

# Estudio Inmunohistoquímico de Neurofilamentos en Tirotropos de Ratas Hipotiroideas

Dra. Eva María Salinas Miralles\*  
Dr. José Luis Quintanar Stephano\*\*

## INTRODUCCIÓN:

Los neurofilamentos (NFs) son proteínas pertenecientes al grupo de los filamentos intermedios (IFs) del citoesqueleto neural. Constan de 3 subunidades de diferente peso molecular: aproximadamente 68, 160 y 200 kDa (NF-L, NF-M y NF-H, respectivamente) (1). Se ha demostrado la presencia de los tres NFs en células adenohipofisarias no neoplásicas, mientras que NF-L y NF-M han sido localizados mediante análisis inmunohistoquímicos en adenomas hipofisarios (2,3). Los IFs retienen la misma antigenicidad durante el desarrollo embrionario, la diferenciación y la transformación neoplásica (4).

Por otra parte, ya está bien establecida la hiperplasia hipofisaria secundaria que se desarrolla como consecuencia del hipotiroidismo primario. Aunque los tirotropos (células productoras de la hormona estimulante de la tiroides o tirotropina, TSH) representan sólo el 10% de las células que forman la adenohipofisis en ratas eutiroides (5), una situación de hipotiroidismo primario prolongado puede conducir a una hiperplasia significativa en los tirotropos, incrementándose el

porcentaje de los mismos a un 34% (5). Los tirotropos sobre-estimulados, conocidos como células de tiroidectomía, son células aumentadas de tamaño, con pocos gránulos de secreción y que poseen un retículo endoplasmático dilatado y un complejo de Golgi conspicuo (6). En ratas, después de la tiroidectomía (7) o de la administración crónica de la droga antitiroidea propiltiouracilo (PTU) (8) se desarrollan adenomas hipofisarios que contienen células de tiroidectomía. Los cambios morfo-funcionales que sufren estas células son revertidos por la restitución de hormonas tiroideas o la interrupción de la administración de PTU (7,8).

La hipótesis que planteamos es que el tipo celular que puede estar expresando los NFs, en ratas eutiroides, sea los tirotropos adenohipofisarios; que si el hipotiroidismo induce células superproductoras de TSH, es posible que este mismo tipo celular exprese los NFs; además, dado que la restitución de los niveles de las hormonas tiroideas restablece las características morfo-funcionales de las células adenohipofisarias, que los NFs bajo estas condiciones disminuyan su expresión.

El objetivo de este trabajo fue

estudiar en ratas, por inmunohistoquímica, la expresión de NF-H en tirotropos durante el desarrollo del hipotiroidismo y el regreso al eutiroidismo.

## MATERIAL Y MÉTODOS:

Se usaron 40 ratas Wistar, hembras, de 150 a 170 gramos de peso corporal. El cuarto de los animales se mantuvo a temperatura constante y con ciclos controlados de luz-oscuridad (12:12 h., encendiendo a las 7 h.). A los animales se les dio acceso libre a comida estándar Purina Chow. Treinta y cinco animales se hicieron hipotiroideos mediante la administración de PTU (0.1% en agua de beber). Grupos de 5 animales se fueron sacrificando por decapitación, bajo profunda anestesia con

\* Profesor-Investigador del Departamento de Microbiología. Centro de Ciencias Básicas. Programa de Investigaciones Biomédicas Básicas. Tel: 9 10 84 24 Fax: 9 10 84 23. Correo electrónico: emsalin@correo.uaa.mx

\*\* Profesor-Investigador del Departamento de Fisiología y Farmacología. Centro de Ciencias Básicas. Programa de Investigaciones Biomédicas Básicas. Tel: 9 10 84 23 Fax: 9 10 84 23 Correo electrónico: jlquinta@correo.uaa.mx

Pentobarbital sódico (50 mg/Kg por inyección intraperitoneal), a los 3, 7, 14 y 28 días de la administración de PTU, así como a los 3, 7 y 14 días después de interrumpir el tratamiento con PTU en el día 14. El grupo control lo formaron 5 ratas no tratadas.

