



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

Reorganización y cambios morfológicos de tirotropos en
rebanadas de hipófisis de ratas macho Wistar con hipotiroidismo
primario

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

DOLORES ALEJANDRA MARURI SÁNCHEZ



**DIRECTOR DE TESIS:
DRA. TATIANA FIOREDELISIO COLL**

Ciudad Universitaria, CDMX, 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

1. Datos del alumno
Maruri
Sánchez
Dolores Alejandra
5527707987
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
311190838
2. Datos del tutor
Dra.
Tatiana
Fiordeliso
Coll
3. Sinodal 1
M. en C.
Rosa Nuria
Galindo
Solano
4. Sinodal 2
M. en C.
Diana Cecilia
Del Río
Valdés
5. Sinodal 3
Dra.
María de Lourdes
Segura
Valdez
6. Sinodal 4
M. en C.
Eva
Mendoza
Cruz
7. Datos del trabajo escrito
Reorganización y cambios morfológicos de tirotropos en rebanadas de hipófisis de ratas macho Wistar con hipotiroidismo primario
50 p
2020

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México por la formación académica que recibí durante la licenciatura.

A los proyectos CONACyT 2013-2015 000166430 y CONACyT-ANR 273513 por el financiamiento necesario para el desarrollo del presente trabajo.

Al LANSBIODYT-UNICUA-UNAM (CONACYT) por el apoyo técnico en la adquisición de imágenes confocales, así como al técnico Edgar Jiménez-Díaz.

A mis sinodales: la Dra. Tatiana Fiordeliso Coll, M. en C. Nuria Galindo Solano, Dra. María de Lourdes Segura Valdez, M. en C. Diana Del Río Valdés y a M. en C. Eva Mendoza Cruz, gracias por su valioso tiempo en la revisión y comentarios a este trabajo.

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

En primer lugar, quiero agradecer a mis padres, esto es por y para ustedes. Gracias por siempre alentarme y apoyarme en absolutamente todo. Jamás hubiera logrado esto si no fuera por su amor incondicional. A mi hermano, por apoyarme y ayudarme en todo lo que necesité.

A Arturo, por llegar a mi vida de la forma menos pensada y por convertirte en alguien muy especial para mí. Gracias por motivarme, por escucharme, por alegrarme cada día y por siempre buscar la manera de apoyarme hasta en la cosa más mínima. Te amo mucho.

A mis amigos, especialmente al círculo de la amistad, por el apoyo y por todo lo compartido; con cada uno he logrado conectar de una manera muy bonita y en verdad, me siento muy afortunada de tenerlos en mi vida. A Fer Tovar, gracias amiga por todo lo que hemos vivido juntas, siempre estás para mí y lo valoro muchísimo, que nuestra amistad sea eterna.

A los integrantes y ex integrantes del laboratorio de Neuroendocrinología Comparada, por todo lo que me han brindado y por todas las veces que me han ayudado a seguir creciendo personal y profesionalmente, en especial a Ita, gracias señora por alentarme, por compartir tus conocimientos conmigo y por hacer más ameno todo el trabajo.

A la Dra. Tatiana Fiordelisis Coll, por la dirección y apoyo a este trabajo pero sobre todo, por toda la confianza, paciencia y tiempo. Eres un gran ejemplo para mí.

Contenido

Agradecimientos	4
Agradecimientos a título personal	5
Resumen	3
Introducción	4
Hipotálamo-Hipófisis	4
Hipófisis	4
2.1 Anatomía y localización	5
2.2 Sistema Vascular	6
2.3 Tipos Celulares	8
2.4 Regulación	9
3. EJE Hipotálamo – Hipófisis –Tiroides	11
4. Tiroides	12
4.1 Hormonas metabólicas tiroideas	13
4.1.2 Síntesis de las hormonas tiroideas	14
4.1.3 Mecanismos de acción de las hormonas tiroideas	15
5. Hipotiroidismo primario	16
6. Tirotropos	16
6.1 TSH	17
6.2 TRH	18
6.3 Secreción de TSH	19
7. Regionalización	20
8. Antecedentes	21
Hipótesis	23
Objetivo	23
Materiales y Métodos	24
Animales de estudio	25
Obtención de muestras biológicas	25

Inmunohistoquímicas	26
Adquisición y procesamiento de imágenes	27
Análisis estadístico	27
Resultados	28
Cambios en la glándula hipófisis	29
Distribución poblacional de tirotropos	30
Población celular de tirotropos con hipotiroidismo primario	32
Morfología de tirotropos	33
Cambios en la vasculatura	37
Cambios en otros grupos celulares	39
Discusión	41
Conclusión	45
Referencias	45

RESUMEN

La hipófisis es una glándula que juega un papel central en el mantenimiento de la homeostasis del organismo. Junto con el hipotálamo y los distintos órganos blanco, forma los ejes neuroendocrinos que participan en múltiples procesos fisiológicos como la lactancia, la reproducción y el metabolismo.

El eje hipotálamo hipófisis tiroideas, determina el punto de ajuste de la producción de las hormonas tiroideas (TH). Existen alteraciones en este eje, que resultan en patologías endocrinas como la reducción de los niveles de TH en circulación debido a una falla tiroidea (hipotiroidismo primario) que da lugar a un aumento de la producción de la hormona estimuladora de tirotropina (TRH) y de tirotropina (TSH).

Se ha reportado que en condiciones de hipotiroidismo primario se producen cambios en la conformación de los tirotropos, así como una alteración en toda la glándula. Sin embargo, estas evidencias no han sido tan claras, ya que la mayoría de la información proviene de estudios en condiciones in vitro lo cual implica una pérdida del microambiente tisular, así como de las asociaciones establecidas entre las células endocrinas. En este trabajo se buscó reportar los cambios morfológicos, posible reorganización de los tirotropos, así como describir cambios en la vascularización bajo condiciones de hipotiroidismo primario, por lo que se realizaron inmunohistoquímicas en rebanadas de hipófisis de ratas macho con hipotiroidismo primario.

De acuerdo con los análisis realizados, se encontró que hubo un aumento en el número de tirotropos, además una redistribución y reorganización ya que se encontraron en toda la rebanada y se comenzaron a organizar en grupos grandes de tirotropos. Se encontró también, que bajo condiciones de hipotiroidismo primario, los tirotropos dejan de tener una forma ovoide o angulosa y comienzan a presentar formas irregulares, sin embargo, no se encontraron diferencias en la superficie celular. En cuanto a la vasculatura, se observó un aumento de la cobertura vascular, así como una relación más estrecha con las células tirotropas.

INTRODUCCIÓN

1. HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS

El hipotálamo es una estructura cerebral que funciona como un centro integrador, ejerce una regulación sobre el sistema autónomo, el sistema límbico y sobre el sistema endocrino. Junto con la glándula hipófisis, el hipotálamo forma un sistema que regula diversas funciones corporales básicas, tales como la termorregulación, respuesta al estrés, el crecimiento, la reproducción, entre otros (Brandan et al., 2011; Burbridge et al., 2016; Xie & Dorsky, 2017).

Las conexiones integrales de desarrollo y funcionales que tiene el hipotálamo con la hipófisis, permiten al hipotálamo regular de manera positiva o negativa la producción y secreción de hormonas en las células hipofisiarias, por lo que la señalización neuroendocrina permite la integración de la función de distintos tejidos, lo que lleva a una respuesta coordinada y precisa ante un desafío dado (Costa-e-Sousa & Hollenberg, 2012; Ooi et al., 2004).

2. HIPÓFISIS

La hipófisis, es una glándula pequeña pero bastante compleja, ya que juega un papel central en el mantenimiento de diversas funciones homeostáticas del cuerpo, como el crecimiento, la reproducción y el metabolismo (Yeung et al. 2006). Este órgano controla las glándulas suprarrenales, las gónadas y la glándula tiroides debido a la secreción de hormonas reguladoras específicas mediante la circulación sistémica (Hong et al., 2016).

2.1 Anatomía y localización

Esta glándula tiene dos orígenes embrionarios, surge a través de la asociación íntima del ectodermo neural y el ectodermo del techo oral (Dasen & Rosenfeld, 2001). La hipófisis madura tiene dos divisiones principales: la adenohipófisis y la neurohipófisis. La adenohipófisis o hipófisis anterior se compone por la parte distal o lóbulo anterior que constituye gran parte de la hipófisis, la parte intermedia o lóbulo intermedio y la parte tubular. La neurohipófisis está formada, a su vez, por el lóbulo posterior o lóbulo neural, el tallo neural y la eminencia media (Halász, 2004; Ritchie & Balasubramanian, 2014). El lóbulo posterior está formado por terminales axónicas de neuronas magnocelulares hipotalámicas que están rodeadas por astrocitos. Las neuronas hipotalámicas de los núcleos paraventricular y supraóptico sintetizan vasopresina y oxitocina que son transportadas a las terminales axonales de la hipófisis posterior, donde son secretadas a la circulación general (Stojilkovic et al., 2010).

La hipófisis se encuentra dentro de una fosa del hueso esfenoidal llamada silla turca o fosa hipofisiaria (ver figura 1), cubierta por un pliegue dural llamado diafragma sellar (Perez-Castro et al., 2012; Ritchie & Balasubramanian, 2014). En la parte superior, se encuentra conectada funcional y anatómicamente al hipotálamo por la eminencia media gracias al tallo infundibular, por el cual, los factores hipotalámicos llegan a la hipófisis (Perez-Castro et al., 2012).

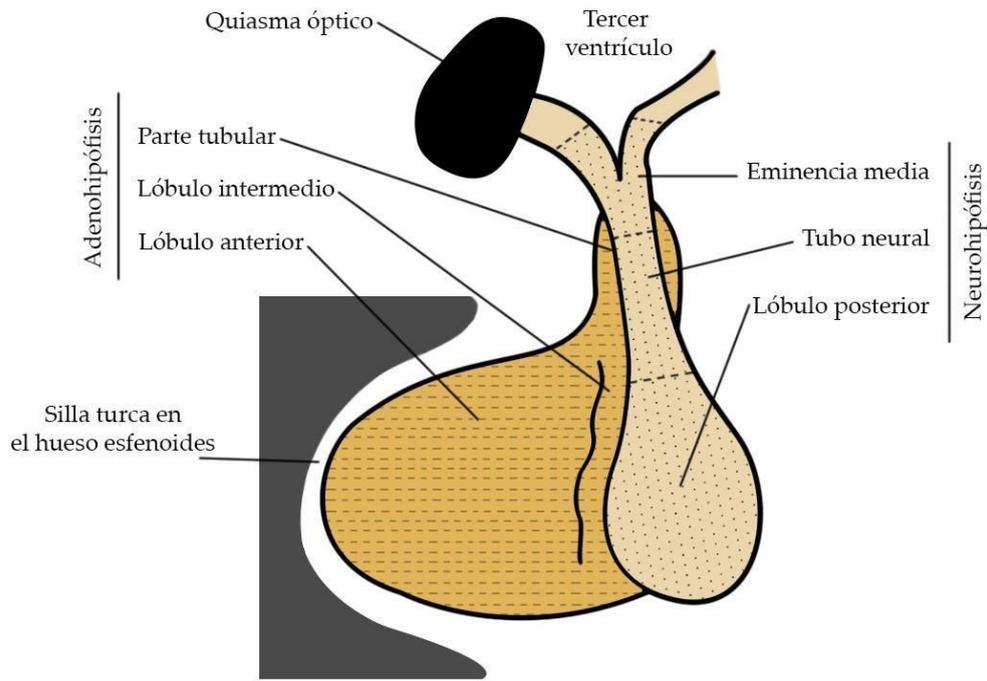


Figura 1. Glándula hipofisiaria, localización y anatomía. Tomada y modificada de Halász, 2004.

2.2 Sistema Vascular

La vascularización de la hipofisiaria es la más desarrollada de todos los tejidos en los mamíferos; está irrigada por dos grupos de arterias procedentes de la arteria carótida interna: la arteria hipofisaria superior (SHA) y la arteria hipofisaria inferior (IHA). La SHA suministra sangre a la eminencia media y a la porción proximal del tallo hipofisario. En este lugar, estas arterias se ramifican para formar un plexo capilar primario. Los capilares de este plexo convergen y forman los vasos porta largos que atraviesan el tallo hipofisario, los cuales se dividen nuevamente en un plexo secundario de capilares sinusoidales en el lóbulo anterior de la hipofisiaria (ver figura 2), donde se encuentran en estrecha relación con las células secretoras de la adenohipofisiaria (Amar & Weiss, 2003; Halász, 2004).

El lóbulo posterior, recibe suministro de sangre por parte de la IHA. Forma una anastomosis de las arterias y capilares de este lóbulo junto con los productos elaborados por las terminales de axones (Amar & Weiss, 2003; Halász, 2004).

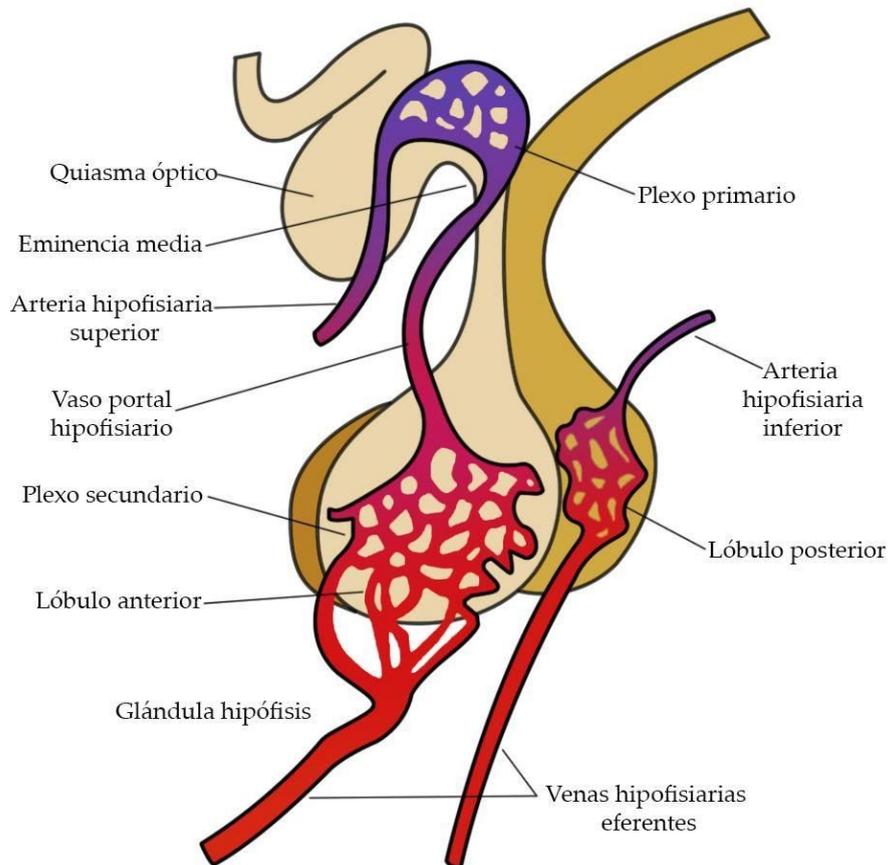


Figura 2. Anatomía vascular de la glándula hipofisis. Esquematación de elementos vasculares que constituyen el sistema porta hipofisiario. Tomada y modificada de Amar & Weiss, 2003.

