosley JT. (1991): Measuring cell proliferation. **Archives of Pathology and Laboratory Medicine**, **115**: 555-557.

152. Yamada M, Rogers D y Wilber JF. (1989): Exogenous triiodothyronine lowers thyrotropin-releasing hormone concentrations in the specific hypothalamic nucleus (paraventricular) involved in thyrotropin regulation and also in posterior nucleus. **Neuroendocrinology**, 50: 560-563.
153. Yang HJ, Ozawa H y Kurosumi K. (1989): Ultrastructural changes in growth hormone cells in the rat anterior pituitary after thyroidectomy. **Journal Clinical Electron Microscopy**, 22: 269-283.
154. Zabo M y Frohman LA. (1977): Suppression of cold-stimulated thyrotropin secretion by antiserum to thyrotropin-releasing hormone. **Endocrinology**, 101: 1023-1033.

# Mitogenic effects of thyroxine and TRH on thyrotrophs and somatotrophs of the anterior pituitary gland in thyroidectomized rats

A Quintanar-Stephano and C Valverde-R<sup>1</sup>

Departamento de Fisiología y Farmacología, Centro Básico, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Av Universidad 940, Aguascalientes Ags, 20100 México and <sup>1</sup>Centro de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, México D F, 04510 México

(Requests for offprints should be addressed to A Quintanar-Stephano)

## Abstract

The question of whether thyroxine ( $T_4$ ) and TRH have a mitogenic effect on pituitary thyrotrophs and somatotrophs in thyroidectomized rats was investigated. Mitoses were counted in hematoxylin-eosin-stained or periodic acid-Schiff-hematoxylin-stained pituitary slides or immunostained for TSH or GH using male rats thyroidectomized for 5 months. Ten days before they were killed groups of rats were injected with different doses of  $T_4$  (0.5, 3 or 10  $\mu\text{g}$  i.m. every second day for 10 days), TRH alone (100 ng s.c. three times a day for 10 days), or  $T_4$  plus TRH (same doses as above). Mitoses (stopped with colchicine) were counted in  $1\text{ mm}^2$  areas at a magnification of  $\times 1000$ . In thyroidectomized rats, mitoses were not significantly increased and treatment with TRH or 0.5  $\mu\text{g}$   $T_4$  alone in thyroidectomized rats did not affect mitotic counts. In thyroidectomized rats treated with higher doses of  $T_4$ , mitoses were increased in a dose-dependent fashion. Simultaneous administration of TRH and  $T_4$  had a significant synergistic effect on pituitary mitoses in a  $T_4$  dose-dependent manner. The treatments also had differential effects on the relative percentages of cellular types in mitosis. Thus, 60% somatotrophs and 12.5% thyrotrophs were found in the euthyroid group. In thyroidectomized and thyroidectomized plus TRH groups, no somatotrophs in mitosis were seen, while thyrotrophs were 28.5% and

33.3% respectively. In thyroidectomized rats treated with low doses of  $T_4$ , somatotrophs and thyrotrophs in mitosis increased to 38.4% and 80% respectively and, with simultaneous administration of a low dose of  $T_4$  plus TRH, although less effective than  $T_4$  alone, mitosis increased in somatotrophs and thyrotrophs to 11.1% and 54.5% respectively. A high dose of  $T_4$  alone did not increase the mitotic figures in somatotrophs (38.8%), while it diminished the percentage of thyrotrophs to 25%. The administration of high doses of  $T_4$  plus TRH had an opposite effect on the mitotic figures of somatotrophs and thyrotrophs and thus the percentage of somatotrophs increased to 50% while thyrotrophs decreased to 5.5%. Ten days of treatment with  $T_4$  were insufficient to reverse the histology to euthyroidism. It can be concluded that in long-standing hypothyroidism: (1) thyroid hormone replacement elicits a dose-dependent and differential proliferative response on pituitary thyrotrophs and somatotrophs, (2) TRH is devoid of mitogenic effects when administered alone and (3) the proliferative response of somatotrophs to  $T_4$  is enhanced by its co-administration with TRH, suggesting a permissive and/or synergistic effect of the thyroid hormone and TRH.