En el momento del sacrificio se obtuvo la sangre del tronco de las ratas, se separaron los plasmas y se almacenaron a -20°C. Las hipófisis y tiroides fueron extirpadas y pesadas en una balanza analítica. Las hipófisis se fijaron en una solución de formalina al 10 %. Se deshidrataron en soluciones de etanol con graduación creciente y fueron embebidas en parafina. A continuación se realizaron cortes consecutivos horizontales de 4 a 6 mm de grosor con ayuda de un microtomo. Para las demostraciones inmunohistoquímicas de TSH y NF-H, se aplicó el método del complejo avidina-biotina-peroxidasa (9), usando un estuche comercial (Vectastin ABC kit; Dimensión, Carpintería, CA). Los anticuerpos primarios, específicos contra TSHB de rata (amablemente donado por NIDDK, Bethesda, MD) y NFs de 200 kDa (anticuerpo policlonal desarrollado en conejo; Sigma, St. Louis, MO), se usaron a diluciones de 1:500 y 1:100, respectivamente, y se incubaron a 4° C durante toda la noche. La reacción de coloración se desarrolló con diaminobencidina y los cortes se contrastaron ligeramente con hematoxilina. Para demostrar la especificidad inmunológica de los anticuerpos anti TSH y NF-H, se utilizaron varios controles negativos: [1] mediante la omisión del antisuero específico, [2] incubando con un antisuero de conejo (IgG) inespecífico y [3] preadsorbiendo el antisuero

específico con el antígeno (TSHb de rata, NIDDK), preincubándolos durante 24 h. a 4° C para TSH (éste último control no se realizó para NF-H por no disponerse comercialmente de la proteína purificada).

Los cortes de las hipófisis se examinaron en un microscopio óptico con amplificación de 1000X usando una lente para aceite de inmersión. El número de células inmunoreactivas para TSH o NFs se expresó en milímetros cuadrados por pituitaria usando el método de Woosley (10). El análisis histológico englobó datos de 5 animales por grupo.

Como controles del hipotiroidismo primario inducido por el PTU, se usaron los animales tratados con PTU durante 14 días y los no tratados. Los niveles plasmáticos de TSH y de tiroxina (T<sub>4</sub>) se cuantificaron por radioinmunoanálisis.

Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM. Las diferencias entre las medias se compararon mediante el análisis único de la varianza, seguido de la prueba de comparación múltiple de Tukey-Kramer. Un valor de  $p < 0.05$  se consideró estadísticamente significativo.

## RESULTADOS

### *Efecto del PTU sobre el peso de la tiroides y los niveles de TSH y T<sub>4</sub>.*

Los pesos de las glándulas tiroideas y los niveles plasmáticos de TSH de las ratas tratadas con PTU durante 14 días, se incrementaron significativamente respecto a los valores de los animales controles: (6.1

$\pm 0.2$  vs  $16.2 \pm 1.6$  mg / 100 g de peso corporal;  $p < 0.001$ ) y ( $1.7 \pm 0.2$  vs  $12.6 \pm 0.9$  ng/ml;  $p < 0.001$ ), respectivamente. Por otro lado, los niveles en plasma de T<sub>4</sub> fueron más bajos después del tratamiento con PTU ( $46.6 \pm 2.8$  vs  $7.3 \pm 0.3$  ng/ml;  $p < 0.001$ ).

### *Presencia de NF-H en los tirotropos*

Para investigar la presencia de NF-H en los tirotropos, se inmunotñeron cortes consecutivos de adenohipófisis de ratas controles con anticuerpos para NFs o TSH. Como se muestra en la Fig. 1, se encontró inmunoreactividad para NF-H y para TSH en la misma célula adenohipofisiaria. En los diversos controles negativos, no se observaron células inmunotñidas.