Este sistema vascular llamado portal hipofisiario resulta ser muy importante ya que es por donde la hipofisis recibe estímulos, así como la salida de los productos hormonales de la hipofisis, proporcionando un enlace para transportar información neuronal desde el sistema nervioso central hasta la hipofisis (Lafont et al., 2010; Nakakura et al., 2006).

En el sistema vascular intervienen un grupo de células murales contráctiles llamados pericitos, que participan en el control y regulación del flujo sanguíneo.

Los pericitos pueden inducir la constricción de los vasos y modificar el diámetro vascular, además de fortalecerlos (Bruce et al., 2015; Miyata, 2017; Schaeffer et al., 2011).

2.3 Tipos Celulares

La adenohipófisis representa aproximadamente el 75-80% de toda la glándula, posee una gran vascularización y contiene al menos cinco tipos de células encargadas de la secreción hormonal: lactotrofos, corticotrofos, gonadotrofos, somatotrofos y tirotrofos. Cada tipo celular se caracteriza por secretar una o más hormonas que regulan diversos procesos biológicos en respuesta a señales del hipotálamo y de los órganos periféricos (Dasen & Rosenfeld, 2001; Elster, 1993; Halász, 2004).

Los lactotrofos representan aproximadamente el 15% de la población celular, secretan prolactina (PRL) y su principal estimulador es la hormona liberadora de tirotrópina (TRH); los corticotrofos corresponden al 15-20% de la población, producen hormona adrenocorticotrópica (ACTH); los gonadotrofos constituyen el 10%, producen la hormona luteinizante (LH) y la hormona folículo estimulante (FSH), son regulados principalmente por la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH); los somatotrofos son el grupo celular más abundante constituyendo el 40-50% del total de la población celular, producen la hormona de crecimiento (GH) y es regulada predominantemente por la hormona liberadora de GH (GHRH); los tirotrofos son el grupo celular más pequeño con un 5% del total de la población, producen hormona estimuladora de tiroides o tirotrópina (TSH) y son estimulados, al igual que los lactotrofos, por la TRH (Dasen & Rosenfeld, 2001; Perez-Castro et al., 2012; Stojilkovic et al., 2010).

Además de estas células se encuentran las células foliculoestrelladas (FS), las cuales, son células no endocrinas que participan en las comunicaciones intracelulares de las células secretoras (Ooi et al., 2004; Perez-Castro et al., 2012).

2.4 Regulación

La secreción de las diferentes hormonas se encuentra regulada por distintos mecanismos que permiten un control de respuesta preciso. De manera particular, la hipófisis recibe entradas reguladoras tanto centrales como periféricas, sin embargo, el sistema de control más común está determinado por mecanismos de retroalimentación, los cuales pueden ser positivos o negativos (Godoy et al., 2004; Tresguerres et al., 2005).

En general, las hormonas secretadas por el hipotálamo desencadenan la liberación de hormonas en la hipófisis anterior, las cuales actúan sobre su órgano blanco y ejercen efectos biológicos, o bien, inducen secreción hormonal (ver figura 3) (Hong et al., 2016; Ooi et al., 2004). Estas hormonas producidas por el órgano blanco pueden regular, a su vez, la secreción hipofisaria o hipotalámica, al igual que las hormonas hipofisarias en el hipotálamo (Godoy et al., 2004).

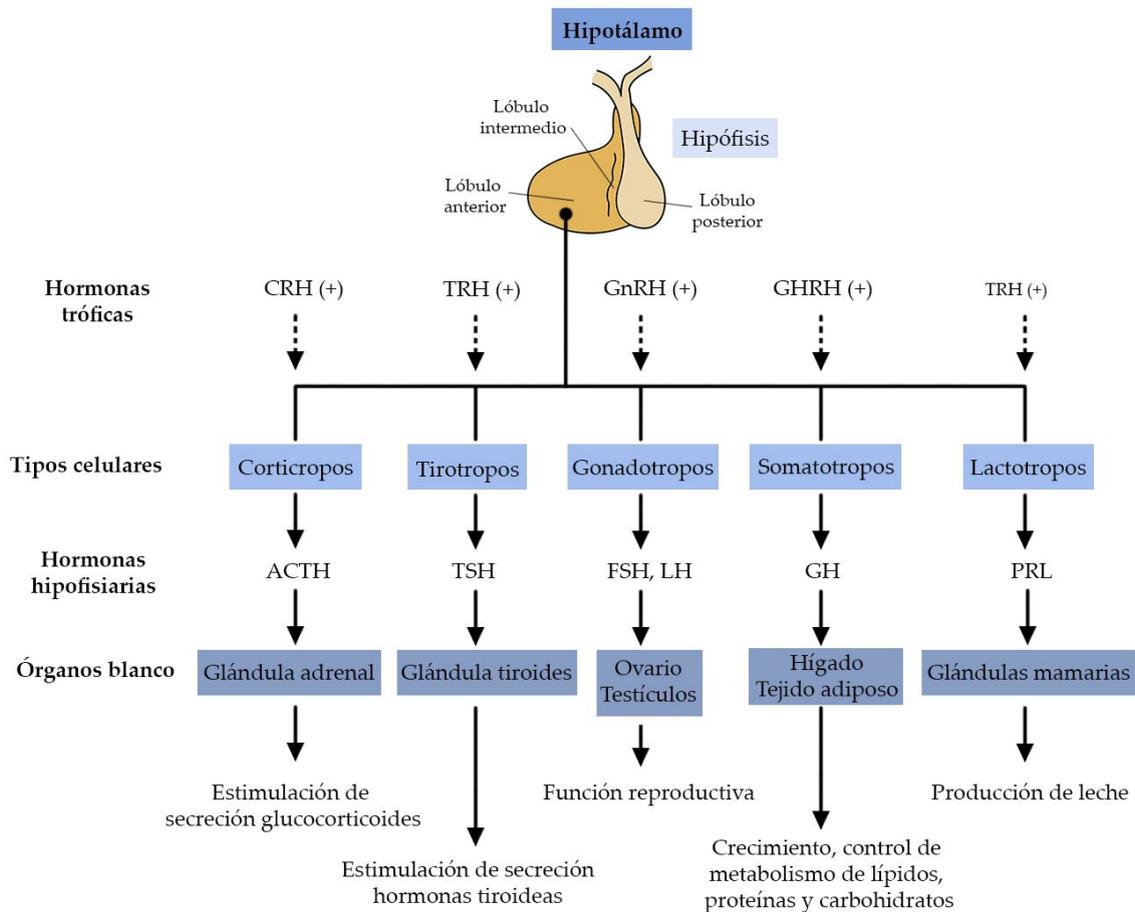


Figura 3. Hormonas tróficas, tipos celulares de la hipófisis anterior y sus secreciones hormonales. Las hormonas tróficas del hipotálamo actúan sobre tipos celulares específicos en la hipófisis, estimulan la liberación de hormonas hipofisarias que actúan sobre los órganos blanco y regulan diversos procesos fisiológicos. (+) Indica estimulación. CRH, hormona liberadora de corticotropina; TRH, hormona liberadora de tirotropina; GnRH, hormona liberadora de gonadotropina; GHRH, hormona liberadora de hormona del crecimiento. Tomada y modificada de Ooi et al., 2004.

La regulación también está determinada por la interacción o comunicación célula-célula, es decir vías paracrinas y autocrinas, en donde las propias hormonas hipofisarias, u hormonas liberadoras hipotalámicas pueden detener o estimular su propia secreción (Taylor et al., 2011).

Todas estas señales no solo controlan la secreción de las hormonas tróficas, sino también intervienen en la plasticidad de la glándula, regulando el crecimiento celular y la producción de las distintas hormonas (Perez-Castro et al., 2012).

3. EJE HIPOTÁLAMO – HIPÓFISIS – TIROIDES

El sistema neuroendocrino regula diversas funciones durante las diferentes etapas de desarrollo y vida adulta, en respuesta a los cambios o desafíos que se presenten. Un ejemplo clásico de ello lo podemos observar en el eje hipotálamo-hipófisis-tiroides (HHT), el cual determina el control de la producción y secreción de hormonas tiroideas (TH) (Costa-e-Sousa & Hollenberg, 2012; Ortega-Carvalho et al., 2016).

En el hipotálamo la TRH es secretada y en la hipófisis anterior estimula la síntesis y secreción de TSH, que actúa en la tiroides para estimular la biosíntesis y secreción de las hormonas tiroideas triyodotironina (T3) y tiroxina (T4). Las hormonas T3 y T4 controlan la secreción de TRH y TSH por medio de una retroalimentación negativa (ver figura 4), ya que inhiben la síntesis de estas hormonas a nivel transcripcional (Chiamolera & Wondisford, 2009; Nikrodhanond et al., 2006).

Más adelante se describe con detalle estas interacciones que permiten la óptima regulación del eje, así como las alteraciones en la función fisiológica, específicamente hipotiroidismo primario.

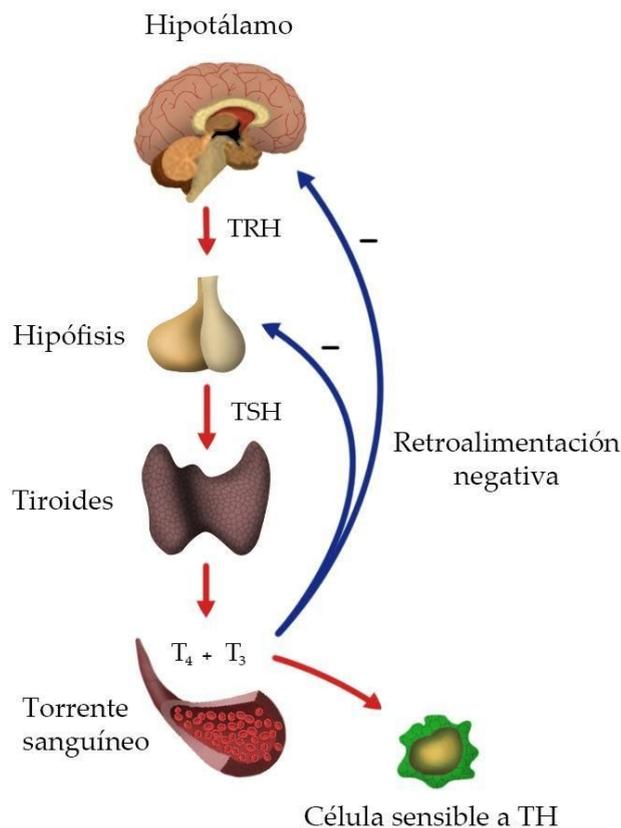


Figura 4. Eje Hipotálamo-Hipófisis-Tiroides. La TRH secretada por el hipotálamo estimula a los tirotrópos en la hipófisis, lo cual promueve la secreción de TSH que actúa en la tiroides al producir las hormonas tiroideas T₄ y T₃, que son liberadas al torrente sanguíneo y actúan en los órganos blanco. Las hormonas tiroideas ejercen acciones de retroalimentación negativa en la hipófisis y en el hipotálamo. TRH, hormona liberadora de tirotrópica; TSH, hormona estimulante de tiroides; TH, hormonas tiroideas. Tomada y modificada de Freitas, 2012.

4. TIROIDES

La glándula tiroides es el órgano más grande especializado en la producción de hormonas endocrinas, secreta hormonas tiroideas (TH). Se compone de dos lóbulos laterales que están unidos por una porción central llamada istmo y se localiza en la región anterior del cuello, por delante de la tráquea y debajo de la laringe (Cooper & Ladenson, 2012; Toribio & Duckett, 2004).

Esta glándula posee una vasta vascularización y cuenta con relaciones anatómicas importantes como la que tiene con las glándulas paratiroides

superior e inferior, que se encuentran muy cercanas a los lóbulos tiroideos (Hernández, 2015; Hillary & Balasubramanian, 2017).

La unidad estructural de la tiroides es el folículo, tiene una forma esférica y su tamaño es variable. Cada uno está formado por células epiteliales foliculares llamados tirocitos que rodean la luz del folículo y está relleno de una sustancia denominada coloide (ver figura 5) que contiene grandes cantidades de proteínas como la tiroglobulina (Tg), precursor proteico de las hormonas tiroideas (Brandan et al., 2007; Ortega-Carvalho et al., 2016).

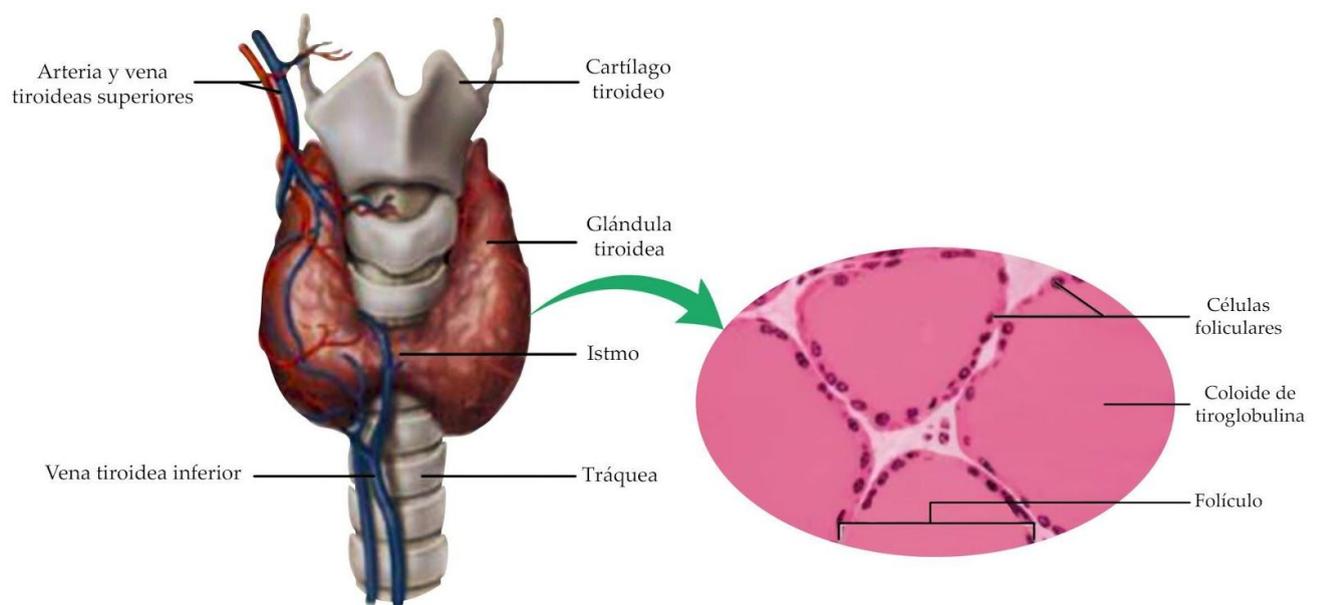


Figura 5. Glándula tiroides, vista anterior. La glándula tiroides se encuentra sobre la tráquea y está en contacto con una gran red de capilares sanguíneos. Se muestra un acercamiento donde se observan los folículos tiroideos, así como las células foliculares llamadas tirocitos. Tomada y modificada de Saladin, 2013.