*Journal of Endocrinology* (1997) **154**, 149–153

## Introduction

Pituitary morphological changes in primary hypothyroidism are well known. The pituitary weight of hypothyroid rats increases in association with both the hypertrophy and hyperplasia of thyrotrophs and the diminution of somatotrophs (for reviews see Costoff 1973, Baker 1974, Surks & DeFesi 1977, Horvath *et al.* 1990). Furthermore, these changes which are accompanied by increased thyrotropin-releasing hormone (TRH) secretion (Rondeel *et al.* 1992) and reversed by the administration of thyroid hormones (Baker 1974, DeFesi *et al.* 1979, Astier *et al.*

1980) reach a steady state after long-standing hypothyroidism (Surks & DeFesi 1977, DeFesi *et al.* 1979, Astier *et al.* 1980), thus indicating that the pituitary cell proliferative rate declines as thyroid hormone deficiency progresses. These findings and the pituitary mitogenic effects of TRH in both short-term hypothyroid rats (Kunert-Radek & Pawlikowski 1975) and in *in vitro* conditions in which fetal serum is present (Pawlikowski *et al.* 1975), are consistent with the interpretation that during the development of chronic hypothyroidism, thyroid hormones can still influence the sensitivity of the pituitary cell population to the proliferative effects of

TRH. If this is so, one can expect that in protracted hypothyroidism administration of TRH alone does not affect thyrotroph replication. Thyroid hormones alone may slightly enhance thyrotroph replication whereas, when combined with TRH, they may exert a stronger proliferative effect. This hypothesis was tested by treating rats which had been thyroidectomized for 5 months with TRH for 10 days, as well as with different doses of thyroxine ( $T_4$ ) with or without TRH. We found that, in chronic hypothyroidism, TRH alone or low doses of  $T_4$  did not stimulate mitoses. Low doses of  $T_4$  plus TRH increased the number of mitoses in both thyrotrophs and somatotrophs. Higher doses of  $T_4$  decreased thyrotroph mitoses while they were increased in somatotrophs. A high dose of  $T_4$  plus TRH had a synergistic effect on mitoses of pituitary somatotrophs.

### Materials and Methods

Wistar male rats (2 months old and  $200 \pm 30$  g) were rendered hypothyroid by thyroparathyroidectomy. Animals were maintained with 1% calcium lactate (drinking water) and standard Purina chow available *ad libitum* under a 12 h light:12 h darkness cycle. The standard diet was changed to a low iodine diet (20% calcium caseinate plus 80% broken corn) 4 months after surgery. Control rats were maintained on standard Purina chow and tap water. All experiments were conducted after 5 months of thyroidectomy. Rats were divided into the following nine groups ( $n=12-15$ ): euthyroid control (EC); thyroidectomized control (TxC); Tx+TRH; Tx+0.5  $\mu$ g  $T_4$ ; Tx+TRH+0.5  $\mu$ g  $T_4$ ; Tx+3  $\mu$ g  $T_4$ ; Tx+TRH+3  $\mu$ g  $T_4$ ; Tx+10  $\mu$ g  $T_4$ ; Tx+TRH+10  $\mu$ g  $T_4$ . Both the EC and TxC groups were injected s.c. with 100  $\mu$ l physiological saline solution three times a day for 10 days. In those groups treated with TRH (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA), the peptide was administered s.c. in a dose of 100 ng three times a day for 10 days. The last dose was injected 4 h before the animals were killed. In the other groups, a single dose of  $T_4$  (Sigma Chemical Co.) was injected i.m. every other day for 10 days, and the animals were killed 24 h after the last injection.

For the assessment of mitotic counts, three animals from each group were given colchicine (Aldrich Chemicals) in a single i.p. dose of 0.5 mg/100 g body weight 2 h before death (Sakai *et al.* 1988). All animals were decapitated between 1000 and 1100 h under light ether anaesthesia. While remaining in the sella, the neurointermediate lobe was immediately removed and the anterior lobe was rapidly excised, weighed and fixed in 10% buffered formalin for 1 week. After dehydration with graded ethanol, tissues were embedded in paraffin and 5–6  $\mu$ m thick serial horizontal sections were prepared. Contiguous sections for each gland were stained with hematoxylin-eosin (H-E), periodic acid-Schiff-hematoxylin (PAS-H)