### *Cambios citológicos en los tirotropos inmunoreactivos para NF-H.*

Los tirotropos inmunopositivos para NF-H, en las pituitarias de las ratas tratadas con PTU, se observaron hipertróficos y la vacuolización del citoplasma se hizo aparente al día 3 de tratamiento y muy conspicua para el día 28. Los NF-H se localizaron alrededor de las vacuolas (Fig. 2A). La intensidad de marcaje para NF-H fue similar a lo largo de los días de tratamiento (3-28 d.). La interrupción de la administración de PTU indujo una ligera recuperación de los cambios citológicos: las células de tiroidectomía en las adenohipófisis de las ratas a las que se les había retirado de PTU durante 14 días, contenían menos vacuolas citoplasmáticas y menos NF-H. Al mismo tiempo, fue

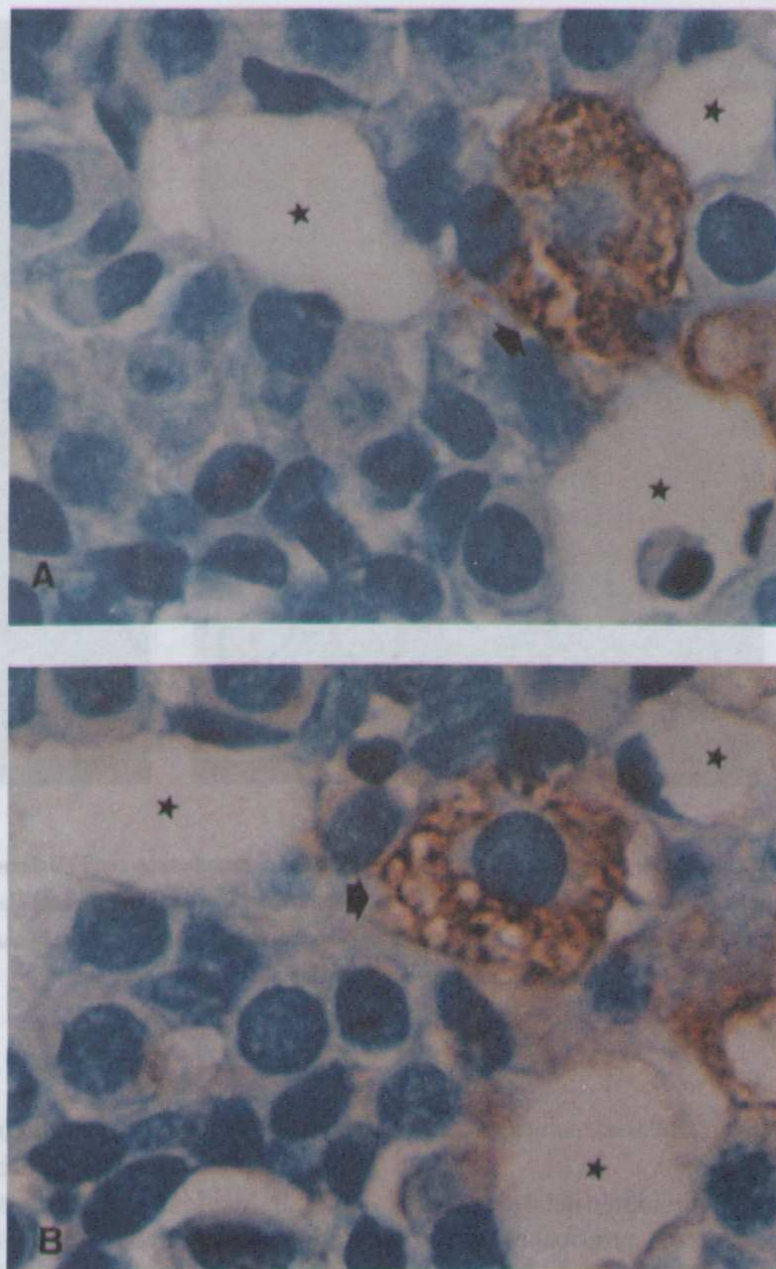
aparente una disminución del tamaño celular (Fig. 2B).