4.1 Hormonas metabólicas tiroideas

La tiroides sintetiza y secreta principalmente dos hormonas, la tetrayodotironina (tiroxina o T4) y la triyodotironina (T3). La T4 posee cuatro átomos de yodo y es producida de manera predominante, sin embargo, tiene

poco efecto sobre las células blanco. Por otra parte, la T3, con tres átomos de yodo, es producida en menor cantidad pero resulta ser la forma más activa (Hollenberg & Forrest, 2008; Saladin, 2013).

Estas TH juegan un papel importante en el desarrollo fetal y durante toda la vida. Promueven el desarrollo del sistema nervioso central, participan en la regulación de la frecuencia cardiaca, regulan el gasto de energía, la termogénesis, el peso, el metabolismo celular, entre otros (Cooper & Ladenson, 2012; Nikrodhanond et al., 2006).

4.1.2 Síntesis de las hormonas tiroideas

La síntesis y secreción de las TH requiere de una serie de funciones especializadas por parte de las células foliculares. El primer paso consiste en la absorción de yoduro, el cual se encuentra mediado por un transportador de proteína de membrana llamado NIS (del inglés, Na/I symporter); el yoduro es transportado desde la membrana basal del tirocito hasta que sale al coloide (Brandan et al., 2007; Ortiga-Carvalho et al., 2016).

En el coloide la tiroperoxidasa (TPO) junto con el peróxido de hidrógeno que actúa como captador de electrones, oxida al yoduro hasta yodonio. Igualmente, la TPO participa en la yodación de la Tg, al incorporar el yodonio en los residuos tirosilo de la Tg. El resultado de esta reacción son las yodotirosinas monoyodotirosina (MIT) y diyodotirosina (DIT) (Brandan et al., 2007; Rousset et al., 2015).

Las yodotirosinas se acoplan para formar las hormonas tiroideas, es decir, cuando se ensamblan dos DIT forman tetrayodotironina (T4), mientras que cuando una MIT y una DIT se acoplan se forma triyodotironina (T3), un componente sintetizado en menor cantidad, pero muy significativo. Estas hormonas pueden ser almacenadas en el coloide del folículo tiroideo gracias a la unión con la Tg (Carvalho & Dupuy, 2017; Plateroti & Samarut, 2018).

La secreción de estas hormonas depende de la reabsorción de la Tg yodada, su proteólisis y la posterior liberación al torrente sanguíneo, donde son transportadas a sus órganos o células blanco (Carvalho & Dupuy, 2017). Dentro de los órganos blanco, la T4 se puede convertir en T3 gracias a las desyodasas, las cuales regulan los niveles de hormonas tisulares locales en la célula blanco (Ortiga-Carvalho et al., 2016).

4.1.3 Mecanismos de acción de las hormonas tiroideas

Las hormonas tiroideas actúan por medio de dos mecanismos generales: no genómicos y genómicos. Las acciones no genómicas se dan debido a las interacciones de T3 y T4 con diversas enzimas, como con adenilato ciclasa, calcio ATPasa, con transportadores de glucosa y proteínas mitocondriales (Brandan et al., 2007; Cooper & Ladenson, 2012).

La acción genómica está regulada por una variedad de isoformas de receptores de las hormonas tiroideas (TR), los cuales son miembros de la superfamilia de receptores nucleares de factores transcripcionales modulados por ligando. Los TR derivan de dos genes en cromosomas diferentes, el gen TR α y el gen TR β . La expresión de estos receptores varía según el tejido donde se encuentren y está regulado por la etapa de desarrollo (Cheng et al., 2010; Hernández, 2015; Nikrodhanond et al., 2006).

Si bien, algunas isoformas se expresan en la mayoría de tipos celulares, la isoforma TR β 2 se expresa en algunas áreas del hipotálamo, en el cerebro en desarrollo, oído medio y de manera selectiva en la hipófisis anterior, por lo que esta isoforma participa en los efectos de las TH sobre la retroalimentación negativa en el eje hipotálamo - hipófisis - tiroides (Cheng et al., 2010; Nikrodhanond et al., 2006).

5. HIPOTIROIDISMO PRIMARIO

En la glándula tiroides pueden presentarse diferentes alteraciones que modifican la actividad normal de la glándula, una de ellas es el hipotiroidismo.

El hipotiroidismo es un trastorno ocasionado por la inadecuada acción de las TH, es una de las patologías endocrinas con más prevalencia a nivel mundial, la cual afecta principalmente a mujeres (Arias Holguín Msc et al., 2013; Elena Medrano Ortiz-de Zárate et al., 2012).

Este trastorno se clasifica según su causa y puede ser primario, secundario o terciario. El primario es el más común y consiste en un daño funcional de la tiroides, ya sea de origen autoinmune, inflamatorio, farmacológico o por deficiencia de yodo. El secundario, se refiere a una deficiencia de TSH hipofisaria por lo que no hay una adecuada estimulación de TH. Mientras que el terciario, se debe a la deficiencia de TRH hipotalámico (Cooper & Ladenson, 2012; Elena Medrano Ortiz-de Zárate et al., 2012).

Cuando ocurre una deficiencia o pérdida de la producción de TH por parte de la tiroides, surgen mecanismos compensatorios como el aumento progresivo de los niveles de TSH que incrementan la producción de las TH, mayor producción de T3 respecto a T4, o bien, el aumento de la desyodación de T4 a T3 en los tejidos periféricos (Gómez et al., 2010; Pineda et al., 2016).

6. TIROTROPOS

Dentro de los distintos tipos celulares del lóbulo anterior de la hipófisis se encuentran los tirotropos, el grupo celular menos abundante con el 5% de la población total. Estas células secretan la TSH, la hormona hipofisaria que controla el crecimiento y función de la glándula tiroides (Melmed, 2011).

Los tirotropos se encuentran mayormente en las porciones media lateral y anteromedial de la glándula. Son células alargadas de forma triangular o angulosa, aunque también pueden presentarse como células pequeñas y ovoides (ver figura 6). Normalmente se encuentran distribuidas de manera solitaria rodeando los capilares o en grupos pequeños cercanos entre sí (Bargi-Souza et al., 2014; Horvath & Kovacs, 1988; Melmed, 2011).

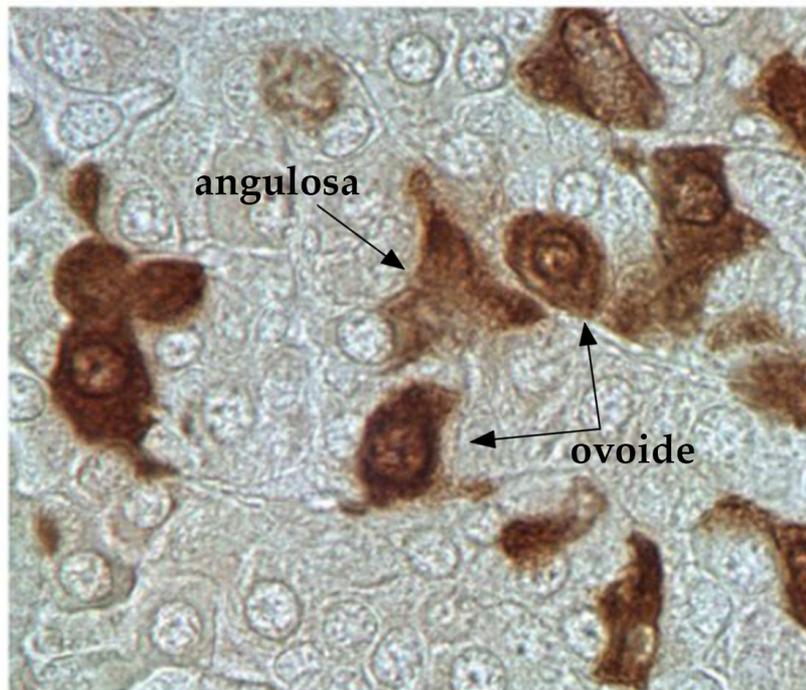


Figura 6. Inmunotinción de TSHB en secciones de hipófisis. Se observa la morfología angulosa y ovoide de los tirotropos. Tomada de Bargi-Souza et al., 2014.

Estas células están sujetas a la influencia de TRH y a las hormonas tiroideas T3 y T4, ya que poseen receptores a dichas hormonas (Ooi et al., 2004).

6.1 TSH

La hormona estimuladora de tiroides, tirotropina o TSH, es una glicoproteína que está formada por dos subunidades, la subunidad α (CGA), que es compartida con los gonadotropos para la síntesis de LH y FSH y la subunidad β

(TSHB), específica para los tirotrópos, la cual le proporciona la actividad hormonal biológica (Bargi-Souza et al., 2014; Joseph-Bravo et al., 2015).

Como se ha descrito, la TSH es esencial para la función, diferenciación y crecimiento de la glándula tiroides. Actúa gracias a los receptores TSHR que se expresan principalmente en las células foliculares tiroideas, donde estimula todos los pasos necesarios para la síntesis y secreción de TH (Bassett & Williams, 2008; Bizhanova & Kopp, 2009; Ortega-Carvalho et al., 2016).

6.2 TRH

La hormona liberadora de tirotrópinga o TRH, es una amida tripéptida compuesta por tres aminoácidos: ácido glutámico, histidina y prolina (pGlu-His-Pro NH₂), que deriva de una proteína precursora prepro-TRH (Fekete & Lechan, 2014; Ortega-Carvalho et al., 2016).

La TRH es producida en diferentes partes del cerebro, sin embargo, las neuronas TRH hipofisiotrópicas que se encuentran en el núcleo paraventricular (PVN) del hipotálamo, son las responsables de la regulación del eje HHT (Costa-e-Sousa & Hollenberg, 2012; Ortega-Carvalho et al., 2016).

Esta hormona, estimula la síntesis y liberación de TSH en los tirotrópos, la síntesis y liberación de prolactina en los lactotópos, y se ha reportado que en algunas especies, también estimula a la hormona de crecimiento en los somatotópos (Galas et al., 2009; Joseph-Bravo et al., 2015).

La estimulación de los tirotrópos sucede cuando la TRH se une a su receptor de membrana específico, el receptor 1 de TRH (TRHR1), el cual es un receptor con siete dominios transmembranales acoplado a proteínas G de unión a guanósín trifosfato (GTP). Esta unión da como resultado la activación de la fosfolipasa C (PLC), la movilización de calcio y la activación de la proteína quinasa C (PKC) (Fekete & Lechan, 2014; Joseph-Bravo et al., 2015).

6.3 Secreción de TSH

La concentración normal de TSH en sangre, es regulada por el equilibrio del efecto estimulador de TRH y la retroalimentación negativa ejercida por las TH en la hipófisis y el hipotálamo.

La TRH estimula a los tirotropos cuando se une a sus receptores acoplados a proteínas G. La transducción de señales tiene lugar principalmente por la participación de la proteína $G_q/11$, que activa la fosfolipasa C ($PLC\beta$), la cual cataliza la hidrólisis de fosfatidilinositol 4,5 bisfosfato (PIP_2), con lo que da lugar a dos segundos mensajeros: inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3) y 1,2-diacilglicerol (DAG). El IP_3 se difunde desde la superficie de la membrana hasta el retículo endoplasmático, donde provoca la liberación y movilización de Ca^{2+} . DAG activa la PKC directamente, lo que desencadena una cascada de fosforilación de proteínas, que, entre otras cosas, media el efecto de la TRH (ver figura 7) (Hinkle et al., 2012; Melmed, 2011; Ortega-Carvalho et al., 2016).

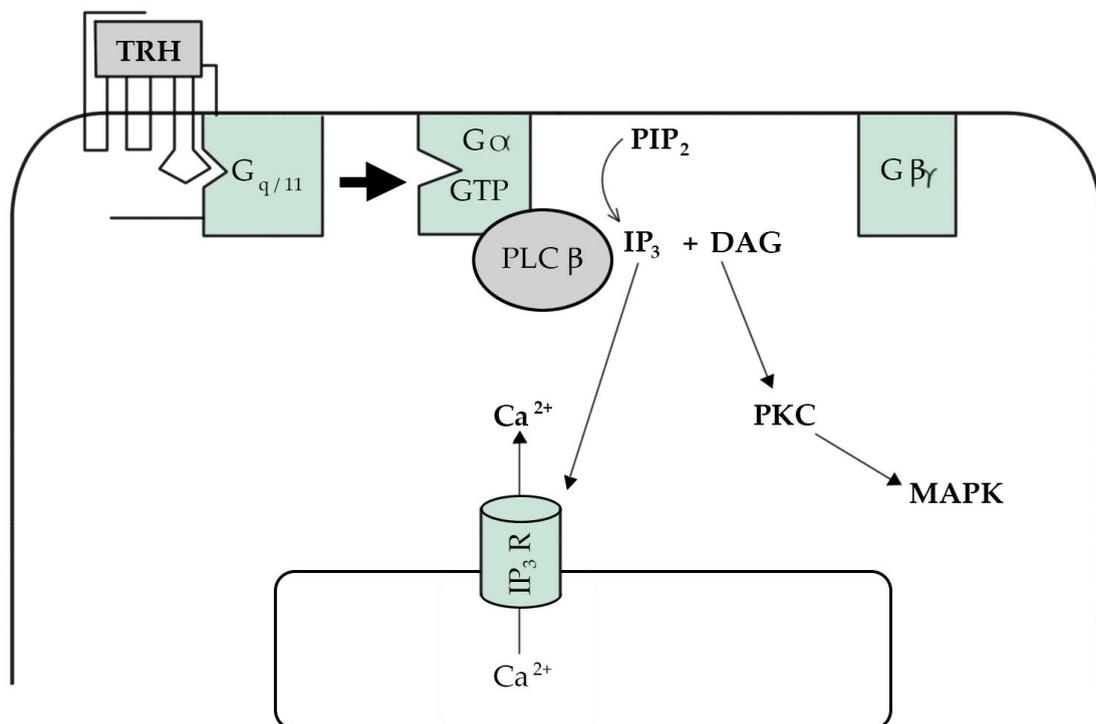


Figura 7. Señalización de la hormona liberadora de tirotropina. TRH moviliza calcio intracelular y activa la proteína quinasa C a través de su receptor acoplado a una proteína G. La

fosfolipasa C β es el principal efector de esta vía de señalización. Tomada y modificada de Hinkle et al., 2012.