or the Heindeinrain method, or immunostained for thyrotropin (TSH) or growth hormone (GH). For immunohistochemical analysis, the avidin-biotin-peroxidase complex method was applied using a kit (Vectastin ABC kit; Dimension Laboratories Inc.). Primary antibodies raised against rat GH (rGH) and rat TSH (rTSH) (kindly donated by NIDDK, Bethesda MD, USA) were used. The details of the immunohistochemical technique and control protocol have been described elsewhere (Stefaneanu *et al.* 1990). The total number of immunoreactive thyrotrophs and somatotrophs in mitosis was expressed as the percentage of total cells in mitosis within the same area in each experimental group. The pituitaries were examined by light microscopy at a magnification of  $\times 1000$  using an oil-immersion lens. Mitotic cells were defined as those which had clearly identifiable chromosomes. Mitoses were counted twice in each slide stained with H-E and PAS-H, and immunostained for GH and TSH. Thus, for a given rat, the mitotic counts were repeated eight times. Counts including the central and lateral zones of the anterior lobe are expressed as mitotic counts/mm<sup>2</sup>. Note that, even when the present study reports the body and pituitary weight from seven to ten animals per group, the mitotic counts and histological analysis comprise data from three animals per group, all of which were treated with colchicine. Mitoses in animals not treated with colchicine were scarce and their identification was difficult. Immunostaining was performed in all groups except for the rats treated with Tx+3  $\mu$ g  $T_4$  with or without TRH. Results are expressed as the mean  $\pm$  s.e.m. The differences between means were compared with one-way ANOVA followed by Student-Keuls multiple comparison test. A value of  $P<0.05$  was considered statistically significant.

### Results

#### Anterior pituitary weight

Whereas there was no discernible effect of TRH on anterior pituitary weight,  $T_4$  exerted a differential and dose-dependent effect. As summarized in Table 1, after 5 months of thyroidectomy the anterior pituitary weight in TxC animals was 1.84-fold larger than in the EC group. This increase was enhanced (1.17-fold that of the TxC group) at the low dose of  $T_4$ , whereas a significant ( $P<0.01$ ) suppressive effect was evident at the higher doses of  $T_4$  (3 and 10  $\mu$ g).

#### Mitoses

As shown in Table 2, neither TRH nor the low dose of  $T_4$  had any effect on the mitotic counts of the gland when given alone. However, higher doses of  $T_4$  significantly increased the number of mitoses in a dose-dependent manner. Furthermore, when TRH and  $T_4$  were given

**Table 1** Body and anterior pituitary weight in chronic hypothyroid rats. Effect of different doses of T<sub>4</sub> with or without TRH. Values are means ± S.E.M. for five to seven rats per group

Group	Body weight (g)	Anterior pituitary weight (mg/100 g b.w.)
EC	406.2 ± 13	1.9 ± 0.18 <sup>a</sup>
TxC	243.0 ± 12 <sup>a</sup>	3.5 ± 0.27 <sup>bc</sup>
Tx+TRH	227.8 ± 9 <sup>a</sup>	3.7 ± 0.28 <sup>bc</sup>
Tx+0.5 µg T <sub>4</sub>	225.5 ± 17 <sup>a</sup>	4.1 ± 0.26 <sup>c</sup>
Tx+0.5 µg T <sub>4</sub> +TRH	272.8 ± 27 <sup>a</sup>	4.2 ± 0.29 <sup>c</sup>
Tx+3.0 µg T <sub>4</sub>	259.1 ± 11 <sup>a</sup>	2.9 ± 0.03 <sup>b</sup>
Tx+3.0 µg T <sub>4</sub> +TRH	222.0 ± 2 <sup>a</sup>	3.3 ± 0.20 <sup>bc</sup>
Tx+10 µg T <sub>4</sub>	256.0 ± 9 <sup>a</sup>	2.7 ± 0.07 <sup>b</sup>
Tx+10 µg T <sub>4</sub> +TRH	270.0 ± 8 <sup>a</sup>	2.6 ± 0.18 <sup>b</sup>

Means with different letters within the same column are significantly different.

together there was a synergistic effect, and the proliferative response reached statistical significance at the highest doses of T<sub>4</sub> ( $P < 0.001$ ). It is noteworthy that when the T<sub>4</sub> dose was greater than 0.5 µg, there was a dichotomy between pituitary weight (Table 1) and the mitogenic effect of the hormone.