**Número de tirotropos que expresan NF-H**

En la adenohipófisis de ratas controles (d. 0), el porcentaje de tirotropos que mostraron inmunoreactividad para NF-H fue del 13.5 % (Fig. 3). En las ratas tratadas con PTU a diferentes tiempos, el número de tirotropos inmunoreactivos para NF-H se fue incrementando progresiva y significativamente a los 7, 14 y 28 d. ( $116.6 \pm 7.2$ ,  $204.3 \pm 30.8$  y  $280.6 \pm 5.9$  por  $\text{mm}^2$ , respectivamente) (Fig. 3). El porcentaje de tirotropos que mostró inmunoreactividad para NF-H fue de 74.7 %, respecto al 100 % de células inmunoreactivas para TSH, ambas contadas al día 28 de tratamiento con PTU. No se encontró una disminución en el número de los tirotropos con NF-H. Así, 3, 7 y 14 días después de la interrupción del PTU, el número de tirotropos ( $206.6 \pm 23.4$ ,  $245.0 \pm 17.5$  y  $189.3 \pm 4.9$ , respectivamente) permaneció similar al de las ratas tratadas durante 14 días ( $204.3 \pm 30.8$ ).

**DISCUSIÓN**

Los NFs se identificaron originalmente en tejido nervioso y se pensaba inicialmente que representaban proteínas específicas de las neuronas. Sin embargo, los NFs fueron encontrados posteriormente fuera de las células nerviosas (3). Nuestro estudio revela la expresión de NF-H en los tirotropos de las adenohipófisis de ratas normales, siendo el número de tirotropos inmunoreactivos para NF-H bajo (13 %).



**FIGURA No. 1.** Inmunotinción de adenohipófisis de ratas controles. (A) Tirotropos mostrando inmunoreactividad para TSH; (B) el corte consecutivo teñido con anticuerpos anti-NF-H. Ambos contrastados con hematoxilina. Las flechas indican la misma célula (A,B). Las estrellas indican los mismos vasos sanguíneos. Amplificación: 1000 X; barra = 10  $\mu\text{m}$ .

La razón por la que los tirotropos coexpresan TSH y NFs no es clara. Dubois y ElAmraoui (11) sugieren que la presencia de los NFs puede explicarse por la hipótesis del origen

neural de la adenohipófisis, por lo que existe la posibilidad de que algunas células retengan la capacidad de expresar los NFs. Bäck y cols. (12) no encontraron inmunoreactividad para