La liberación de calcio intracelular da lugar al movimiento de los gránulos secretores hacia la superficie celular, lo que permite la exocitosis y la secreción de TSH (Melmed, 2011; Ortiga-Carvalho et al., 2016).

7. REGIONALIZACIÓN

Los primeros estudios inmunohistoquímicos de la hipófisis anterior revelaron una distribución heterogénea de las diferentes células endocrinas (Fauquier et al., 2002), sin embargo, investigaciones más recientes han mostrado que la formación de la adenohipófisis está dominada por redes tridimensionales entremezcladas, con una gran organización de células endocrinas y no endocrinas (Bargi-Souza et al., 2014; Mollard et al., 2012).

Elster, 1993 y Melmed, 2011 describen la siguiente organización: los somatotropos se encuentran mayormente en las alas laterales, los lactotropos parecen tener una localización al azar por todo el lóbulo anterior, pero son más numerosos en las porciones posteromedial. Los corticotropos se ubican principalmente en la parte central, aunque también se pueden encontrar dispersos en las alas laterales. Los tirotropos se encuentran en la parte anteromedial y también en la parte tubular de la hipófisis. Finalmente, los gonadotropos se encuentran dispersos en todo el lóbulo anterior y en la parte tubular (ver figura 8).

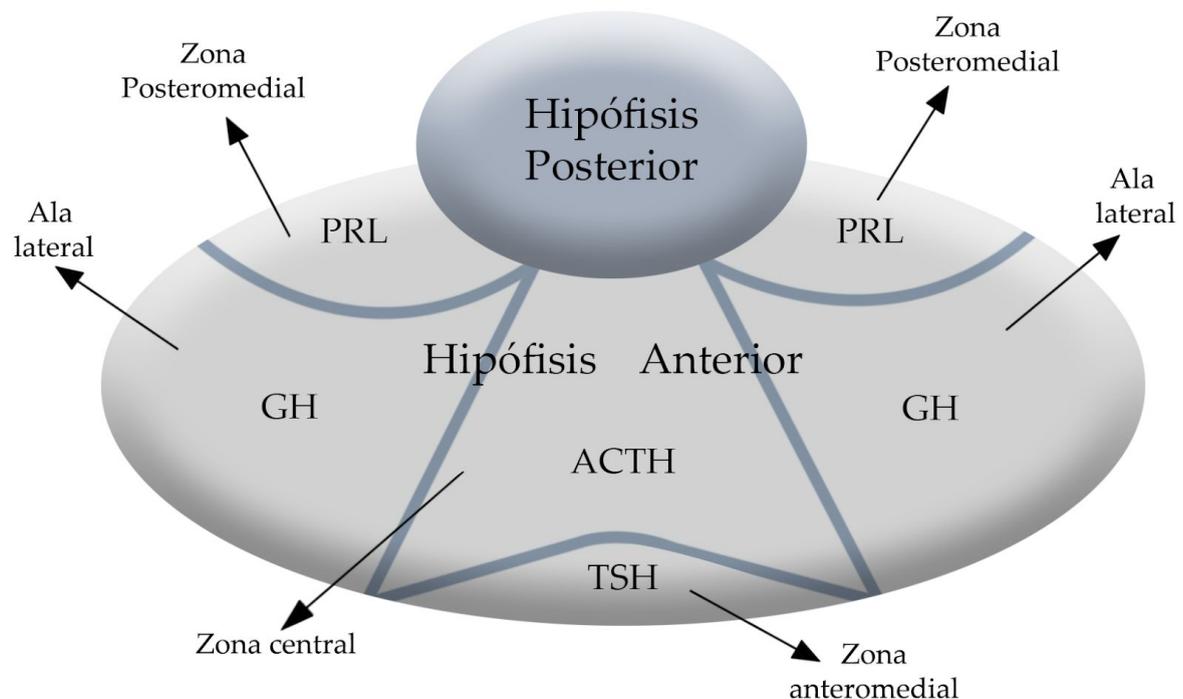


Figura 8. Distribución de los tipos celulares de la adenohipófisis. Se observan las distintas zonas de la hipófisis anterior, así como la distribución de los tipos celulares endocrinos. Tomado y adaptado de Melmed, 2011.

Aunado a lo anterior, se debe considerar que otras investigaciones han reportado que bajo las distintas demandas fisiológicas que ocurren a lo largo del desarrollo como la pubertad, la organización celular cambia, inclusive con la influencia de factores paracrinos o la disposición de la vasculatura en cada región (Campos et al., 2018; Del río, 2012).

8. ANTECEDENTES

Existen distintas alteraciones en la función de los ejes neuroendocrinos, como el hipotiroidismo primario. Esta patología consiste en la reducción de los niveles de TH en circulación debido a una falla tiroidea, que resulta en un aumento de la producción de TRH y TSH, mientras que ocurre lo contrario cuando las TH en circulación están en exceso (Gómez et al., 2010; Ortega-Carvalho et al., 2016).

En una condición de hipotiroidismo, se ha reportado que se producen cambios en la conformación de los tirotrpos; estos estudios reportan que los tirotrpos se desgranulan y experimentan hipertrofia, también se menciona que el número de somatotropos disminuye considerablemente, aumentando el porcentaje de tirotrpos. A pesar de que no se realizaron mediciones del número de células de la hipófisis, estos resultados revelan el papel clave que las hormonas tiroideas tienen en la regulación de la proliferación de células hipofisarias (Quintanar-Stephano & Valverde-R, 1997; Surks & DEFESI, 1976).

Otros estudios han reportado que en las células hipofisarias de ratas hipotiroideas, el citoesqueleto de actina se encuentra desorganizado, lo cual produce cambios en toda la glándula (Bargi-Souza et al., 2013).

Este trabajo es significativo, ya que el hipotiroidismo es una de las causas más importantes de consulta en endocrinología, pues afecta más frecuentemente a mujeres, incluso al 2% de las mujeres adultas. Así pues, el estudio de las posibles alteraciones en la reorganización y cambios morfológicos de los tirotrpos como parte de los mecanismos implicados en la disrupción del eje HHT es pertinente y relevante.

Este campo continúa abierto y resulta de interés ya que la mayoría de la información proviene de estudios realizados en condiciones *in vitro*, lo cual implica una pérdida del microambiente tisular, así como de las asociaciones establecidas entre las células endocrinas y de la vasculatura.

Por todo lo anterior, se sugirió realizar un estudio en rebanadas de hipófisis de rata macho, en las que se utilizó la técnica de inmunohistoquímica y de esta manera, se evaluaron los cambios ocurridos en los tirotrpos así como las relaciones que existen con la vasculatura, bajo condiciones de hipotiroidismo primario.

HIPÓTESIS

En condiciones de hipotiroidismo primario, habrá un aumento en la proporción y área celular de tirotrópos, además, la organización de las células endocrinas será diferente y existirán cambios en la complejidad y densidad de los vasos sanguíneos.

OBJETIVO

Objetivo general

Determinar los cambios en la morfología, proporción, regionalización y relación con la vasculatura de los tirotrópos, así como los cambios que ocurren en los demás tipos celulares de la hipófisis anterior en condiciones de hipotiroidismo primario.

Objetivos particulares

Determinar los cambios morfológicos y la posible reorganización de los tirotrópos en condiciones de hipotiroidismo primario.

Determinar la proporción de las distintas células endocrinas de la adenohipófisis bajo condiciones de hipotiroidismo primario en rebanadas de hipófisis.

Describir los cambios que ocurren en la vascularización bajo condiciones de hipotiroidismo primario.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales de estudio

Se utilizaron 16 ratas macho de la cepa Wistar en edad reproductiva (dos meses de edad). Los animales se mantuvieron en el bioterio de la Facultad de Ciencias con alimento y agua *ad libitum* en periodos 12/12 horas de luz-obscuridad. Todos los procedimientos se llevaron a cabo en conformidad con la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, que dicta las especificaciones técnicas para producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

Los animales se separaron en dos grupos: control (n=4) y experimental (n=12).

Al grupo experimental se le realizó una tiroidectomía total. La cirugía se llevó a cabo en condiciones asépticas y bajo anestesia con una combinación de ketamina (60%) y xilazina (40%). Se inyectó 0.20mL de anestésico por cada 250g de peso. Durante los siguientes días de la cirugía y hasta que se realizaron los experimentos correspondientes, a las ratas se les administró lactato de calcio (2 g/1L) en el agua para compensar la falta de calcio.

Obtención de muestras biológicas

La obtención de la hipófisis en el grupo experimental con hipotiroidismo primario (Tx) se realizó a los 7, 14 y 21 días posteriores a la cirugía, Tx7, Tx14 y Tx 21 respectivamente (n=4, en cada día indicado). Mientras que las hipófisis del grupo control (n=4) se obtuvieron al tener dos meses de edad.

Los animales se perfundieron de forma intracardiaca. Para ello, las ratas recibieron una inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico (0.25mL por cada 250g de peso). Una vez que los animales se encontraron completamente

sedados se canularon en el corazón y con ayuda de una bomba peristáltica se perfundieron 125 mL de solución PBS 1x (amortiguador con fosfatos salino, 0.1M, pH 7.4). Seguido de ello se introdujo paraformaldehído (PFA) al 4%. Concluida la perfusión, se extrajo la hipófisis, la cual se mantuvo en PBS hasta su uso.

Inmunohistoquímicas

Las hipófisis se cortaron en un vibratomo (Leica VT1000S) para obtener rebanadas de 30 μ m de grosor, las cuales se distribuyeron en cuatro pozos distintos que contenían solución de permeabilización y bloqueo (PBS 0.1M, albúmina sérica bovina 2% y tritón 1%) durante 45 minutos.

Posteriormente, se incubaron por dos noches con el anticuerpo primario de rata anti-ratón endomucina (*Santa Cruz Biotechnology, sc-53941*); además en el pozo 1 se agregó el anticuerpo primario de conejo anti-rata TSH (*A.F. Parlow National Hormone and Peptide Program, AFP1274789*) en el pozo dos el anticuerpo primario de conejo anti-rata PRL (*ABCAM, ab 188229*), en el pozo tres el anticuerpo primario de conejo anti-rata LH (*A.F. Parlow National Hormone and Peptide Program, AFP571292393*) y el anticuerpo primario de conejo anti-rata FSH (*A.F. Parlow National Hormone and Peptide Program, AFPHFSH6*) y en el último pozo el anticuerpo primario de conejo anti-rata GH (*A.F. Parlow National Hormone and Peptide Program, AFP5672099*). La incubación se llevó a cabo en cámara húmeda a 4° C, a una dilución 1:250 en PBS 0.1M, albúmina sérica bovina 2% y tritón 0.3%.

Después, con lavados de PBS 1X se retiraron los anticuerpos primarios y se incubaron por 2 horas a temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios anti-rata Alexa 594 (*Jackson ImmunoResearch Laboratories, 712-586-150*) y anti-conejo Alexa 647 (*Jackson ImmunoResearch Laboratories, 711-606-152*) a una dilución 1:200 en PBS. Transcurrido este tiempo, se lavaron los tejidos y se incubaron las muestras con el marcador de núcleos DAPI

(4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride) por 5 minutos. Posteriormente, las rebanadas se lavaron con PBS 1x y se montaron en portaobjetos junto con Mowiol (81381, *Sigma Aldrich*) como medio de montaje para conservarlos.

Adquisición y procesamiento de imágenes

La adquisición de imágenes se realizó con un microscopio confocal (*Leica TCS SP8*).

Se tomaron fotos a las rebanadas de todas las hipófisis con un objetivo de aumento 20X y se hizo una reconstrucción en xy. También se tomaron fotos con aumento de 60x.

Con ayuda del Software de procesamiento de imágenes Fiji ImageJ (*NIH, USA*) se realizaron los conteos celulares. En el caso de los tirotropos, también se midió la superficie celular y se caracterizó su organización y forma.

En las inmunohistoquímicas contra GH, LH, FSH y PRL, se seleccionaron cuadrantes al azar para poder determinar posibles diferencias entre los grupos. Cabe destacar que estos análisis fueron cualitativos por lo que no se realizó ninguna cuantificación celular.

Análisis estadístico

Para el análisis de los resultados se utilizó estadística no paramétrica ya que al tener un número de muestra pequeño, no hay garantía de que se tenga una distribución normal. El tamaño muestral se determinó usando el mínimo número de animales posible.

A los datos obtenidos con ImageJ respecto a la superficie de la glándula hipófisis, superficie celular de los tirotropos, así como el número de tirotropos

en ambos grupos, se les aplicó una prueba de *Kruskal-Wallis* para comparar de esta manera los cambios entre el grupo control y los diferentes tiempos del grupo experimental (Tx7, Tx14 y Tx21). También se realizó una prueba *U de Mann Whitney* por pares para realizar la comparación entre el número de tirotopos entre el grupo control y los diferentes tiempos. Todos los datos se analizaron con el programa estadístico Prism 6.0 (*GraphPad, Software Inc., USA*).

En cada caso, se consideró un valor de $p < 0.05$ como significativo.

RESULTADOS

Con la finalidad de establecer posibles diferencias en la organización y morfología de tirotrupos, así como de la hipófisis bajo condiciones de hipotiroidismo primario, se realizaron inmunohistoquímicas contra TSH, y se analizaron los cambios a los 7, 14 y 21 días posteriores a la cirugía. También se realizó marcaje contra endomucina para observar vasculatura y así como marcajes contra GH, FSH, LH y PRL.

Los resultados que se obtuvieron a partir del protocolo que se describió con anterioridad son los siguientes:

Cambios en la glándula hipófisis

Para determinar si bajo condiciones de hipotiroidismo primario, existen cambios en la glándula hipófisis se hicieron mediciones de la superficie de cada rebanada a las que se les realizó la inmunohistoquímica, esto para observar si el tamaño de la glándula cambiaba señalando hiperplasia, sin embargo, como se muestra en la figura 9 no hubo diferencias significativas ($p > 0.05$) entre los grupos.