*Cell types in mitosis*

Immunostaining allowed a precise identification of thyrotrophs and somatotrophs either in mitosis or during the interface (Fig. 1A). Although there were no differences between mitotic counts in the EC, TxC and Tx+TRH groups, the relative percent of cell types in mitoses was changed in all groups (Table 2). Thus, while in the EC rats 60% were somatotrophs and 12.5% thyrotrophs, in all Tx

and Tx+TRH rats somatotrophs were totally devoid of mitosis, whereas thyrotroph mitotic figures increased to 28.5% and 33.5% respectively. T<sub>4</sub> treatments were invariably associated with the presence of mitosis in somatotrophs and thyrotrophs. Furthermore, this effect of T<sub>4</sub> was dose-dependent. Low doses of T<sub>4</sub> with or without TRH were associated with the appearance of somatotrophs in mitosis (8.33% and 38.4% respectively) as well as with a significant increase in the number of mitotic figures in thyrotrophs (53.3% and 80% respectively). At the highest dose, T<sub>4</sub> had the opposite effects on somatotrophs and thyrotrophs, depending on the simultaneous administration of TRH. Thus, when administered alone the number of mitoses in somatotrophs remained unchanged whereas mitoses were decreased in thyrotrophs. On the contrary, when TRH was also administered, somatotroph mitosis increased to 50% while, in thyrotrophs mitosis was further diminished (5.5%).

*Histology*

Thyrotrophs and somatotrophs responded to protracted thyroid hormone deficiency in an opposite manner. Thyrotrophs became degranulated, vacuolated and underwent hypertrophy and transformed to thyroidectomy cells, whereas somatotrophs decreased in number and lost their cytoplasmic granules (Fig. 1A and B). On the contrary, thyroid hormone replacement reversed these changes to a euthyroid-like state (Fig. 1C). Thus, at the low dose of T<sub>4</sub>, the number of somatotrophs and thyrotrophs increased and normal somatotrophs and thyrotrophs (immunostained) were easily identified. In addition, typical thyroidectomy cells showed evidence of regranulation. This effect was associated with the presence of PAS-positive cytoplasmic droplets (Pearse granules, lysosomes) in the thyrotrophs

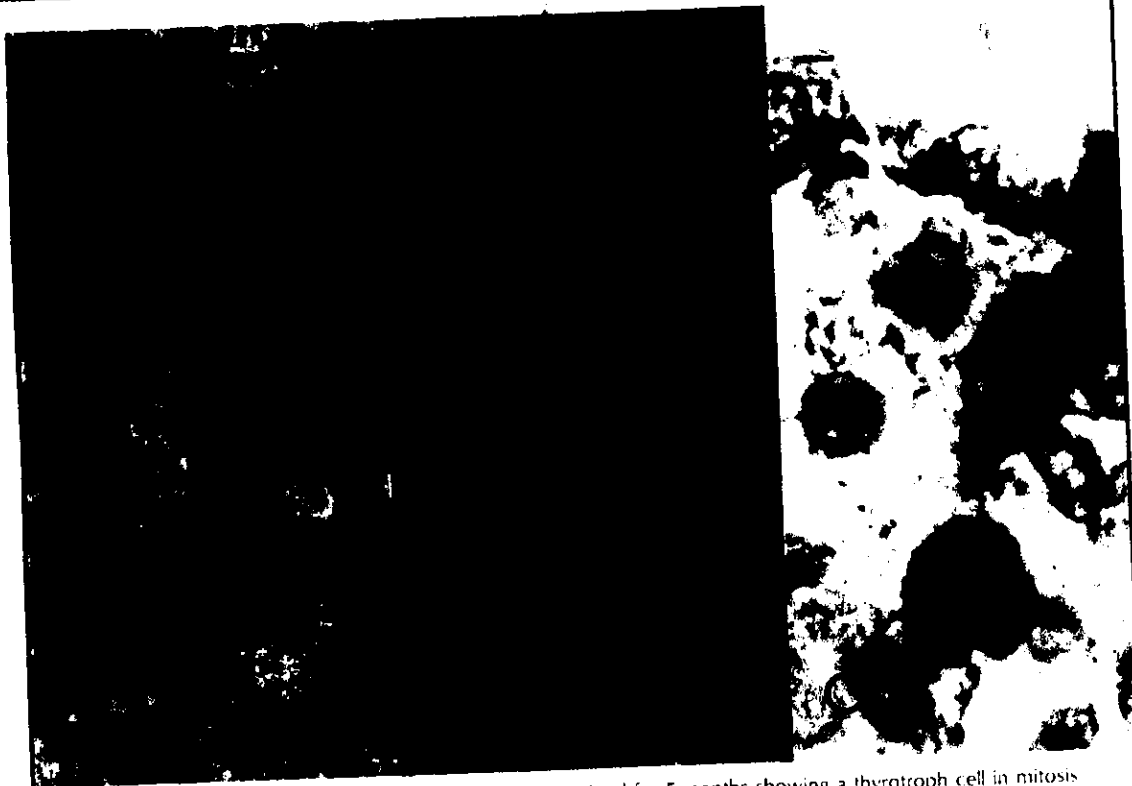
**Table 2** Number of mitoses and relative percentage of somatotrophs and thyrotrophs in mitosis in the anterior pituitary gland of chronic hypothyroid rats: effect of different doses of T<sub>4</sub> with or without TRH. Mitotic counts are means ± S.E.M. for three rats per group