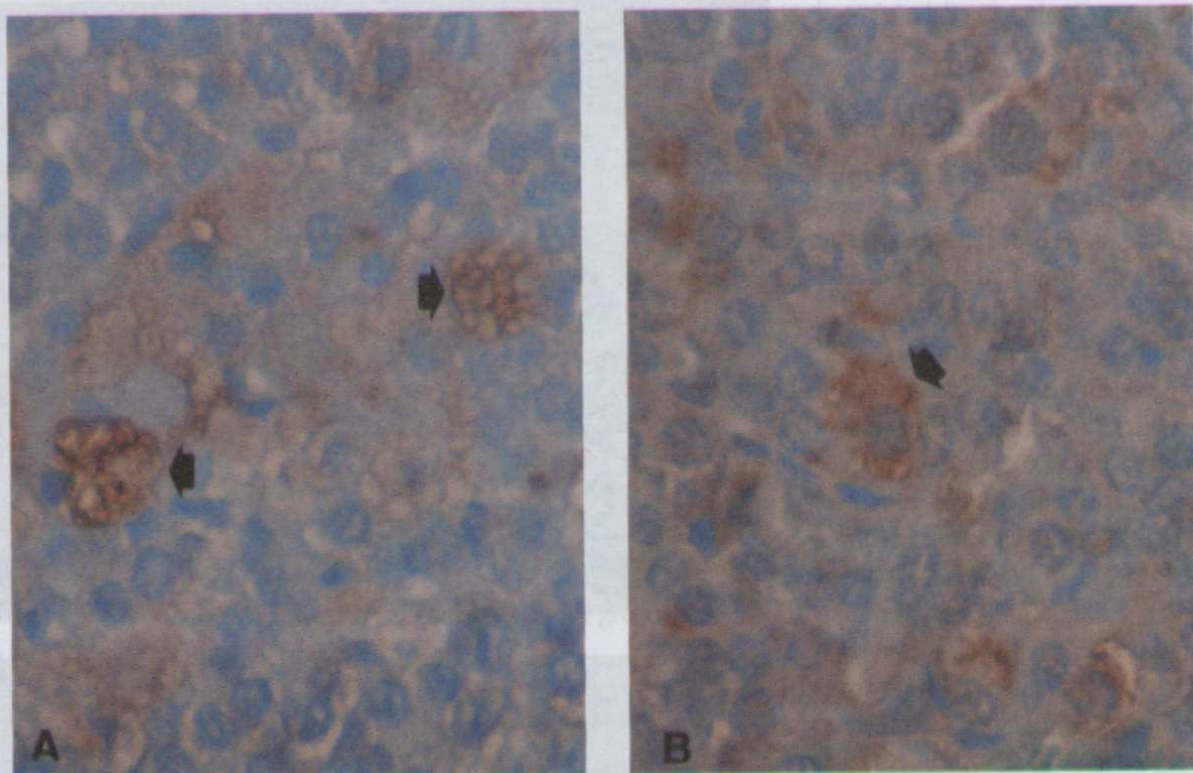


FIGURA No. 2. (A) Inmunohistoquímica de pituitarias de ratas tratadas con PTU durante 28 días. Las flechas muestran una célula de tiroidectomía agrandada, con el citoplasma vacuolizado e inmunoreactividad para NF-H. (B) Inmuntinción de pituitaria de rata tratada con PTU durante 14 días y sin PTU durante 14 días adicionales. La flecha muestra inmunoreactividad para NF-H en un tirotopo. Los cortes se contrastaron con hematoxilina. Amplificación: 400 X; barra = 10  $\mu$ m.

los NFs en células adenohipofisiarias.

El hipotiroidismo inducido por el PTU, generado principalmente por una estimulación mantenida e intensa de los tirotrópos de la adenohipófisis debido a la falta del efecto de regulación negativo que ejercen las hormonas tiroideas, evoca los cambios morfológicos, bien conocidos, que conducen al desarrollo de células de tiroidectomía (8,13). En el presente trabajo, mostramos evidencias de que las células de tiroidectomía contienen NF-H y que el número de tirotrópos inmunoreactivos para NF-H se ve incrementado de forma dependiente

del tiempo en las ratas tratadas con PTU. La expresión de los NFs debe de estar debida a la intensa estimulación de los tirotrópos, consecuencia secundaria de la ausencia de hormona tiroideas; sin embargo, otros autores: Gravel y Hawkes (14), indican que el hipotiroidismo causa una disminución en la expresión de NF-H en la corteza cerebelar, lo que sugiere que los mecanismos de control de la expresión de NFs por las hormonas tiroideas en las neuronas y en tirotrópos son distintos. Aunque el origen de las células de tiroidectomía es controversial, (derivan de

tirotrópos normales (15), o de somatotrófos (8,16) o de células precursoras no diferenciadas (17)), estas células expresan NFs.