Por otra parte, en la consistencia de la glándula se notaron diferencias, si bien no se llevó a cabo alguna medición, se pudo observar que la glándula bajo condiciones de hipotiroidismo primario parecía estar más blanda, perdiendo cierta solidez que las del grupo control sí presentaban.

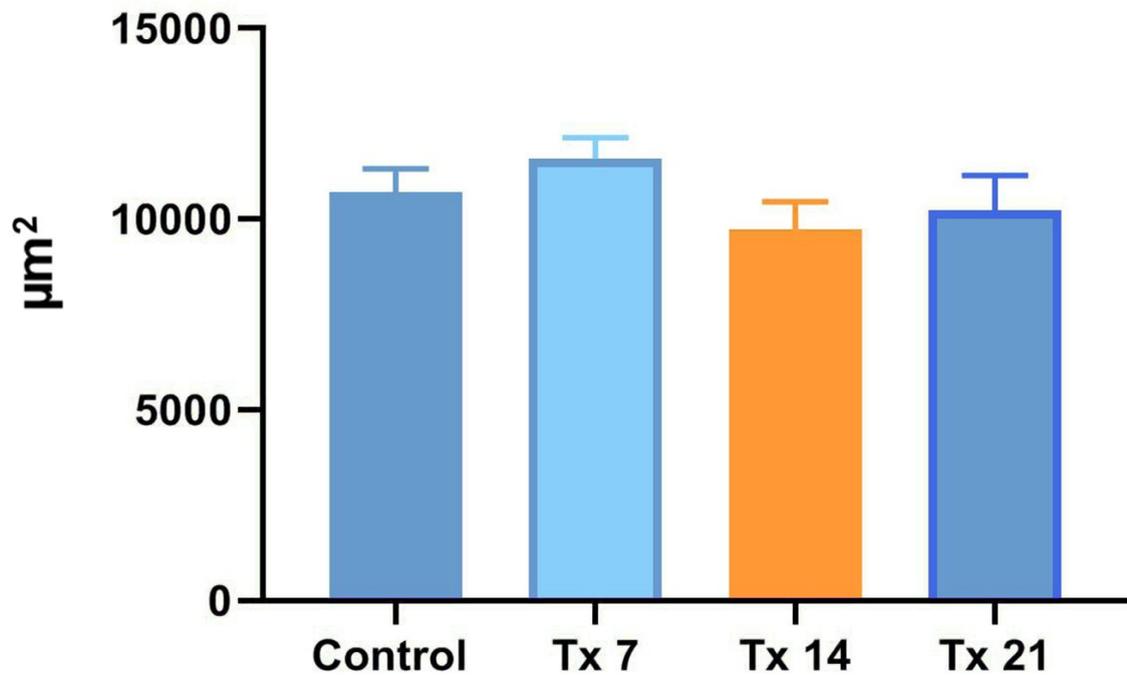


Figura 9. Superficie de la glándula hipófisis. Se observa que el área medida en μm^2 no tiene diferencias significativas ($p > 0.05$) entre los grupos. La gráfica muestra los valores promedios (\pm EE).

Distribución poblacional de tirotrapos

La organización y distribución de los tirotrapos se determinó gracias a la reconstrucción de imágenes 20x para formar la imagen completa de la hipófisis. En ellas se realizó la identificación de los tirotrapos.

En la figura 10 se observa que en el grupo control la distribución que presentan los tirotrapos es similar a la que se ha reportado, con una distribución predominante en el área antero medial de la hipófisis, sin embargo, en los grupos tiroidectomizados la distribución cambia drásticamente. En Tx 7 se observa como los tirotrapos comienzan a tener una distribución más uniforme por toda la glándula. En Tx 14 y Tx 21 se observa que ya no hay una regionalización o distribución específica, sino que se encuentran distribuidos a lo largo de la glándula.

En la figura 11 se puede observar la organización de las células tirotropas. En el primer panel control, se observa como los tirotropos se encuentran de manera solitaria o en grupos pequeños. En el panel derecho se observan tirotropos de Tx 21, donde se puede ver que se encuentran agrupados y mucho más cercanos entre sí.

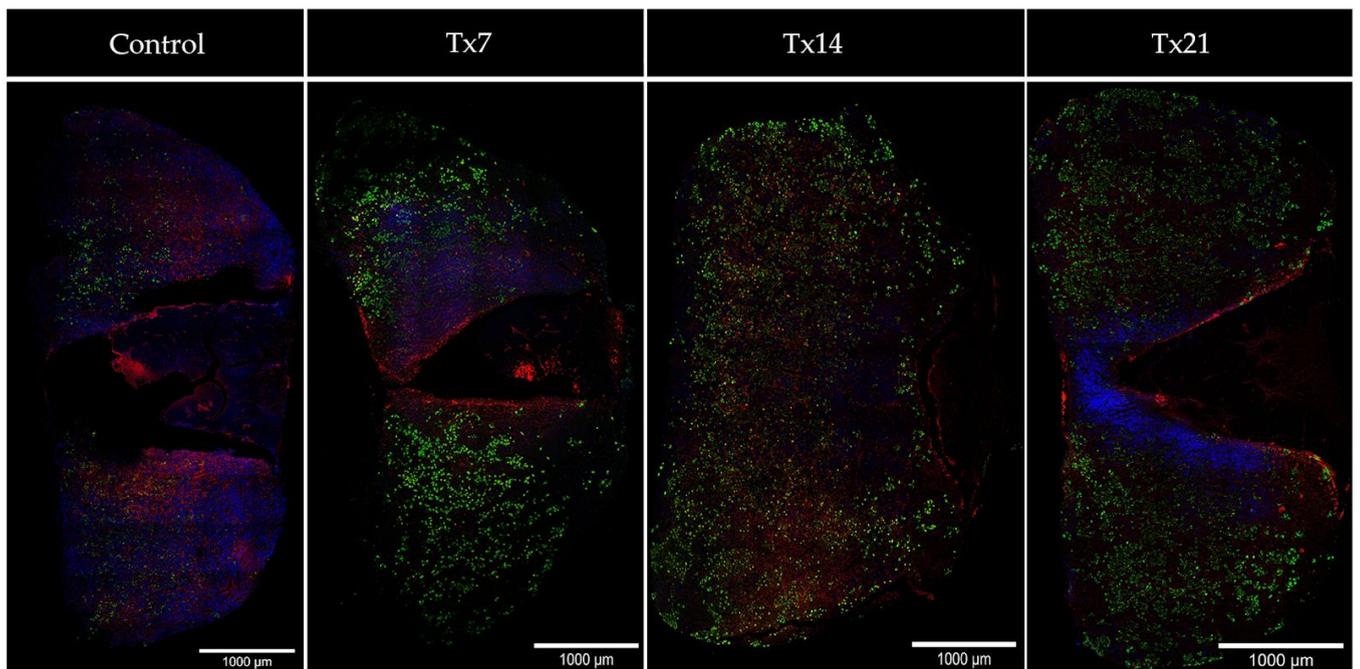


Figura 10. Distribución de tirotropos en rebanadas de hipófisis anterior. Se observa la distribución de tirotropos en el grupo control y en los grupos tiroidectomizados Tx7, Tx14 y Tx21. Marcaje para TSH (verde), vasculatura (rojo), núcleos (azul). Barra de escala 1000 µm.

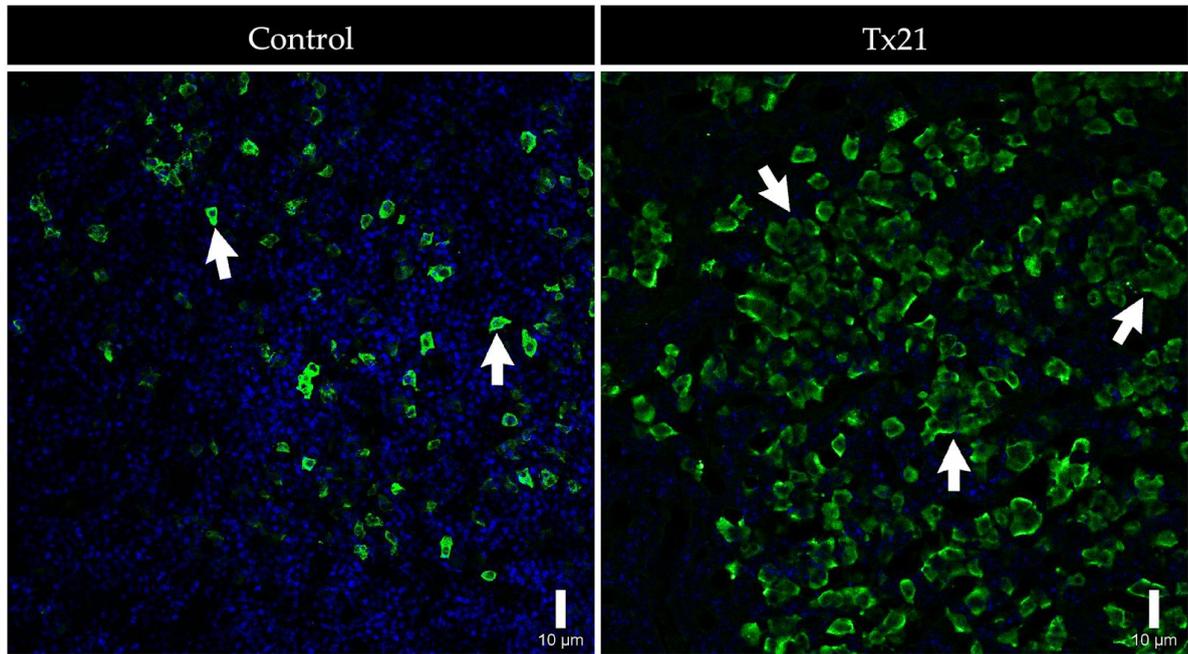


Figura 11. Organización de los tirotropos en rebanadas de hipofisis anterior. Se observa que en el grupo control los tirotropos se encuentran organizados de manera solitaria o en pequeños grupos; en el grupo Tx 21 la organización consiste en grupos grandes de tirotropos muy cercanos uno con otro. Marcaje para TSH (verde), núcleos (azul). Microfotografías con aumento de 20x. Barra de escala 10 µm.

Población celular de tirotropos con hipotiroidismo primario

Para determinar la población celular de tirotropos en cada grupo se realizó un conteo del número de células que eran positivas al marcaje de TSH. Se observa un incremento en la cantidad de los tirotropos (Figuras 10 y 12). De manera particular, se observa que a los siete días siguientes a la tiroidectomía hay un aumento del número de tirotropos con respecto al control y este aumento continúa durante los días posteriores, Tx 14 y Tx 21. El aumento del número de células en cada grupo presentó diferencias significativas ($p < 0.05$).

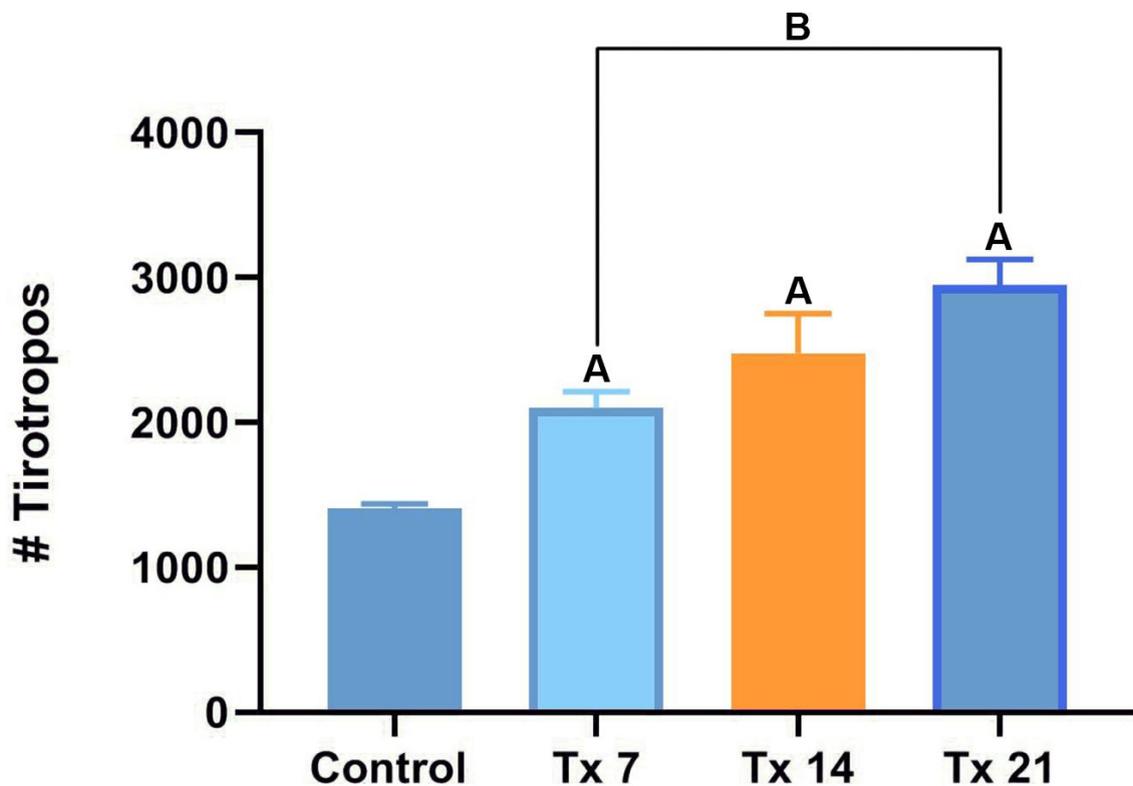


Figura 12. Número de células positivas a TSH. Se observa un aumento del número de tirotropos en los grupos tiroidectomizados respecto al grupo control. La letra A indica que existen diferencias significativas ($p < 0.05$) de Tx 7, Tx 14 y Tx 21 respecto al control. La B indica que existen diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los grupos Tx 7 y Tx 21. La gráfica muestra los valores promedios (\pm EE).

Morfología de tirotropos

En la figura 13 se puede observar un panel comparativo donde se muestra la morfología que presentaron los tirotropos en condiciones normales y con hipotiroidismo primario. En el grupo control se encuentran tirotropos con morfología típica, es decir, células con forma estrellada o angulosa y algunas con forma ovoide, que se encuentran organizadas de manera solitaria o en pequeños grupos.

En los grupos tiroidectomizados, los tirotropos poseen una forma irregular y no siguen un patrón de la morfología. Este cambio se observa de manera gradual, es decir en Tx 7 solo algunas tienen morfología diferente, pero en Tx 21 ya no hay una estructura definida, y muy pocas células mantienen la morfología común de los tirotropos.