Group	Mitotic counts/mm <sup>2</sup>	Mitotic cell types and percentage	
		Somatotrophs	Thyrotrophs
EC	1.3 ± 0.26 <sup>a</sup>	(2/3)=60	(1/8)=12.5
TxC	1.9 ± 0.36 <sup>a</sup>	(0/7)=0	(2/7)=28.5
Tx+TRH	1.7 ± 0.80 <sup>a</sup>	(0/4)=0	(2/6)=33.3
Tx+0.5 µg T <sub>4</sub>	2.9 ± 0.45 <sup>ab</sup>	(5/13)=38.4	(12/15)=80
Tx+0.5 µg T <sub>4</sub> +TRH	5.5 ± 0.65 <sup>bc</sup>	(2/18)=11.1	(12/22)=54.5
Tx+3.0 µg T <sub>4</sub>	6.2 ± 0.96 <sup>bc</sup>	NA	NA
Tx+3.0 µg T <sub>4</sub> +TRH	8.2 ± 1.11 <sup>c</sup>	NA	NA
Tx+10 µg T <sub>4</sub>	8.7 ± 1.55 <sup>c</sup>	(7/18)=38.8	(5/20)=25
Tx+10 µg T <sub>4</sub> +TRH	12.7 ± 1.81 <sup>d</sup>	(15/30)=50	(2/36)=5.5

Means with different letters are significantly different.

The number and relative percentages of cellular types in mitosis were determined from immunostained slides by dividing the number of mitotic cell types by the total number of cells in mitosis within the same area.

NA=not analyzed.



**Figure 1** (A) Anterior pituitary section from rats thyroidectomized for 5 months showing a thyrotroph cell in mitosis (arrow). Thyrotrophs and vacuolated thyrotrophs are also observed with (scarce) weakly immunostained granules as compared with the EC group. Immunostained for rTSH. Magnification  $\times 400$ . Bar = 10  $\mu\text{m}$ . (B) Similar to (A) but immunostained for rGH. Note the weak stain of granules within the somatotroph cells and the immunonegative huge vacuoles (large asterisk) within the thyrotroph cells. Magnification  $\times 400$ . Bar = 10  $\mu\text{m}$ . (C) Pituitary section of a rat thyroidectomized for 5 months after 10 days treatment with 10  $\mu\text{g}$   $T_4$ . Thyrotrophs are stained brown (less regranulation) whilst somatotrophs are stained dark brown/black (more regranulation). Double immunostained for rTSH and rGH. Magnification  $\times 1000$ . Bar = 5  $\mu\text{m}$ .

from TxC and all  $T_4$ -treated groups with or without TRH. Furthermore, these effects of thyroid hormone replacement were extended to the somatotrophs. Thus, there was an increase in the number of immunoreactive somatotrophs which correlated with the clear-cut reappearance of their distinct brownish-red coloration (Heindeinhein stain) or dark brown/black (rGH stain; Fig. 1C) in the groups treated with a high dose of  $T_4$ . As for histology, immunohistochemical study, pituitary weight, and mitotic counts, TRH alone showed no effects on the pituitary glands from rats with protracted hypothyroidism.