El papel de los NFs en las células de tiroidectomía es desconocido. Los IFs aparecen normalmente en las células y se considera que juegan un papel estructural reforzando al citoesqueleto. Las subunidades proteicas de los IFs pueden actuar como transmisores de señales desde la periferia celular al núcleo (18). Por lo tanto, puede ser que los NFs estén relacionados con la hiperplasia y la hipertrofia de los tirotrópos.

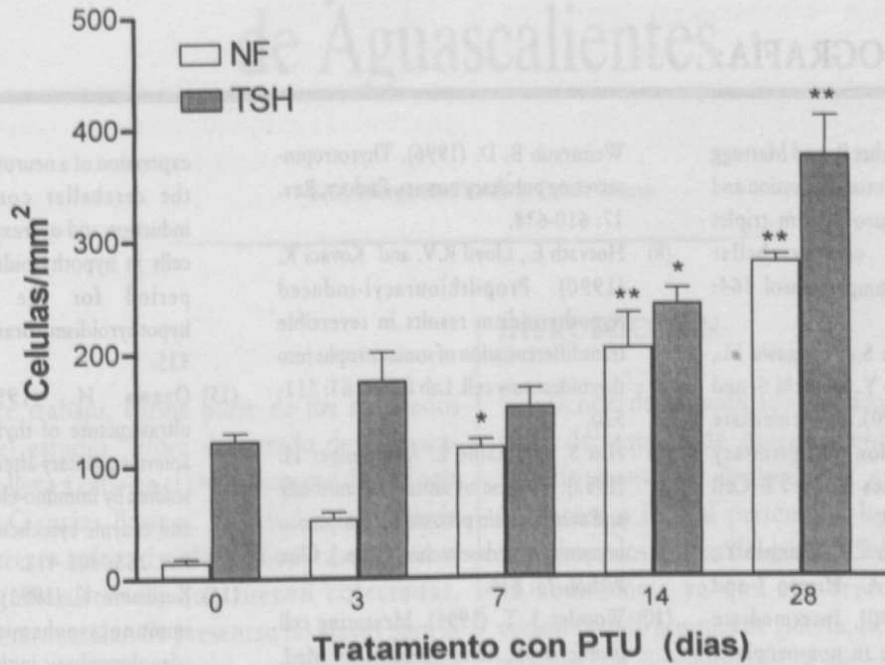


FIGURA No. 3. Efecto del tratamiento con PTU sobre el número de tirotrapos inmunoreactivos para neurofilamentos (NF) y tirotrópina (TSH). Los valores son la media  $\pm$  SEM de cinco glándulas por grupo. \* $p < 0.01$ , \*\* $p < 0.001$ , comparados con los animales controles no tratados. Día 0 = Controles no tratados.

En nuestros estudios, la interrupción del tratamiento con PTU causó una disminución o recuperación en el número de células de tiroidectomía, pero únicamente se vio una regresión en el volumen celular. Horvath y cols. (8) demostraron que el número de células de tiroidectomía disminuía después de la interrupción del PTU y que las pituitarias recuperaban las características de las hipófisis control. Se sabe que existen diferencias significativas entre cepas de ratas en sus respuestas a un mismo tratamiento. Nosotros usamos ratas Wistar, mientras que Horvat y cols. (8) usaron ratas Fisher-344; este

hecho puede explicar la diferencia en los resultados.

### CONCLUSIONES

- Los NFs de 200 kDa están presentes en los tirotrapos de las adenohipófisis en ratas normales.
- Los NF-H también se expresan en las células de tiroidectomía en ratas hipotiroideas.
- La interrupción del tratamiento con PTU conduce a la recuperación de las alteraciones morfológicas en las células de tiroidectomía, las cuales expresan los NFs.