En la figura 14 se presenta una comparación de la morfología entre el grupo control y Tx 21, ya que son los grupos con diferencias más claras entre sí. Se observan las formas típicas de tirotropos en el grupo control y en Tx 21 se observan distintas células con morfologías irregulares.

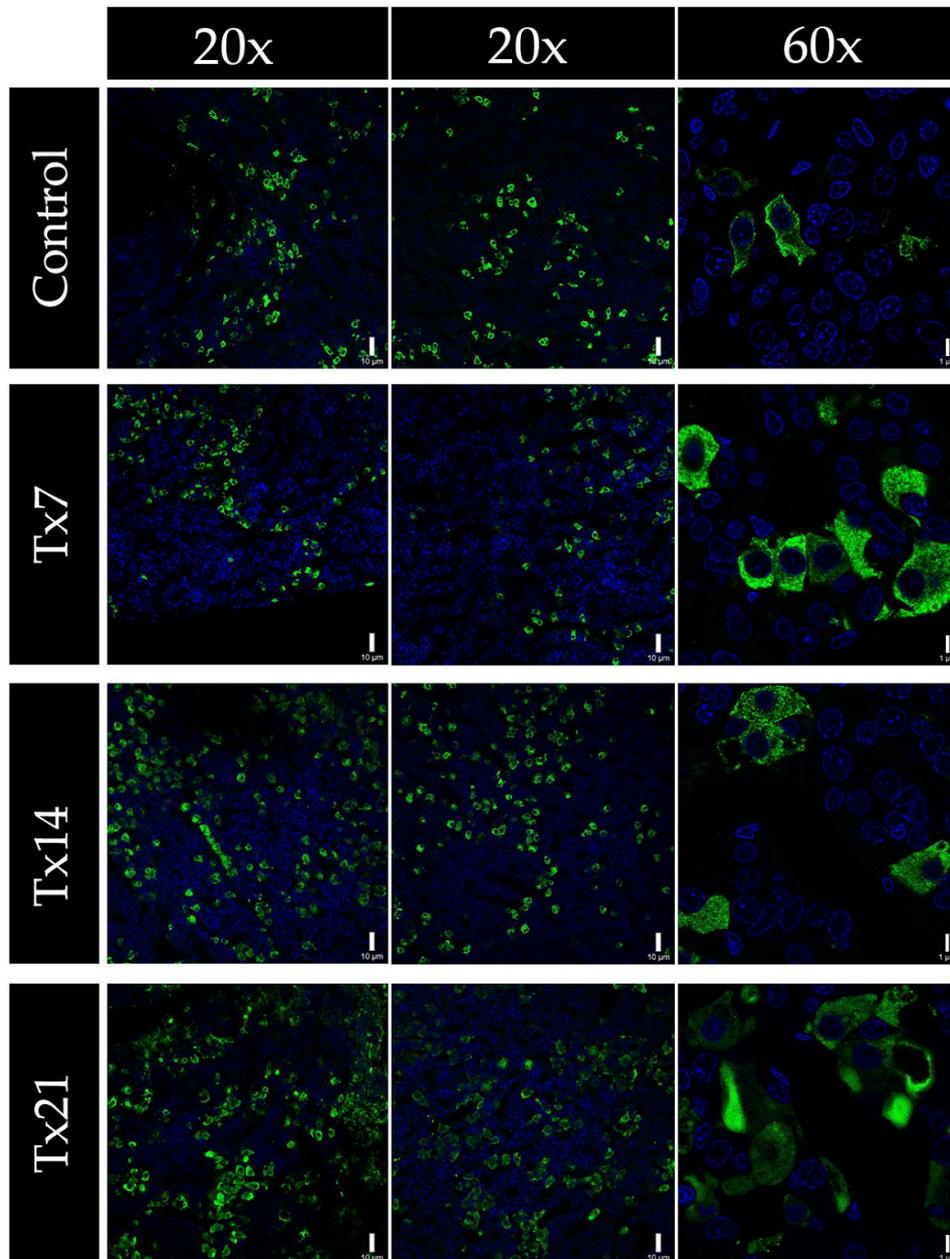


Figura 13. Morfología de tirotropos en rebanadas de hipofisis anterior. Se observan microfotografías con aumento de 20x y 60x de cada grupo estudiado. El grupo control los tirotropos poseen una morfología clásica, en donde el tirotropo tiene forma estrellada o angulosa. En los grupos Tx 7, Tx 14 y Tx 21 la morfología deja de ser consistente y se vuelve irregular. Marcaje para TSH (verde), núcleos (azul). Barra de escala, para los paneles con aumento 20x, 10 μm ., para los paneles aumento 60x 1 μm .

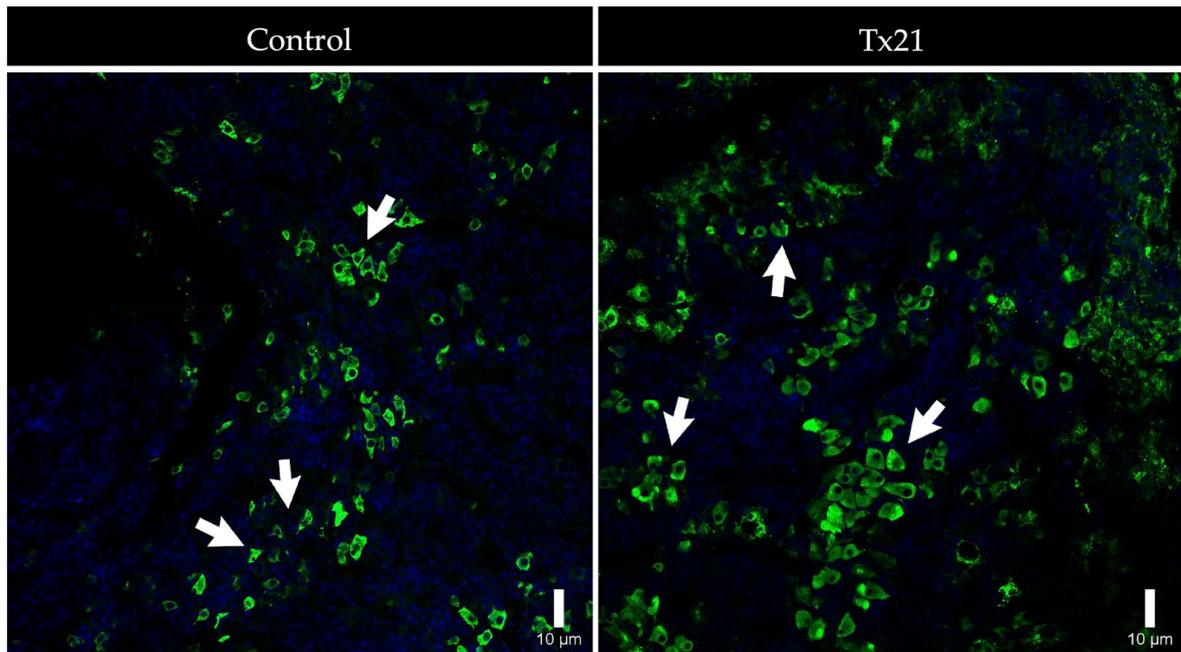


Figura 14. Morfología de tirotrapos en rebanadas de hipófisis anterior. Se observan microfotografías con aumento de 20x del grupo control y Tx 21. En el grupo control las flechas indican células con morfología común y en Tx 21 indican células con distintas formas irregulares. Marcaje para TSH (verde), núcleos (azul). Barra de escala 10 μm .

Para determinar si existe algún cambio con respecto al tamaño de los tirotrapos, se midió la superficie celular de cada uno. En la figura 15 se observa que el área de las células para el Tx 21 es menor con respecto al control, sin embargo, de acuerdo al análisis estadístico esta diferencia no es significativa ($p > 0.05$), es decir, no hubo cambios en el área de los tirotrapos hipofisarios bajo condiciones de hipotiroidismo primario comparada con el área de los tirotrapos del grupo control.

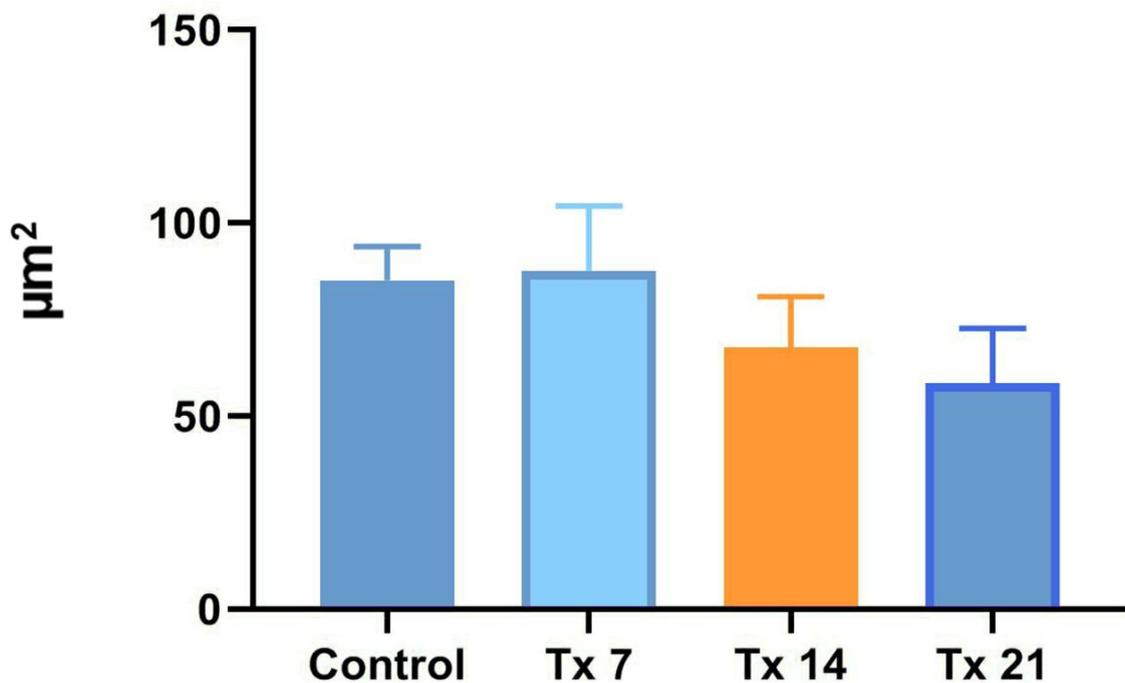


Figura 15. Superficie celular de tirotropos. Se observa que el área celular medida en μm^2 no tiene diferencias significativas ($p > 0.05$) entre los grupos. La gráfica muestra los valores promedios (\pm EE).

Cambios en la vasculatura

Para determinar los posibles cambios de la vasculatura entre el grupo control y Tx se realizaron inmunohistoquímicas contra endomucina y TSH para poder observar su relación.

En la figura 16 se muestran microfotografías en dos aumentos distintos, 20x y 60x de cada grupo estudiado. Aunque no se realizaron conteos para determinar si existen más ramificaciones de los vasos sanguíneos, se puede observar que conforme transcurren los días el grupo Tx tiene una cobertura vascular mayor que el grupo control.

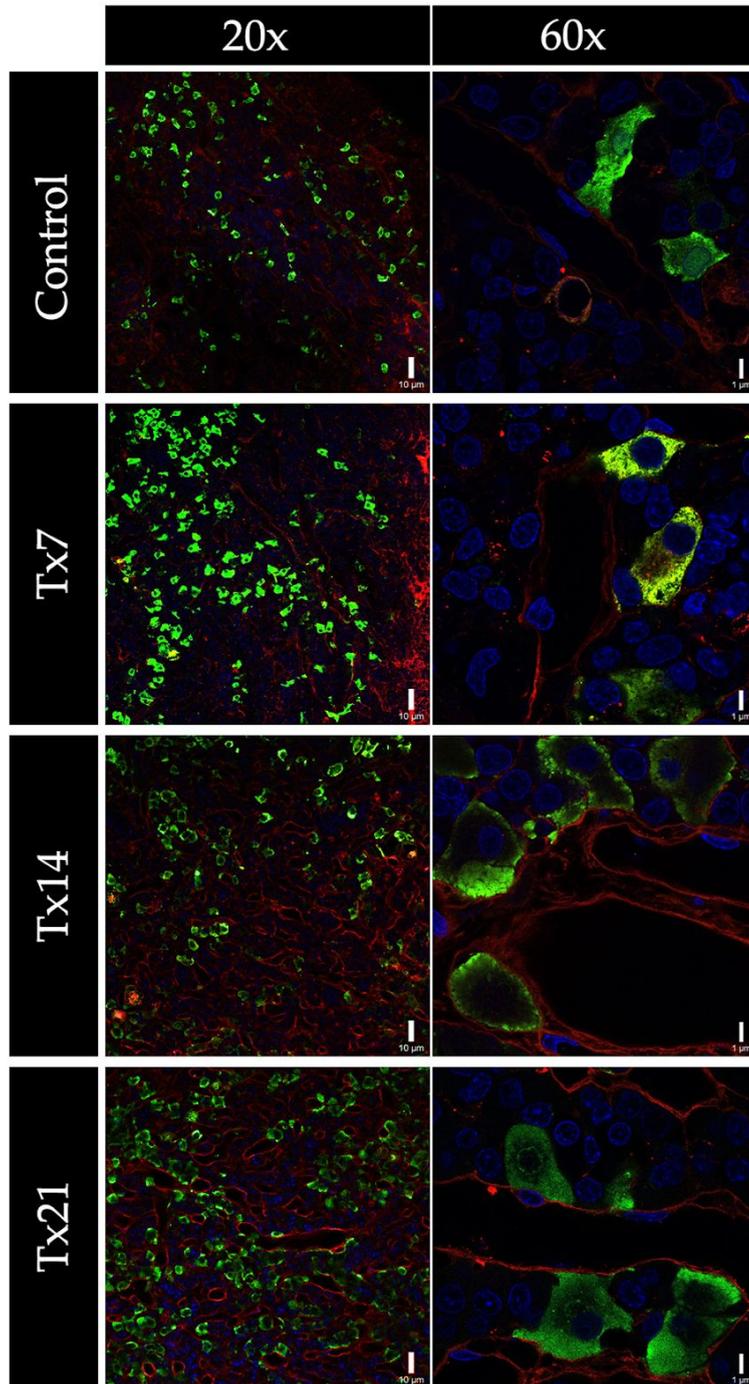


Figura 16. Cambios en la vasculatura en rebanadas de hipófisis anterior. Se observan microfotografías con aumento de 20x y 60x de cada grupo estudiado. Se observa el aumento de cobertura vascular de los grupos Tx 7, Tx 14 y Tx 21 con respecto al control. Marcaje para TSH (verde), vasculatura (roja), núcleos(azul). Barra de escala, para los paneles con aumento 20x, 10 μm ., para los paneles aumento 60x 1 μm .