## Discussion

The present results show that in the rat prolonged (5 month) hypothyroidism elicits histological and immunohistochemical changes that are in accordance with previous studies (Costoff 1973, Baker 1974, Surks & DeFesi 1977, DeFesi *et al.* 1979, Astier *et al.* 1980, Horvath *et al.* 1990), and support the notion that in

protracted hypothyroidism the rate of pituitary cell turnover is slow and reaches a steady state (Surks & DeFesi 1977, DeFesi *et al.* 1979). Furthermore, results from the present study provide additional evidence of the key role that thyroid hormones seem to play in regulating pituitary cell proliferation (DeFesi & Surks 1981). First, thyroid hormone replacement elicits a dose-dependent and differential proliferative response on pituitary thyrotrophs and somatotrophs. Secondly, in long-standing hypothyroidism, TRH is devoid of mitogenic effects when administered alone. Finally, the pituitary proliferative response to TRH is enhanced by its co-administration with  $T_4$ , thus suggesting a permissive and/or synergistic effect of thyroid hormone replacement on the previously documented mitogenic effects of TRH in short-term hypothyroid rats (Kunert-Radek & Pawlikowski 1975).

The present results suggest that the co-administration of a low dose of  $T_4$  plus TRH triggers a mild proliferative response on both thyrotrophs and somatotrophs, a finding that is consistent with earlier studies in hypothyroid rats in which high doses of  $T_3$  transiently increased thymidine

incorporation into both cell types (Astier *et al.* 1980). These findings and our results showing that when administered alone TRH is without mitogenic effects strongly suggest that in protracted hypothyroidism thyroid hormones modulate pituitary proliferative responsiveness to TRH. In this regard, our results differ from previous reports in which TRH has clear-cut pituitary mitogenic effects. However, this contradiction is only apparent because these studies were conducted either in short-term (11 days) hypothyroid rats, or in *in vitro* conditions using fetal serum (Kunert-Radek & Pawlikowski 1975, Pawlikowski *et al.* 1975).

In summary, the results of this study agree with the well-known regulatory and/or permissive role played by thyroid hormones on the replication and biosynthetic activity of pituitary thyrotrophs and somatotrophs (DeFesi *et al.* 1979, Astier *et al.* 1980, Samuels *et al.* 1988, Davis 1991, McNabb 1992), and suggest that in protracted primary hypothyroidism: (1) there is a low rate of pituitary cell turnover that resembles that of euthyroid rats, (2)  $T_4$  replacement exerts a prominent pituitary mitogenic effect which is dose-dependent and (3) TRH has a mitogenic effect on somatotrophs and thyrotrophs when co-administered with low doses of  $T_4$ , and only on somatotrophs when co-administered with higher doses of  $T_4$ .

### Acknowledgements

We are indebted to Dr Kalman Kovacs for his continuous support. The authors also wish to thank Dr Zi Cheng, Department of Pathology, St Michael's Hospital, Toronto, Ontario, Canada for participating in the immunohistochemical studies, Dr Aurea Orozco and Mr Hernan Aguirre for translating the manuscript and Mrs MG Espino-López and Mr M A Zamarripa-Torres for their skilful technical assistance. The authors are grateful to the NIH for their generous donation of TSH and GH antibodies used in the immunohistochemical studies. This work was supported by UAA PIBB-90-2 and CONACYT M9201/DO806 grants.

### References

Astier HS, DeFesi CR & Surks MI 1980 Kinetics of deoxyribonucleic acid synthesis and replication on thyrotrophs and somatotrophs