## BIBLIOGRAFÍA:

- (1) Riederer B. M., Porchet R. and Marrugg R. A. (1996). Differential expression and modification of neurofilament triplet proteins during cat cerebellar development. *J. Comp. Neurol* 364: 704-717.
- (2) Ogawa A., Sugihara S., Hasegawa M., Sasaki A., Nakazato Y., Ishiuchi S. and Tamura M. (1990). Intermediate filament expression in pituitary adenomas. *Virchows Archiv. B Cell Pathol.* 58: 341-349.
- (3) Ogawa A., Sugihara S., Nakanishi Y., Suzuki S., Sasaki A., Hirato J and Nakazato Y. (1990). Intermediate filament expression in non-neoplastic pituitary cells. *Virchows Archiv. B Cell Pathol.* 58: 331-340.
- (4) Osborn M and Weber K. (1983). Biology of disease: tumor diagnosis by intermediate filament typing: a novel tool for surgical pathology. *Lab. Invest.* 48: 372-394.
- (5) Surks M.I. and DeFesi C.R. (1977). Determination of the number of each cell type in the anterior pituitary of euthyroid rats. *Endocrinology* 101: 946-958.
- (6) Asa S.L. (1998). Tumors of the pituitary gland. In: *Atlas of tumor pathology*. 3<sup>rd</sup> series, fascicle 22. Washington, D.C: Armed Forces Institute of Pathology 194.
- (7) Beck-Peccoz P., Brucker-David F., Persani L., Smallridge R. C. And Weintraub B. D. (1996). Thyrotropin-secreting pituitary tumors. *Endocr. Rev.* 17: 610-638.
- (8) Horvath E., Lloyd R.V. and Kovacs K. (1990). Propylthiouracyl-induced hypothyroidism results in reversible transdifferentiation of somatotrophs into thyroidectomy cell. *Lab Invest.* 63: 511-520.
- (9) Hsu S. M., Raine L. And Fanger H. (1981). The use of antiavidin antibody and avidin-biotin peroxidase complex in immunoperoxidase technics. *Am. J. Clin. Pathol.* 75: 816.
- (10) Woosley J. T. (1991). Measuring cell proliferation. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 115: 555-557.
- (11) Dubois P. M., ElAmraoui A. (1995). Embriology of the pituitary gland. *Trends Endocrinol. Metab.* 6:1-6.
- (12) Bäck N., Tyynelä M., Portier M. M., Virtanen I and Soynila S. (1995). Distribution of neurofilament proteins and peripherin in the rat pituitary gland. *Neurosci. Res.* 22: 267-275.
- (13) Li M. and Boyages S. C. (1997). Expression of beta2-thyroid hormone receptor in euthyroid and hypothyroid rat pituitary gland: an in situ hybridation and immunocytochemical study. *Brain Res.* 773: 125-131.
- (14) Gravel C. and Hawkes R. (1987). Thyroid hormone modulates the expression of a neurofilament antigen in the cerebellar cortex: premature induction and overexpression by basket cells in hypothyroidism and a critical period for the correction on hypothyroidism. *Brain Res.* 422: 327-335.
- (15) Ozawa H. (1990). Changing ultrastructure of thyrotrophs in the rat anterior pituitary after thyroidectomy as studied by immuno-electron microscopy and enzyme cytochemistry. *Cell Tissue Res.* 263: 405-412.
- (16) Kurosumi K. (1991). Ultrastructural immunocytochemistry of the adenohypophysis in the rat. A review. *J. Electron Microsc. Technol* 19: 42-56.
- (17) Kiguchi Y. (1978). The process of development of thyroidectomy cells from the so-called thyrotrophs. *Endocrinol. Jpn.* 25: 75-86.
- (18) Ravindra R. and Grosvenor C. E. (1990). Involvement of cytoskeleton in polypeptide hormone secretion from the anterior pituitary lobe: a review. *Mol. Cell Endocrinol.* 71: 165-176.

**Nota:** Este trabajo fue publicado en la revista internacional «Endocrine Pathology (Eva Salinas et al., 2000)» y presentado en el XLII Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas en Zacatecas, Zac., 1999.