También en los grupos tiroidectomizados se puede observar el aumento de los tirotrópos en torno a la vasculatura, señalando una relación más estrecha que con el grupo control.

Cambios en otros grupos celulares

Para evaluar posibles cambios de otras células productoras de hormonas hipofisarias bajo condiciones de hipotiroidismo primario, se realizaron inmunohistoquímicas en rebanadas de hipófisis anterior contra GH, LH, FSH y PRL.

En contraste con el aumento de número de células que se observó con los tirotrópos, el número de células no parece cambiar al menos en la población de lactotrópos y gonadotrópos, sin embargo, aunque no se realizaron conteos celulares, se observa que en la población de somatotrópos hay una disminución notoria en Tx 21 con respecto al control (figura 17).

En la figura 17 también se puede observar el aumento de la cobertura vascular en los grupos tiroidectomizados a diferencia del control, siendo Tx 21 el grupo donde se observa un incremento mayor.

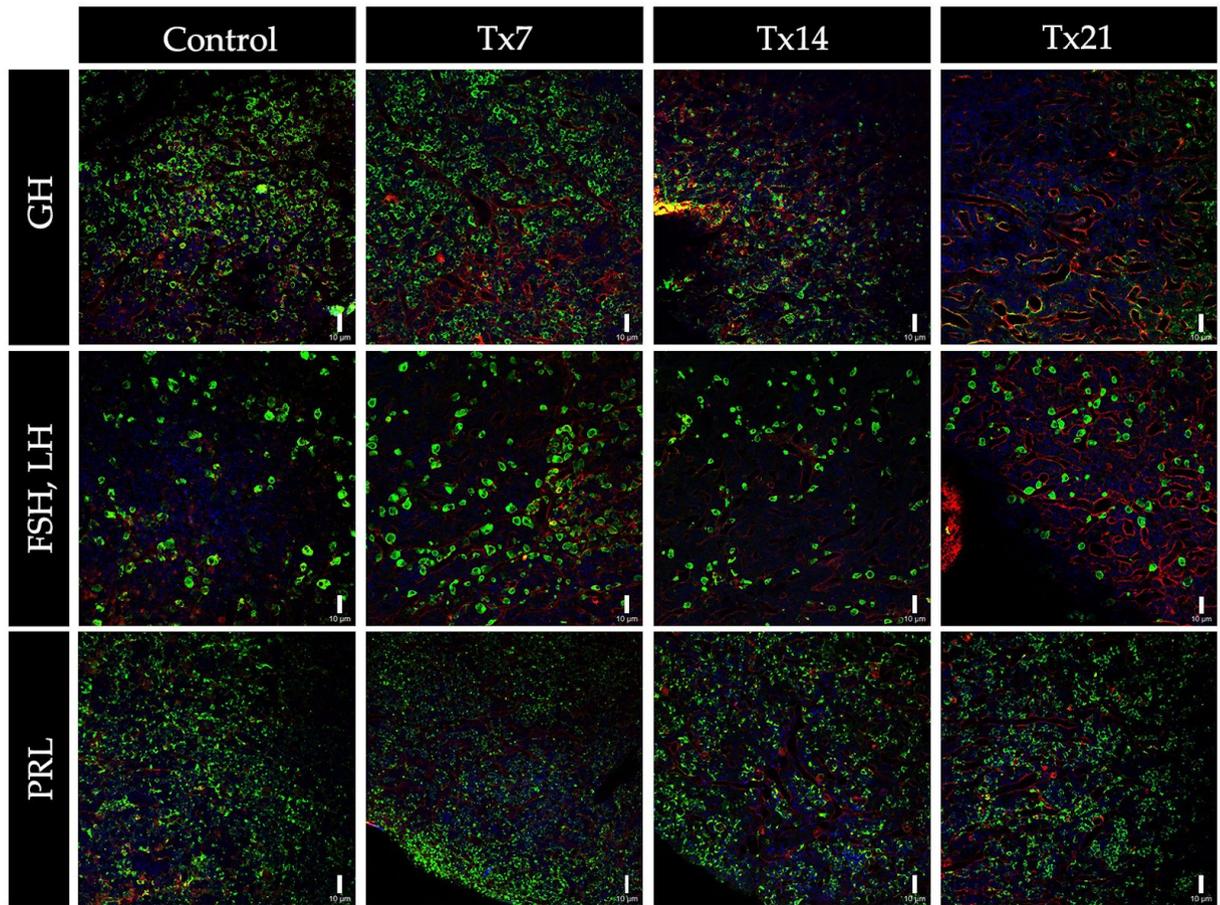


Figura 17. Cambios de otros tipos celulares de la hipófisis bajo condiciones de hipotiroidismo primario. Se observa que para células positivas a PRL y FSH, LH la población celular se mantiene igual; para células positivas para GH se observa que para los grupos tiroidectomizados existe una disminución en el número de células con respecto al grupo control. Marcaje para las diferentes hormonas (GH, FSH, LH y PRL) (verde), vasculatura (roja), núcleos (azul). Barra de escala 10 μ m.

DISCUSIÓN

El hipotiroidismo es una enfermedad con una alta incidencia en la población mundial, resulta ser de carácter importante porque ocasiona afectaciones en todo el cuerpo como en la función renal, que se asocia con un deterioro, en el sistema respiratorio, en el que ocasiona una depresión respiratoria, en el sistema nervioso central, que enlentece muchas funciones intelectuales como el habla, entre muchas otras. Debido a que la tiroides, la glándula que se encuentra atrofiada produciendo esta alteración, participa en un eje neuroendocrino, también pueden ocurrir afectaciones en la glándula hipófisis.

Este trabajo se realizó con la intención de aportar información que describa las alteraciones que ocurren en la glándula hipófisis a nivel celular, así como las relaciones que existen con la vasculatura, bajo condiciones de hipotiroidismo primario.

Para conseguir lo anterior, se indujo hipotiroidismo primario mediante una tiroidectomización total y se observaron los cambios en diferentes días, 7, 14 y 21, después de la cirugía. Estos días se escogieron porque estudios (Quintanar-Stephano et al., 1999) han reportado que en estos días ya se observan cambios entre grupos.

Se realizaron inmunohistoquímicas de rebanadas de hipófisis, lo que permitió se mantuvieran las interacciones entre células endocrinas, con células no endocrinas y con la vasculatura.

Como se describió, los tirotropos presentaron cambios en cuanto a su distribución, organización, número de células y morfología.

La redistribución se observa a partir del día 7 post tiroidectomía (figura 10), sugiere una plasticidad que resulta esencial para responder rápidamente ante

cambios de, ya sea aumentos hormonales o en este caso, deficiencias hormonales (Alim et al., 2012).

En Tx 21 se puede observar una distribución de tirotrpos en toda la glándula, lo cual va de la mano con el aumento en el número de tirotrpos observado. En algunos estudios (Salinas & Quintanar, 2000; Santiago, 2017; Surks & DEFESI, 1976) se ha observado un aumento en el número de células bajo condiciones de hipotiroidismo primario, lo que corresponde con los resultados de este trabajo (figura 12). Sin embargo, autores como Halász (2004) describen que los tirotrpos bajo esta afectación, además de que se observa un aumento del número de células en la hipófisis anterior, también aumentan de tamaño, convirtiéndose en células más grandes. Esto no se observó en este trabajo, al contrario, se observó una disminución en la superficie celular lo que podría interpretarse como el tamaño, aunque de esto no existieron diferencias significativas (figura 15).

En cuanto al aumento de tirotrpos, autores como Melmed (2011) mencionan que como resultado de la pérdida de retroalimentación negativa por parte de las hormonas tiroideas puede resultar en una hiperplasia de tirotrpos. Esta hiperplasia que se observa bajo condiciones de hipotiroidismo primario, es decir, la formación de nuevas células secretoras, se puede explicar por mecanismos de mitosis de células diferenciadas o bien, por la maduración de células indiferenciadas (Chen et al., 2005) ya que es conocida la hiperplasia fisiológica que ocurre por motivos hormonales, en otras palabras, con este aumento de células se incrementa la capacidad funcional de un tejido que lo necesita (Robbins, 2010). En este caso, corresponde al aumento progresivo de los niveles de TSH para elevar la producción de hormonas tiroideas (Pineda et al., 2016).

No obstante, el aumento del número de células que se observó en la población de tirotrpos se puede explicar también por una transdiferenciación, esto se refiere al proceso de transformación fenotípica de un tipo celular diferenciado a

otro, en el cual se activan sistemas de factores de diferenciación (Radian et al., 2003). Esto implica la existencia de células bihormonales como intermediarias.

La morfología de los tirotropos fue otro punto en el que se observaron diferencias. En el grupo control se puede observar una morfología común en los tirotropos, es decir, una morfología estrellada o angulosa. En los grupos Tx, esto cambia, siendo el grupo Tx 21 el que presenta mayores diferencias ya que la mayoría de las células tirotropos poseen una morfología irregular (figura 13). Este cambio de morfología puede explicarse debido a que, bajo las condiciones de hipotiroidismo primario, el citoesqueleto de actina se desorganiza (Bargi-Souza et al., 2013), lo que impide el mantenimiento de la estructura y forma celular.

Por otro lado, las diferencias observadas en la vasculatura son de importancia, porque como se sabe, la glándula hipófisis se encuentra altamente vascularizada, además de que los reportes indican que las diferentes células endocrinas muestran una estrecha relación espacial con los vasos sanguíneos (Alim et al., 2012). En este trabajo, se observó que los tirotropos de los grupos tiroidectomizados se acercaron a los vasos sanguíneos, además de que aparentemente la cobertura vascular aumentó de manera gradual en los estudios realizados en ratas con hipotiroidismo primario (figura 16). Sin embargo, lo anterior resulta contradictorio ya que se ha observado que las hormonas tiroideas tienen propiedades pro-angiogénicas.

Por ejemplo, se han realizado estudios en el corazón donde se ha visto que con tratamiento de hormonas tiroideas hay un aumento en la densidad numérica capilar, así como la masa de los capilares (Tomanek & Busch, 1998). En el cerebro se ha observado que, en condiciones de hipotiroidismo, existe una disminución de angiogénesis y por lo tanto se observa una menor complejidad y densidad de los vasos sanguíneos (Davis et al., 2016).

Todo lo anterior indicaría que al no estar presentes las hormonas tiroideas, se debió de observar una disminución en el sistema vascular presente en la hipófisis anterior, no obstante, al no ser así, debe haber otro mecanismo que

induzca el crecimiento y desarrollo de vasos sanguíneos, compensando la falta y estimulación de las hormonas tiroideas.

Este aumento observado en la vasculatura probablemente sea una forma de agilizar o mejorar la distribución de TSH, compensando la falta de producción y secreción de hormonas tiroideas, que ocurre bajo condiciones de hipotiroidismo primario. Esta compensación, podría darse, por lo tanto, por el aumento en el número de tirotropos, como ya se mencionó, por el aumento en la vasculatura en la hipófisis y por el aumento en la relación que establecen estas dos partes.

En cuanto a los cambios observados en las demás células endocrinas (figura 17), se puede decir que al menos en gonadotropos (células positivas a FSH, LH) y en lactotropos (células positivas a PRL) no se observaron diferencias en la población celular, sin embargo, ya se ha reportado una disminución en células lactotropos en ratas con hipotiroidismo primario (Santiago, 2017). En somatotropos, se observa una disminución considerable en Tx 21 respecto al control, y como ya se mencionó puede ser este el grupo celular que sufre desdiferenciación, una transformación de somatotropos a tirotropos como resultado de la alta demanda funcional en el hipotiroidismo primario. Esta transformación ya se ha reportado con anterioridad (Radian et al., 2003; Surks & DEFESI, 1976).

En lo anterior, hay que recalcar que no se hicieron conteos celulares, los cuales serían de mucha ayuda para determinar si en realidad existieron cambios en las células secretoras de la hipófisis bajo condiciones de hipotiroidismo primario.

CONCLUSIÓN

Este trabajo confirma que la glándula hipófisis se adapta y responde ante los diferentes desafíos fisiológicos. Además, permitió visualizar diversos cambios que ocurren en los tirotrópos, así como la plasticidad que tienen, la cual depende de las exigencias fisiológicas y, en la que fue evidente por la redistribución de los tirotrópos y el aumento de su número celular, así como por la variación de la relación con la vasculatura, y el aumento de ésta.

Ante lo anterior, quedan como perspectivas, poder hacer estudios más profundos de cómo cambia la vasculatura en la hipófisis bajo condiciones de hipotiroidismo primario, buscar cambios en el calibre del vaso o aumentos de las ramificaciones vasculares. También sería interesante hacer conteos celulares de las demás células endocrinas para observar si existen diferencias y así, entender mejor cómo cambia el contexto de toda la hipófisis con alteraciones como el hipotiroidismo.

REFERENCIAS

- Alim, Z., Hartshorn, C., Mai, O., Stitt, I., Clay, C., Tobet, S., & Boehm, U. (2012). Gonadotrope plasticity at cellular and population levels. *Endocrinology*, *153*(10), 4729–4739. <https://doi.org/10.1210/en.2012-1360>
- Amar, A. P., & Weiss, M. H. (2003). Pituitary anatomy and physiology. *Neurosurgery Clinics of North America*, *14*(1), 11–23. [https://doi.org/10.1016/S1042-3680\(02\)00017-7](https://doi.org/10.1016/S1042-3680(02)00017-7)
- Arias Holguín Msc, G. J., Wilches Torres Msc, M. A., & Pedraza, D. (2013). Análisis de la relación entre alteraciones del eje hipotálamo-hipófisis-tiroides y exposición a perclorato en ratones de la cepa ICR. *NOVA- Publicación Científica En Ciencias Biomédicas*, *11*(19), 41–49. <https://doi.org/10.22490/24629448.1015>
- Bargi-Souza, P., Kucka, M., Bjelobaba, I., Tomić, M., Janjic, M. M., Nunes, M. T., & Stojilkovic, S. S. (2014). Loss of basal and trh-stimulated tshb expression in dispersed pituitary cells. *Endocrinology*, *156*(1), 242–254. <https://doi.org/10.1210/en.2014-1281>
- Bargi-Souza, P., Romano, R. M., Salgado, R. D. M., Goulart-Silva, F., Brunetto, E. L., Zorn, T. M. T., & Nunes, M. T. (2013). Triiodothyronine rapidly alters the TSH content and the secretory granules distribution in male rat thyrotrophs by a cytoskeleton rearrangement-independent mechanism. *Endocrinology*. <https://doi.org/10.1210/en.2013-1508>
- Bassett, J. H. D., & Williams, G. R. (2008). Critical role of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis in bone. *Bone*, *43*, 418–426. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2008.05.007>
- Bizhanova, A., & Kopp, P. (2009). Minireview : The Sodium-Iodide Symporter NIS and Pendrin in Iodide Homeostasis of the Thyroid. *Endocrinology*, *150*, 1084–1090. <https://doi.org/10.1210/en.2008-1437>
- Brandan, N., Llanos, I., Miño, C., Ragazzoli, M., & Ruiz, D. (2011). Hormonas hipotalámicas e hipofisarias. *Argentina: Universidad Nacional Del Nordeste*, 1–12.
- Brandan, N., Llanos, I., Miño, C., & Ruiz, D. (2007). Hormonas tiroideas. *Argentina: Universidad Nacional Del Nordeste*, 1–7.
- Bruce, A., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2015). *Molecular Biology of the Cell* (Sixth Edit). Garland Science, Taylor & Francis Group.
- Burbridge, S., Stewart, I., & Placzek, M. (2016). Development of the Neuroendocrine Hypothalamus. *Comprehensive Physiology*, *6*(April), 623–643. <https://doi.org/10.1002/cphy.c150023>
- Campos, P., Golan, M., Hoa, O., Fiordelisio, T., & Mollard, P. (2018). Pituitary cell and molecular. In *Encyclopedia of Reproduction* (Second edi, Issue January, pp.