- during development of hypothyroidism and L-triiodothyronine treatment of hypothyroid rats. *Endocrinology* 106 1537-1548.
- Baker LB 1974 Functional cytology of the hypophysial pars distalis and pars intermedia. In *Handbook of Physiology*, section 7, *Endocrinology*, vol IV, *The Pituitary Gland and its Neuroendocrine Control*, part 1, pp 45-80. Washington DC: American Physiological Society.
- Costoff A 1973 *Ultrastructure of the Rat Adenohypophysis. Correlation with Function*, pp 13-25 and 113-129. New York: Academic Press.
- Davis PJ 1991 Cellular actions of thyroid hormones. In *Werner and Ingbar's The Thyroid*, pp 190-203. Eds LE Braverman & RD Utiger. Philadelphia: JB Lippincott Company.
- DeFesi CH & Surks MI 1981 3,5,3'-Triiodothyronine effects on the growth rate and cell cycle of cultured GC cells. *Endocrinology* 108 259-267.
- DeFesi CR, Astier HS & Surks MI 1979 Kinetics of thyrotrophs and somatotrophs during development of hypothyroidism and L-triiodothyronine treatment of hypothyroid rats. *Endocrinology* 104 1172-1180.
- Horvath E, Lloyd RV & Kovacs K 1990 Propylthiouracyl-induced hypothyroidism results in reversible transdifferentiation of somatotrophs in thyroidectomy cells. *Laboratory Investigation* 63 511-519.
- Kunert-Radek J & Pawlikowski M 1975 The effect of thyrotropin releasing hormone on cell proliferation in anterior pituitary gland of thyroidectomized rats. *Neuroendocrinology* 17 92-95.
- McNabb FMA 1992 The hypothalamic-pituitary-thyroid axis. Regulation of TSH secretion. In *Thyroid Hormones*, pp 51-56. Prentice Hall Endocrinology Series. Ed ME Hadley. Englewood Cliffs, NJ: Prentice Hall.
- Pawlikowski M, Stepien H & Kunert-Radek J 1975 Thyroxine inhibition of the proliferative response of the anterior pituitary to thyrotropin releasing hormone *in vitro*. *Neuroendocrinology* 18 277-280.
- Rondeel JMM, DeGreef WJ, Klootwijk W & Visser TJ 1992 Effects of hypothyroidism on hypothalamic release of thyrotropin-releasing hormone in rats. *Endocrinology* 130 651-656.
- Sakai T, Inoue K, Hasegawa Y & Kurosuni K 1988 Effect of passive immunization to gonadotropin-releasing hormone (GnRH) using GnRH antiserum on mitotic activity of gonadotrophs in castrated male rats. *Endocrinology* 122 2803-2808.
- Samuels HH, Aranda A & Casanova J 1988 Identification of the *cis*-acting elements and *trans*-acting factors that mediate cell-specific and thyroid hormone stimulation of growth hormone gene expression. *Recent Progress in Hormone Research* 44 53-59.
- Stefaneanu L, Kovacs K, Horvath E, Losinski EN, Mayerhofer A, Wagner TE & Bartke A 1990 An immunocytochemical and ultrastructural study of adenohypophyses of mice transgenic for human growth hormone. *Endocrinology* 126 608-615.
- Surks MI & DeFesi CR 1977 Determination of the cell number of each cell type in the anterior pituitary of euthyroid and hypothyroid rats. *Endocrinology* 101 946-958.

Received 22 May 1996

Revised manuscript received 19 November 1996

Accepted 28 January 1997

# Journal of Endocrinology



Editor-in-Chief: Professor A S McNeilly  
Associate Editor: Dr J A Franklyn

April 10, 1997

Dr. Andrés Quintanar-Stephano  
Departamento de Fisiología y Farmacología  
Centro Básico  
Universidad Autónoma de Aguascalientes  
Av. Universidad 940. Aguascalientes  
Ags. CP 20100 Mexico

tel: 011-49-12-33-45 x 336  
fax: 011-49-14-32-22  
email: aquinta@correo.uaa.mx

Dear Dr. Quintanar-Stephano:

Manuscript: **JOE02418 NA0096**

Title: mitotic counts in rat adenohipophysial thyrotrophs and somatotrophs. Effects of short term thyroidectomy, thyroxine and thyrotropin releasing-hormone.

Authors: A. Quintanar-Stephano, C. Valverde-R and K. Kovacs

Thank you for submitting the above paper to the *Journal of Endocrinology*. It has now been read by a member of the editorial board and appropriate referees and I am sorry to inform you that it is at present considered unsuitable for publication for the reasons set out in the enclosed editorial report(s).

However, if you are able to incorporate the results from further studies, and deal satisfactorily with the comments raised by the referees and Scientific Editor, we would be happy to consider a new version of your paper. Please quote rejected paper number with any future submission. We hope that the enclosed reports will assist you in your research.

Regards,

David J. Hill, D.Phil.  
North American Receiving Office  
Journal of Endocrinology

DJH:cm

Enclosure

**North American Receiving Office**  
Dr D J Hill  
Receiving Editor  
Lawson Research Institute  
St Joseph's Health Centre  
268 Grosvenor Street  
London, Ontario N6A 4V2  
Canada

Tel: 519 646 6100 x 4716  
Fax: 519 646 6110  
E-mail address:  
davidh1@  
stj.stjosephs.london.on.ca

**Editorial Office**  
17/18 The Courtyard  
Woodlands  
Almondsbury  
Bristol BS12 4NQ  
United Kingdom

Tel: +44 1454 616046  
Fax: +44 1454 616071  
E-mail address:  
soc-endoc@bristol.ac.uk

**The Journal of Endocrinology Ltd**  
Registered in  
England No 349408  
Registered Office  
as above



REFEREE'S REPORT (II)

This is an interesting study on histological evidence for mitosis in pituitary thyrotrophs and somatotrophs in response to Thyroxine and TRH in hypothyroidism. The results are interesting, and partially resolve a previous controversy about the nature of the proliferative response of the pituitary in this situation. The main problem in such a difficult study is the very small number of mitotic cells actually observed. The changes in proportions of cells were relatively modest, and it is not clear where the statistical significance and biological significance lie in the main data of the paper, shown in Table 1. How reproducible are these changes, and exactly which ones are significant? The transient response to TRH in the thyroidectomized animals, with apparent synergy with Thyroxine, is very interesting, but why does the mitotic count so rapidly fall to such low levels between 12 hours and 24 hours after TRH treatment? Indeed on this point the text (page 6) states that the cell proliferation was not increased, whereas in the table it definitely appears to diminish - is this significant? In general I am concerned about possible over interpretation of small differences in the main results section of this paper.

**Minor points:**

1. Results section (page 6 - line 6 from foot) - the word "duplicated" should read "doubled".
2. To a non-histologist the photomicrographs are not particularly clear. Does Figure 1 indeed show a mitotic figure?

REFEREE'S REPORT (1)

This paper sets out to examine the effects of thyroxine and TRH treatment on anterior pituitary thyrotroph and somatotroph histology and mitoses in thyroidectomised rats. This follows on from previous work which failed to demonstrate an increase in mitotic counts in rats with long-term hypothyroidism. The authors set out to test the hypothesis that in early hypothyroidism, thyroid hormones affect the sensitivity of pituitary cells to TRH.

Seven groups of 5 animals which underwent differing treatment regimens were studied.

1. Thyroidectomy had the predictable effects on cell thyrotroph and somatotroph mitoses. Thyroxine treatment was given at a single dose of 10ug at 12 h pre-sacrifice. No clear effect was seen on the thyrotrophs, although a partial recovery in somatotroph mitoses was seen. These data suggest that the effects of thyroxine should be studied at different doses and time-points before sacrifice.
2. No effect of TRH was seen on thyrotroph or somatotroph mitoses in thyroidectomised rats. This is not surprising, as these cells would be expected to be exposed to high endogenous concentrations of hypothalamic TRH.
3. Combined thyroxine and TRH treatment resulted in a clear increase in anterior pituitary cell mitoses, but no effect on thyrotrophs. The effect on somatotrophs is mid-way between that seen in the thyroxine treated and the TRH treated groups of animals. There is no evidence that thyroxine treatment sensitises the thyrotrophs or somatotrophs to TRH.
4. The apparent increase in total anterior pituitary cell mitoses in the TRH treated and the TRH and thyroxine treated groups of animals is interesting and should be examined further.
5. No data have been given for serum TSH and thyroxine for each group of animals.
6. No statistical analysis has been detailed.

The manuscript by Quintanar Stephano and colleagues examines the mitotic count in rat thyrotrophs and somatotrophs following manipulation of the hypothalamic pituitary thyroid axis. The concepts addressed are interesting but the data provided is limited and insufficient to draw the conclusions which the authors have drawn. This paper is not suitable for publication in its present form in the Journal of Endocrinology