- 184–187). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.64577-4>
- Carvalho, D. P., & Dupuy, C. (2017). Thyroid hormone biosynthesis and release. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 458, 6–15. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2017.01.038>
- Chen, J., Hersmus, N., Van Duppen, V., Caesens, P., Deneff, C., & Vankelecom, H. (2005). The adult pituitary contains a cell population displaying stem/progenitor cell and early-embryonic characteristics. *Endocrinology*, 146(9), 3985–3998. <https://doi.org/10.1210/en.2005-0185>
- Cheng, S. Y., Leonard, J. L., & Davis, P. J. (2010). Molecular aspects of thyroid hormone actions. *Endocrine Reviews*, 31(2), 139–170. <https://doi.org/10.1210/er.2009-0007>
- Chiamolera, M. I., & Wondisford, F. E. (2009). Minireview: Thyrotropin-releasing hormone and the thyroid hormone feedback mechanism. In *Endocrinology* (Vol. 150, Issue 3, pp. 1091–1096). <https://doi.org/10.1210/en.2008-1795>
- Cooper, D. S., & Ladenson, P. (2012). Glándula tiroidea. In D. Gardner & D. Shoback (Eds.), *GREENSPAN Endocrinología básica y clínica* (Novena edi, p. 897). Mc Graw Hill LANGE.
- Costa-e-Sousa, R. H., & Hollenberg, A. N. (2012). Minireview: The neural regulation of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis. In *Endocrinology*. <https://doi.org/10.1210/en.2012-1467>
- Dasen, J. S., & Rosenfeld, M. G. (2001). Signaling and Transcriptional Mechanisms in Pituitary Development. *Annual Reviews of Neuroscience*, 24, 327–355.
- Davis, P. J., Sudha, T., Lin, H. Y., & Mousa, S. A. (2016). Thyroid hormone, hormone analogs, and angiogenesis. *Comprehensive Physiology*, 6(1), 353–362. <https://doi.org/10.1002/cphy.c150011>
- Del río, D. (2012). *Distribución y Caracterización de la respuesta de Calcio intracelular de tirotropos a TRH en rebanadas de hipófisis de ratón macho adulto*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Elena Medrano Ortiz-de Zárate, M., Patricia de Santillana-Hernández, S., del Pilar Torres-Arreola, L., Angélica Gómez-Díaz, R., Rivera-Moscote, R., & Sosa-Caballero, A. (2012). Guía de práctica clínica. Diagnóstico y tratamiento del hipotiroidismo primario en adultos. In *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social* (Vol. 50, Issue 1). <http://www.imss.gob.mx/NR/>
- Elster, D. (1993). Modern Imaging of the Pituitary. *Radiology*, 1–14.
- Fauquier, T., Lacampagne, A., Travo, P., Bauer, K., & Mollard, P. (2002). Hidden face of the anterior pituitary. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 13(7), 304–309.
- Fekete, C., & Lechan, R. M. (2014). Central regulation of hypothalamic-pituitary-thyroid axis under physiological and pathophysiological conditions. In *Endocrine Reviews*. <https://doi.org/10.1210/er.2013-1087>
- Freitas, J. (2012). Development and validation of in vitro bioassays for thyroid hormone receptor mediated endocrine disruption.
- Galas, L., Raoult, E., Tonon, M. C., Okada, R., Jenks, B. G., Castaño, J. P., Kikuyama,

- S., Malagon, M., Roubos, E. W., & Vaudry, H. (2009). TRH acts as a multifunctional hypophysiotropic factor in vertebrates. *General and Comparative Endocrinology*, 164(1), 40–50. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2009.05.003>
- Godoy, R. C., Curbelo, S. T., & Bosch, N. (2004). Fisiología Reproductiva Femenina : Hormonas Sexuales y sus Ciclos. *Biocáncer*, 2, 1–10.
- Gómez, G., Betanzos, R., Sánchez, V., Antonio, S., Mendoza, C., & Arellano, S. (2010). Hipotiroidismo. *Medicina Interna de México*, 26(5), 462–471. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.02.050>
- Halász, B. (2004). Pituitary Gland Anatomy and Embryology. *Encyclopedia of Endocrine Diseases*, 3, 90–96. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-812199-3.01022-7>
- Hernández, F. (2015). Fisiología De Las Glándulas Tiroides Y Paratiroides. *Libro Virtual de Formación En ORL*, 18. [http://seorl.net/PDF/cabeza_cuello_y_plastica/140 - FISIOLOGÍA DE LAS GLÁNDULAS TIROIDES Y PARATIROIDES.pdf](http://seorl.net/PDF/cabeza_cuello_y_plastica/140_-_FISIOLOGÍA_DE_LAS_GLÁNDULAS_TIROIDES_Y_PARATIROIDES.pdf)
- Hillary, S., & Balasubramanian, S. P. (2017). Anatomy of the thyroid, parathyroid, pituitary and adrenal glands. *Surgery (United Kingdom)*, 35(10), 537–541. <https://doi.org/10.1016/j.mpsur.2017.06.016>
- Hinkle, P. M., Gehret, A. U., & Jones, B. W. (2012). Desensitization, trafficking, and resensitization of the pituitary thyrotropin-releasing hormone receptor. *Frontiers in Neuroscience*, 6(December), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fnins.2012.00180>
- Hollenberg, A. N., & Forrest, D. (2008). The Thyroid and Metabolism : The Action Continues. *Cell Metabolism*, 2–4. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2008.06.008>
- Hong, G. K., Payne, S. C., & Jane, J. A. (2016). Anatomy, Physiology, and Laboratory Evaluation of the Pituitary Gland. *Otolaryngologic Clinics of North America*, 49(1), 21–32. <https://doi.org/10.1016/j.otc.2015.09.002>
- Horvath, E. V. A., & Kovacs, K. (1988). Fine Structural Cytology of the Adenohypophysis in Rat and Man. *Journal of Electron Microscopy Technique*, 8(4), 401–432.
- Joseph-Bravo, P., Jaimes-Hoy, L., Uribe, R. M., & Charli, J. L. (2015). TRH, the first hypophysiotropic releasing hormone isolated: Control of the pituitary-thyroid axis. *Journal of Endocrinology*, 226(2), T85–T100. <https://doi.org/10.1530/JOE-15-0124>
- Lafont, C., Desarmenien, M. G., Cassou, M., Molino, F., Lecoq, J., Hodson, D., Lacampagne, A., Mennessier, G., El Yandouzi, T., Carmignac, D., Fontanaud, P., Christian, H., Coutry, N., Fernandez-Fuente, M., Charpak, S., Le Tissier, P., Robinson, I. C., & Mollard, P. (2010). Cellular in vivo imaging reveals coordinated regulation of pituitary microcirculation and GH cell network function. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107, 4465–4470. <https://doi.org/10.1073/pnas.0902599107>
- Melmed, S. (2011). *The Pituitary* (Third Edit, Vol. 63, Issue FEB). Elsevier Inc.
- Miyata, S. (2017). Advances in Understanding of Structural Reorganization in the Hypothalamic Neurosecretory System. *Frontiers in Endocrinology*, 8, 1–18.

<https://doi.org/10.3389/fendo.2017.00275>

- Mollard, P., Hodson, D. J., Lafont, C., Rizzoti, K., & Drouin, J. (2012). A tridimensional view of pituitary development and function. *Cell*, 23, 261–269. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2012.02.004>
- Nakakura, T., Yoshida, M., Dohra, H., Suzuki, M., & Tanaka, S. (2006). Gene expression of vascular endothelial growth factor-A in the pituitary during formation of the vascular system in the hypothalamic-pituitary axis of the rat. *Cell and Tissue Research*, 324(1), 87–95. <https://doi.org/10.1007/s00441-005-0115-y>
- Nikrodhanond, A. A., Ortiga-Carvalho, T. M., Shibusawa, N., Hashimoto, K., Xiao, H. L., Refetoff, S., Yamada, M., Mori, M., & Wondisford, F. E. (2006). Dominant role of thyrotropin-releasing hormone in the hypothalamic-pituitary-thyroid axis. *Journal of Biological Chemistry*, 281, 5000–5007. <https://doi.org/10.1074/jbc.M511530200>
- Ooi, G. T., Tawadros, N., & Escalona, R. M. (2004). Pituitary cell lines and their endocrine applications. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 228, 1–21. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2004.07.018>
- Ortiga-Carvalho, T. M., Chiamolera, M. I., & Pazos-Moura, C. C. (2016). Hypothalamus-Pituitary-Thyroid Axis. *Comprehensive Physiology*, 6(July), 1387–1428. <https://doi.org/10.1002/cphy.c150027>
- Perez-Castro, C., Renner, U., Haedo, M. R., Stalla, G. K., & Arzt, E. (2012). Cellular and Molecular Specificity of Pituitary Gland Physiology. *Physiological Reviews*. <https://doi.org/10.1152/physrev.00003.2011>
- Pineda, J., Galofre, J., Toni, M., & Anda, E. (2016). Hipotiroidismo. *Medicine*, 12(13), 722–730. <https://doi.org/10.1016/j.med.2016.06.002>
- Plateroti, M., & Samarut, J. (2018). *Thyroid Hormone Nuclear Receptor Methods and Protocols* (M. Plateroti & J. Samarut (eds.)). Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2018. <http://www.springer.com/series/7651>
- Quintanar-Stephano, A., & Valverde-R, C. (1997). Mitogenic effects of thyroxine and TRH on thyrotrophs and somatotrophs of the anterior pituitary gland in thyroidectomized rats. *Journal of Endocrinology*. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1540149>
- Quintanar-Stephano, Andrés, Valverde-R, C., & Kovacs, K. (1999). Mitotic counts in rat adenohypophysial thyrotrophs and somatotrophs: Effects of short-term thyroidectomy, thyroxine, and thyrotropin-releasing hormone. *Endocrine Pathology*. <https://doi.org/10.1007/BF02739776>
- Radian, S., Coculescu, M., & Morris, J. F. (2003). Somatotroph to thyrotroph cell transdifferentiation during experimental hypothyroidism - A light and electron-microscopy study. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2003.tb00230.x>
- Ritchie, J. E., & Balasubramanian, S. P. (2014). Anatomy of the pituitary, thyroid, parathyroid and adrenal glands. *Surgery (United Kingdom)*, 32(10), 499–503. <https://doi.org/10.1016/j.mpsur.2014.07.005>
- Robbins. (2010). Patología general. *Elsevier*, 8.

- Rousset B, Dupuy C, Miot F, et al. Chapter 2 Thyroid Hormone Synthesis and Secretion. [Updated 2015 Sep 2]. In: Feingold KR, Anawalt B, Boyce A, et al., editors. Endotext [Internet]. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK285550/>
- Saladin, K. (2013). *Anatomía y fisiología* (Sexta edic).
- Salinas, E., & Quintanar, J. L. (2000). Neurofilaments in thyrotrophs of hypothyroid rats an immunohistochemical study. *Endocrine Pathology*. <https://doi.org/10.1385/EP:11:2:195>
- Santiago, Y. (2017). *CARACTERIZACIÓN DE LOS CAMBIOS DE LA RESPUESTA DE CALCIO INTRACELULAR [Ca²⁺] i DE TIROTROPOS EN REBANADAS DE HIPÓFISIS DE RATA WISTAR CON HIPOTIROIDISMO PRIMARIO*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Schaeffer, M., Hodson, D. J., Lafont, C., & Mollard, P. (2011). Endocrine cells and blood vessels work in tandem to generate hormone pulses. In *Journal of Molecular Endocrinology*. <https://doi.org/10.1530/JME-11-0035>
- Stojilkovic, S. S., Tabak, J., & Bertram, R. (2010). Ion channels and signaling in the pituitary gland. In *Endocrine Reviews*. <https://doi.org/10.1210/er.2010-0005>
- Surks, M. I., & DEFESI, C. R. (1976). Determination of the Cell Number of Each Cell Type in the Anterior Pituitary of Euthyroid and Hypothyroid Rats. *Endocrinology*, *101*, 946–958.
- Taylor, W. A., Evans, N. P., Hertz, C., & Skinner, D. C. (2011). Intra-pituitary administration revisited: Development of a novel in vivo approach to investigate the ovine hypophysis. *Journal of Neuroscience Methods*, *199*(2), 175–182. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2011.02.019>
- Tomanek, R. J., & Busch, T. L. (1998). Coordinated capillary and myocardial growth in response to thyroxine treatment. *Anatomical Record*, *251*(1), 44–49. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0185\(199805\)251:1<44::AID-AR8>3.0.CO;2-E](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0185(199805)251:1<44::AID-AR8>3.0.CO;2-E)
- Toribio, R. E., & Duckett, W. M. (2004). Glándula tiroides. In *Medicina Interna Equina, Vol. 2* (Segunda ed). <http://www.inter-medica.com.ar>
- Tresguerres, J., Ariznavarreta, C., Cachofeiro, V., Cardinali, D., Esrich, E., Gil Loyzaga, P., Lahera, V., Mora, F., Romano, M., & Tamargo, J. (2005). *Fisiología Humana* (Tercera ed).
- Xie, Y., & Dorsky, R. I. (2017). Development of the hypothalamus : conservation , modification and innovation. *Development*, *144*, 1588–1599. <https://doi.org/10.1242/dev.139055>
- Yeung, C. M., Chan, C. B., Leung, P. S., & Cheng, C. H. K. (2006). Cells of the anterior pituitary. In *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.02.012>